

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Technischen Universität München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier)

Darstellung von aktiviertem NF- κ B in der arteriosklerotischen Läsion

Klaus-Armin Bartsch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. K. Brand
2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 04.03.2003 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.07.2003
angenommen.

**Meiner lieben Frau Maria in
dankbarer Erinnerung**

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung..... | 5 |
| 1.1 | Transkriptionelle Regulation der Genexpression | 5 |
| 1.2 | NF- κ B/Rel Transkriptionsfaktoren..... | 6 |
| 1.3 | Entzündliche Aspekte bei Arteriosklerose..... | 10 |
| 1.3.1 | Fragestellung | 11 |
| 2 | Material und Methodik | 14 |
| 2.1 | Material..... | 14 |
| 2.1.1 | Antikörper | 14 |
| 2.1.2 | Reagenzien | 14 |
| 2.2 | Methoden | 15 |
| 2.2.1 | Gefrierschnitte..... | 15 |
| 2.2.2 | Immunfluoreszenztechnik | 15 |
| 2.2.3 | Immunhistochemische Verfahren | 16 |
| 2.2.4 | Isolierung nukleärer Extrakte | 17 |
| 2.2.5 | Gelretardierungsassay | 17 |
| 3 | Ergebnisse | 19 |
| 3.1 | Anwendung des G/R-Filtersystems | 19 |
| 3.2 | Untersuchtes Patientengut | 21 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.3 | Darstellung von aktiviertem NF-κB in arteriosklerotischen Läsionen.. | 22 |
| 3.4 | Aktivierungsstatus von NF-κB in Gefäßen ohne Arteriosklerose | 25 |
| 3.5 | Identifizierung von NF-κB in verschiedenen Zelltypen..... | 27 |
| 3.6 | Kontrollexperimente..... | 29 |
| 3.7 | Kolokalisation von aktiviertem NF-κB und Zielgenen..... | 31 |
| 4 | Diskussion | 33 |
| 4.1 | Aktiviertes NF-κB in der arteriosklerotischen Läsion | 33 |
| 4.2 | Stimuli für NF-κB bei Arteriosklerose..... | 34 |
| 4.3 | NF-κB-regulierte Genexpression und funktionelle Aspekte | 38 |
| 4.4 | Weitere Ausblicke | 40 |
| 5 | Zusammenfassung | 41 |
| 6 | Abkürzungen..... | 43 |
| 7 | Eigene Publikationen..... | 46 |
| 8 | Danksagung | 47 |
| 9 | Lebenslauf | 49 |
| 10 | Literaturverzeichnis | 50 |

1. Einleitung

1.1 Transkriptionelle Regulation der Genexpression

Die Expression spezifischer Gene wird durch ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren gesteuert, die man in generelle und regulatorisch wirkende Transkriptionsfaktoren einteilt (95).

Die generellen Transkriptionsfaktoren bilden zusammen mit der RNA-Polymerase II den basalen Transkriptionskomplex, der für die Umschreibung von DNA in RNA benötigt wird (Abb.1). Die Aufgabe dieser Gruppe genereller Transkriptionsfaktoren besteht in der Herstellung und der Stabilisierung eines Kontaktes zwischen DNA und der RNA-Polymerase II im Bereich eines festgelegten DNA-Abschnittes, dem so genannten Promotor. Von einer genau definierten Startstelle innerhalb der Promotorregion wird die RNA-Synthese initialisiert (65, 95).

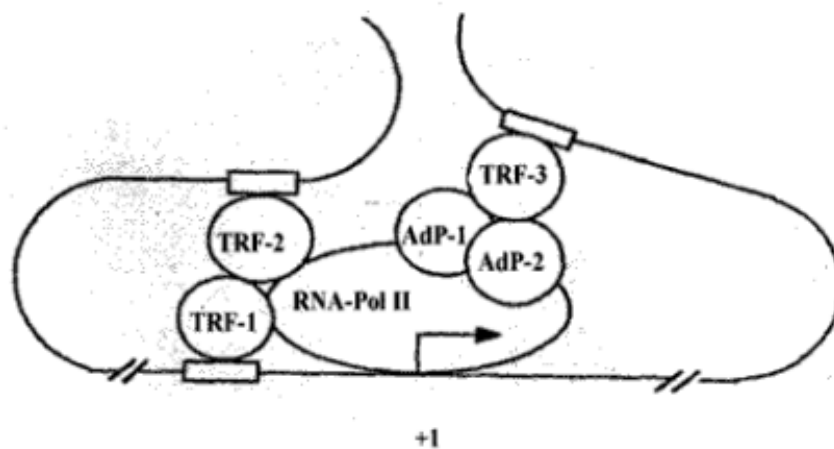


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Transkription. Der aus RNA-Polymerase II und generellen Transkriptionsfaktoren bestehende basale Transkriptionskomplex, (hier nur durch die RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) angedeutet), wird in Kooperation mit regulatorisch wirkenden Transkriptionsfaktoren (TRF 1-3) am Promotor positioniert. Diese Interaktion initiiert den Vorgang der Transkription. Adapter-Proteine (AdP) ermöglichen eine Interaktion entfernt liegender Transkriptionsfaktoren mit dem basalen Transkriptionskomplex. +1: Startpunkt der Transkription (87).

Die regulatorischen Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel NF- κ B sind eine heterogene Gruppe von Proteinen (66), die durch verschiedene Stimuli oder Bedingungen in ihrem Aktivitätsgrad modifiziert werden können, z.B. Zytokine, bakterielle oder virale Produkte sowie verschiedene Formen von zellulärem Stress (66). Diese Faktoren binden sequenzspezifisch an regulatorische DNA-Motive innerhalb von Promotor- und Enhancerregionen und tragen so zur Aktivierung bzw. Hemmung transkriptionaler Prozesse bei (Abb.1). Sie vermitteln ihre Fähigkeit zur Stimulation, indem sie direkt oder indirekt durch Adapterproteine mit den generellen Transkriptionsfaktoren des basalen transkriptionellen Komplexes interagieren und eine Initiierung der Transkription bewirken (95).

1.2 NF- κ B/Rel Transkriptionsfaktoren

NF- κ B/Rel-Transkriptionsfaktoren sind zentral an der Regulation zahlreicher Gene bei entzündlichen und immunologischen Prozessen beteiligt und spielen außerdem bei Proliferation bzw. Apoptose eine wichtige Rolle (9, 103, 120). NF- κ B besteht charakteristischerweise aus zwei Untereinheiten, die miteinander Hetero- oder Homodimere bilden. Der bisher am häufigsten identifizierte NF- κ B-Komplex besteht aus den Untereinheiten p50 und p65 (RelA) (Abb. 2) (7, 103, 122). Weitere Untereinheiten, z.B. c-Rel, p52 oder RelB, sowie zwei Vorläuferproteine, p105 (für p50) und p100 (für p52), wurden gefunden (9, 103). Die Rel-Homologie-Domäne (RHD) ist ein gemeinsames Merkmal aller NF- κ B/Rel-Proteine. Sie ist für die Dimerisierung, nukleäre Translokation, Transaktivierung und DNA-Bindung verantwortlich (7, 9, 46, 54, 103). In unstimulierten Zellen wird der NF- κ B-Komplex durch die Bindung an verschiedene Inhibitorproteine (z.B. I κ B- α , β oder ϵ) im Zytosol zurückgehalten (46). Außerdem können die NF- κ B-Vorstufenproteine p105 und p100 ebenfalls inhibitorische Funktionen übernehmen (6, 56, 103, 120, 143). Eine Anlagerung der I κ B-Proteine an den NF- κ B-Komplex maskiert dessen nukleäres Translokationssignal und verhindert somit die Aktivierung von NF- κ B (1, 3, 7, 10, 54, 135).

Zahlreiche Stimuli, z.B. Zytokine, bakterielle und virale Produkte oder oxidativer Stress, aktivieren das NF- κ B-System (7, 10, 103) (Tab.1). Solch ein Stimulus induziert die Phosphorylierung und Ubiquitinmarkierung von I κ B oder p105/p100 (Abb.3) (1, 10, 34, 98). Für die Serin-Phosphorylierung der I κ B-Proteine, den initialen Schritt der NF- κ B-Aktivierung, werden die I κ B-Kinasen IKK- α (85kDa) und IKK- β (87kDa) verantwortlich gemacht, die in hetero- oder homodimerischer Form als Bestandteil hochmolekularer Komplexe im Zytosol auftreten (6, 9, 10, 109, 120, 132). Diese hochmolekularen Komplexe werden derzeit kollektiv als IKK-Komplex bezeichnet (33, 61, 120, 146). Die Phosphorylierung initiiert ubiquitinabhängig den proteolytischen Abbau von I κ B (52, 61, 134, 140) bzw. die partielle Proteolyse der Vorläuferproteine durch das Proteasom, einen multikatalytischen Proteasenkompex (45, 53, 111). Nach der Abspaltung des Inhibitorproteins kann der dimerische NF- κ B-Komplex in den Zellkern wandern, wo er an regulatorische Promotor- und Enhancer-Elemente bindet und die Transkription zahlreicher Gene kontrolliert (Tab. 2)(7, 10).

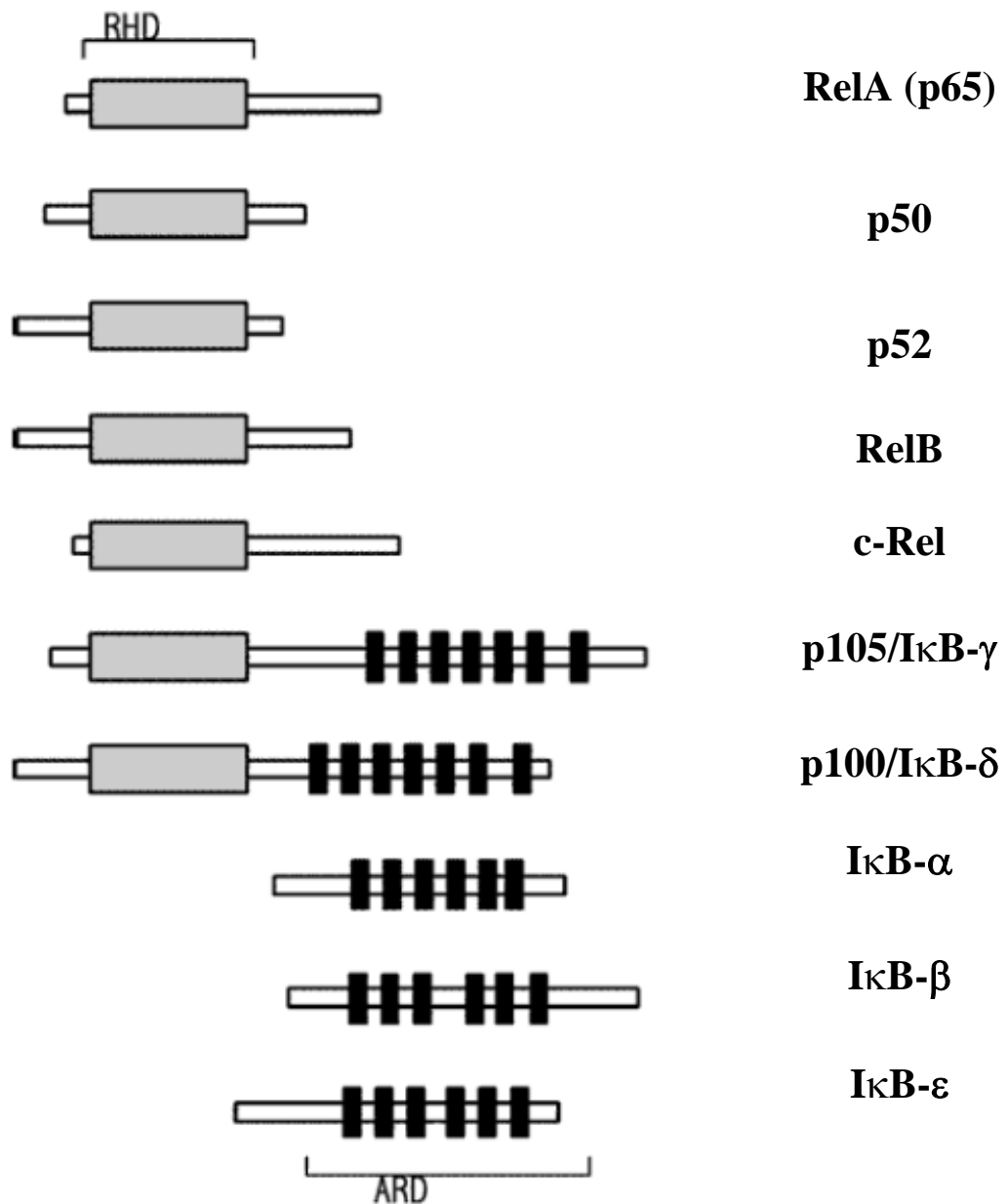


Abbildung 2: Schematische Darstellung der wichtigsten NF-κB/Rel-Untereinheiten und inhibitorischen IκB-Proteine. Gemeinsames Merkmal der NF-κB/Rel-Proteine ist eine konservierte Region, die als Rel-Homologie-Domäne (RHD) bezeichnet wird. Für die inhibitorischen Proteine IκB-α bis -ε ist ein Abschnitt mit einer Anordnung mehrerer Ankyrinmotive charakteristisch (ARD, „ankyrin repeat domain“). Die Vorläuferproteine p105 (IκB-γ) und p100 (IκB-δ) besitzen sowohl eine RHD als auch eine ARD.

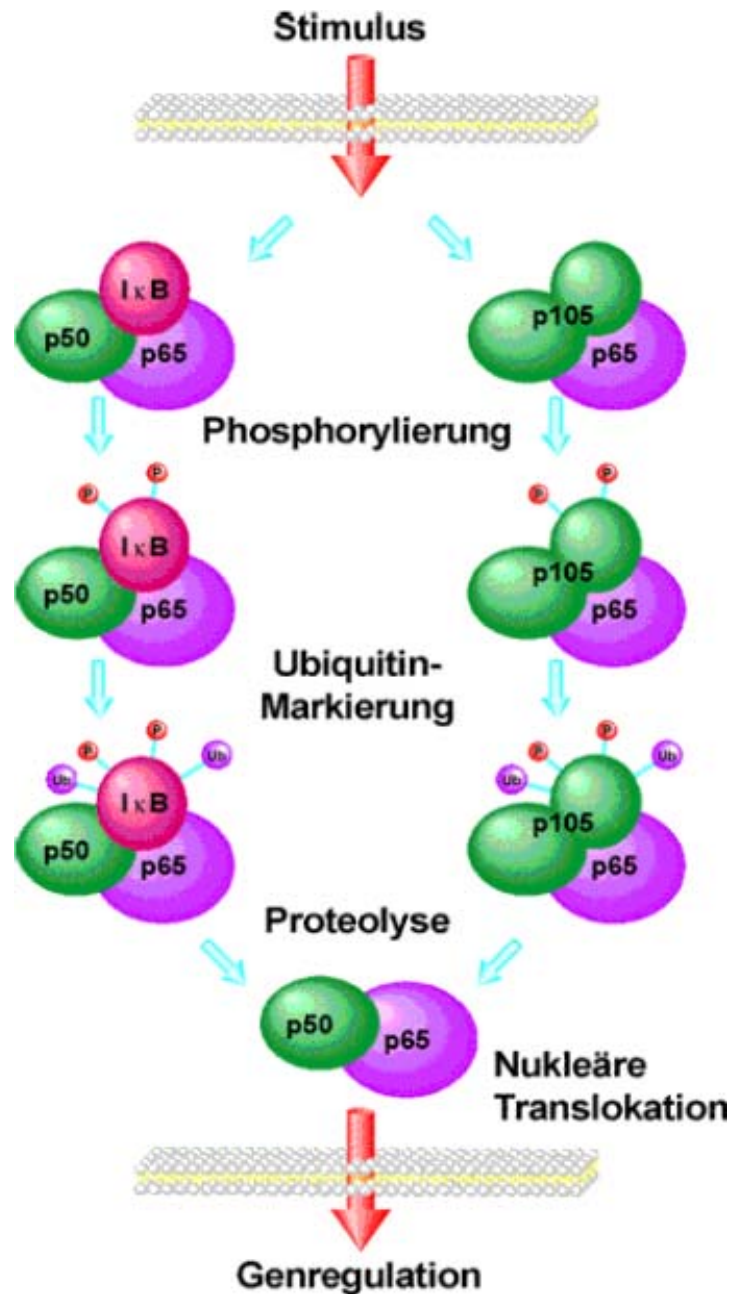


Abbildung 3: NF-κB-Aktivierungsschema. Ein auf die Zelle einwirkender Stimulus induziert die Phosphorylierung und Ubiquitinmarkierung von IκB und p100/p105, was deren Proteolyse initiiert. Der aktivierte NF-κB-Komplex tritt in den Zellkern über und bindet an regulatorische κB-Promotor- und Enhancer-Elemente verschiedener Gene.

1.3 Entzündliche Aspekte bei Arteriosklerose

Im Folgenden sollen vor allem entzündliche Prozesse bei der Pathogenese der Arteriosklerose aufgezeigt werden, für die eine Steuerung durch verschiedene NF- κ B-Genprodukte postuliert wird (77, 78, 112, 142).

Die frühen 8 Stadien der Arteriosklerose sind durch die Aufhebung der Gefäßintegrität und Ablagerung verschiedener Substanzen (z.B. Lipide) gekennzeichnet (112, 142). Es kommt zur Freisetzung von Zyto- und Chemokinen und zu einer Veränderung des endothelialen Expressionsmusters von Adhäsionsmolekülen, was die Migration von Monozyten und Lymphozyten in die Gefäßintima zur Folge hat (25, 79, 112). Ein weiteres Charakteristikum ist die Differenzierung der eingewanderten Monozyten zu Makrophagen, verbunden mit Schaumzellbildung durch die Aufnahme oxidiertes Lipoproteine. Die Makrophagen sind zusammen mit den eingewanderten Lymphozyten für die Produktion proinflammatorischer Zytokine, Wachstumsfaktoren und gerinnungsaktive Moleküle verantwortlich (113, 141). Es folgt die Einwanderung von glatten Muskelzellen in die Läsion, was mit der verstärkten Produktion von extrazellulären Matrixprodukten vergesellschaftet ist und zu einer Verdickung der Gefäßintima führt. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zu starker Beeinträchtigung zellulärer Funktionen (Reparations- oder Immunmechanismen) und einem Fortschreiten der Läsion mit massiver Fibrose und Atherombildung (79, 112, 113). In der späten Phase des arteriosklerotischen Prozesses besteht die Gefahr von Rupturen des Atheroms, bei denen es durch die eröffneten thrombogenen Oberflächen zu einer schnellen Gerinnselbildung und damit zur Obliteration des Gefäßes kommen kann (36, 39, 79, 112, 113, 141). Außerdem kann ein Teil der rupturierten Läsion in weiter peripher gelegene Gefäßabschnitte embolisieren. Dies sind die pathophysiologischen Grundlagen für das Szenario koronarer, zerebraler oder peripherer arterieller Verschlusskrankheiten (76, 79, 112, 113).

Zu Beginn der durchgeführten Studien war die Rolle von NF- κ B bei Arteriosklerose unklar. Insbesondere wurde eine Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors bei entzündungsähnlichen, fibroproliferativen Prozessen der Arteriosklerose postuliert.

1.3.1 Fragestellung

Das übergeordnete Ziel der dargestellten Experimente war, die Bedeutung von NF- κ B bei dem chronisch-entzündlichen Krankheitsbild der Arteriosklerose besser zu verstehen. Durch den neu entwickelten Antikörper α -p65mAb war es möglich, selektiv nur aktiviertes NF- κ B zu markieren (59). Der α -p65mAb erkennt ein Epitop auf der NF- κ B-Untereinheit p65, das durch den gebundenen Inhibitor I κ B maskiert wird (57-59). Deshalb bindet α -p65mAb ausschließlich an aktiviertes NF- κ B, d. h. an p65 in der Abwesenheit von I κ B. Die Darstellung der aktivierten Form von NF- κ B *in situ* auf zellulärer Ebene in arteriosklerotischem Gewebe wurde also erst durch die Entwicklung dieses Antikörpers möglich.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen untersucht:

- Findet man aktiviertes NF- κ B in der arteriosklerotischen Läsion? Diese Frage wurde mit mehreren methodisch voneinander unabhängigen Ansätzen untersucht (Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und Gelretardierungsassay).
- In welchem Zelltyp ist NF- κ B aktiviert?
- Läßt sich eine Kolo-kalisation von aktiviertem NF- κ B und NF- κ B-Zielgenprodukten in der arteriosklerotischen Läsion darstellen?

Eine Aktivierung von NF- κ B in der arteriosklerotischen Läsion wird als Paradigma für entzündliche Prozesse bei dieser Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems aufgefaßt.

Tabelle 1. Stimuli bzw. zelluläre Bedingungen für eine NF-κB-Aktivierung

| Klasse | Induzierende Faktoren |
|----------------------------------|--|
| Zytokine und Wachstumsfaktoren | TNF, IL-1, IL-2 M-CSF, PDGF Lymphotoxin Leukotrien B4 |
| Bakterien → bakterielle Produkte | LPS, Exotoxin B, HSP Toxic Shock Syndrome-Toxin 1 Muraminsäure-Peptid Sphingomyelinase <i>Chlamydia pneumoniae</i> |
| Viren → virale Produkte | HIV-1 HTLV-1 → Tax HBV → Hbx EBV → LMP-1, EBNA Influenzavirus → HA HSV-1, Humanes Herpesvirus 6 SV40, Newcastle Disease-Virus Sendai-Virus, Adenovirus Doppelsträngige RNA |
| T-Zell-Mitogene | Lektine (PHA, ConA) Anti-CD2, Anti-CD3, Anti-CD28 Antigen B- und T-Zellen |
| Physikalischer Stress | UV-A, -B und -C γ-Strahlen |
| Oxidativer Stress | ROI, H ₂ O ₂ , Butyl-Peroxid modifiziertes LDL, Ozon |
| Pharmakologische Substanzen | PMA Phosphataseinhibitoren Calcium-Ionophoren Befeldin A Tunicamycin Cycloheximid |
| Sonstiges | Fibronektin, Thrombin Thrombozyten Sorbitol, AGE Angiotensin-II |

Modifiziert nach Baeuerle et.al. (7) und Pahl (100). Weiterhin wird auf die Liste für Abkürzungen verwiesen (S.42).

Tabelle 2. Auflistung von Genen, für die eine Regulation durch NF- κ B postuliert wird

| Klasse | Zielgen |
|--|---|
| Zytokine und hämatopoetische Wachstumsfaktoren | TNF, IL-1 α , IL-1 β IL-2, IL-3, IL-6 GM-CSF, M-CSF, G-CSF β -Interferon |
| Chemokine | IL-8, MCP-1 Eotaxin gro- α , - β , - γ |
| Inflammatorische Enzyme | iNOS iCOX-2 5-Lipoxygenase Zytosolische Phospholipase A ₂ |
| Oberflächen-Moleküle | ICAM-1, VCAM-1 ELAM-1, E-Selektin |
| Immunregulatorische Moleküle | IL-2-Rezeptor (α -Kette) T-Zell-Rezeptor (α - und β -Kette) MHC-Klasse I- und II-Moleküle Immunglobulin κ -Leichtkette Proteasom-Untereinheit LMP2 |
| Transkriptions- und Wachstums-kontrollfaktoren | I κ B- α , I κ B- ε p105/I κ B- γ , p100/I κ B- δ , c-rel, bcl-3 IRF-1 c-myc p53 ras |
| Gerinnungsmoleküle | TF |
| Akute-Phase-Proteine | Angiotensinogen Serum-Amyloid A-Vorläufer Komplement-Faktor B, C3, C4 |
| Proteasen | uPA MMP-9 |
| Viren | CMV SV 40 Adenovirus HIV-1 |

Modifiziert nach Baeuerle et.al. (7) und Pahl (100). Weiterhin wird auf die Liste für Abkürzungen verwiesen (S.42).

2. Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Der monoklonale Antikörper α -p65mAb (Boehringer Mannheim, Mannheim) bindet an ein Epitop des p65-Proteins, welches bei inaktiviertem NF- κ B durch I κ B verdeckt wird und markiert auf diese Weise nur die aktivierte Form des Transkriptionsfaktors (57-59). In der vorliegenden Arbeit wurden weitere monoklonale Antikörper gegen die folgenden Antigene verwendet: α -Aktin, CD68, CD14, CD3, von Willebrand Faktor, ICAM-1 (alle von Dako, Hamburg) sowie darüber hinaus TF-Antikörper (American Diagnostica Inc., Greenwich, USA). Die Isotypkontrollen wurden von Sigma (Deisenhofen) und die biotinierten sowie die peroxidase-konjugierten Antikörper von Dianova (Hamburg) bezogen. Außerdem kamen polyklonale Antikörper (Kaninchen) gegen p50, p65, c-Rel, I κ B- α und I κ B- β zum Einsatz (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg).

2.1.2 Reagenzien

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) wurde von der Apotheke des Klinikums Rechts der Isar bezogen. Von Sigma (Deisenhofen) stammten Natriumnitroprussid, 3-3'-Diaminobenzidin (DAB), Benzidindihydrochlorid (BDHC), Wasserstoffperoxid, Formaldehyd, DAPI (2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidinedihydrochloride), Hämatoxylin und Eosin. Glycerin kam von der Firma Roth, Rinderserumalbumin Fraktion 5 (BSA) von Boehringer Mannheim. Aceton, Ethanol und Xylol wurden von Merck geliefert, während das Eindeckmedium DePex von der Firma Fluka (Buchs) bezogen wurde.

2.2 Methoden

2.2.1 Gefrierschnitte

Die Gefrierschnitte wurden aus humanem Gewebe hergestellt, das bei gefäßchirurgischen Rekonstruktionsoperationen oder bei Autopsien entnommen wurde. Aus den Gewebeproben wurden im Kryostaten Schnitte mit einer Dicke von 5 µm hergestellt. Die Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger (Sigma Deisenhofen) aufgezogen und bei -70°C aufbewahrt.

Sämtliche Verfahren sind von der Ethikkommission der Technischen Hochschule München genehmigt.

2.2.2 Immunfluoreszenztechnik

Gegenüber den in der Literatur beschriebenen Protokollen wurde die Durchführung der Immunfluoreszenztechnik etwas abgeändert (57-59). Die Gefrierschnitte wurden aufgetaut, 10 min bei -20°C in Aceton fixiert und anschließend 5 min in PBS rehydriert. Nach Behandlung mit 1% BSA wurden die Präparate mit dem in PBS + BSA gelösten primären Antikörper oder der Isotypkontrolle bedeckt. Danach wurden die Gewebe auf den Objektträgern in einer feuchten Kammer 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal 5 min in PBS gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem biotinierten Sekundärantikörper (30 min bei Raumtemperatur (RT)), ein erneutes Spülen in PBS (dreimal 5 min) sowie die Inkubation mit Streptavidin-Cy3 (30 min bei RT). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Schnitte anschließend in Glycerin/PBS-Puffer (1:10) eingeschlossen.

Die Schnitte wurden mit dem Leitz DMR Photomikroskop von Leica (Wetzlar), das mit einer Auflichtfluoreszenzoptik und entweder mit dem regulären Rhodaminfilter oder dem G/R-Filtersystem ausgestattet war, auf Kodak Ektachrome Elite 400 Tageslichtfilm aufgenommen. Um die rote Cy3-Fluoreszenz (Absorptionsmaximum bei 550 nm; Emission 575 nm) von der Autofluoreszenz des fibrotischen Gewebes in den arteriosklerotischen Läsionen besser unterscheiden zu können, wurde das G/R Filtersystem von Leica verwendet (Anregungsfilter: 490/20, 575/30 nm; dichroitischer Teilerspiegel: 505, 600 nm;

Bandpaßfilter: 525/20, 635/40 nm) (24). Die Belichtungszeit variierte von 2 min für das schwache NF- κ B-Signal und 10 sec für das starke α -Aktin Signal. Der Immunfluoreszenz folgte eine Gegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin/Eosin (HE) (Sigma). Es wurden einige Kontrollexperimente zur Färbung der Zellkerne mit dem Farbstoff DAPI (Sigma) durchgeführt.

2.2.3 Immunhistochemische Verfahren

Für die beschriebenen Versuche kam eine geringfügig modifizierte Methode für Doppelfärbungen zum Einsatz (58, 74). Nach dem Auftauen wurden die Gefrierschnitte in gepuffertem Formalin (3,7%, 5 min) und danach in Aceton fixiert (50%, 100% und nochmals 50% für jeweils 2 min). Anschließend wurden die Schnitte in PBS rehydriert (5 min) und mit 1% BSA in PBS präinkubiert (30 min). Darauf folgte die Inkubation der Präparate mit dem primären Antikörper oder der Isotopenkontrolle über Nacht bei 4 °C sowie die erneute Spülung in PBS. Den nachfolgend beschriebenen Schritten folgten ebenfalls jeweils drei Waschschrte in PBS, die in diesem Protokoll nicht mehr explizit erwähnt werden. Nun wurden die Gewebe für 1 h bei RT mit dem sekundären biotinilierten Antikörper inkubiert und für 1 h bei RT mit dem Streptavidin/Biotin/Peroxidasekomplex bedeckt (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, USA). Die Schnitte wurden im Anschluss daran mit einer Mischung DAB (0,3%) und H₂O₂ (0,003%) inkubiert, bis ein diffuses, braunes Reaktionsprodukt zu erkennen war. Die verbleibende Peroxidase wurde durch Eintauchen der Gefrierschnitte in eine 3%ige H₂O₂-Lösung (30 min) neutralisiert. Anschließend erfolgte im Fall von Doppelfärbungen die zweite Färbung, die ebenfalls wie oben beschrieben mit dem primären, dem biotinilierten sekundären Antikörper und dem Streptavidin/Peroxidasekomplex durchgeführt wurde. Im Unterschied zur ersten Färbung wurden die Gewebe hierbei für 10 min mit einer BDHC-Lösung (0,01% BDHC, 0,03% Natriumnitroprussid) vorbehandelt und anschließend im Reaktionsmedium (0,01% BDHC, 0,005% H₂O₂, 0,03% Natriumnitroprussid) inkubiert, bis eine dunkelblaue, granuläre Färbung unter dem Mikroskop zu erkennen war (74). Zum Abschluss wurden die Gefrierschnitte in einer ansteigenden Alkoholreihe, bestehend aus einmal 70%, einmal 96%, zweimal 100% Ethanol und zweimal Xylol dehydriert und in DePex-Medium (Fluka) eingebettet. Bei einigen Experimenten

wurde die BDHC-Färbung mit einer Eosin-Färbung bzw. DAB mit Hämatoxylin (Darstellung der Zellkerne) kombiniert.

2.2.4 Isolierung nukleärer Extrakte

Die nukleären Extrakte wurden nach einem in der Literatur angegebenen und leicht modifizierten Verfahren isoliert (82, 119). Gewebestücke wurden in einem Mörser zerkleinert und die Zellmembranen durch eine fünfminütige Inkubation in Puffer A (0,1% Nonidet P-40; 10 mM Hepes, PH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT; 300 mM Saccharose; je 7,5 µg/ml Pepstatin, Antipain, Chymostatin, Aprotinin und Leupeptin; 5 mM PMSF) zerstört. Die Zellkerne (nukleäre Fraktion) wurden vom Überstand (zytosolische Fraktion) durch Zentrifugation bei 15800 x g (10 sec) getrennt. Um eine Kontamination der nukleären Extrakte durch zytosolische Proteine zu vermeiden, wurden die Kerne einmal in Puffer A gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden daraufhin in Puffer B (20 mM Hepes, PH 7,9; 100 mM KCl; 100 mM NaCl; 20% Glycerin; 0,5 mM DTT; Proteaseinhibitoren wie in Puffer A) aufgenommen und die Kernmembran mit Hilfe eines Ultraschalldesintegrators aufgebrochen. Mittels eines erneuten Zentrifugationsschrittes wurden die Kernmembranfragmente vom nukleären Extrakt getrennt. Der auf diese Weise erhaltene nukleäre Extrakt wurde bis zu seiner Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Der Proteingehalt der nukleären Extrakte wurde mit der Methode nach Bradford (Biorad, München) bestimmt.

2.2.5 Gelretardierungsassay

Um die DNA-Bindungsaktivität von NF-κB beziehungsweise Sp-1 (einem konstitutiv aktiven Transkriptionsfaktor) zu bestimmen, wurde ein Gelretardierungsassay durchgeführt (82), in dem doppelsträngige Oligonukleotide mit den Erkennungssequenzen für den jeweiligen Transkriptionsfaktor verwendet wurden (7, 82). Als NF-κB Konsensussequenz diente entweder ein Oligonukleotid mit dem prototypischen Ig-κ-Motiv oder mit der κB-Sequenz des TF-Promotors. Diese Oligonukleotide wurden in Anwesenheit der benötigten energiereichen Nukleotide durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase 1 (Boehringer) mit [α -³²P]dCTP (>3000 Ci/mmol) (NEN, Brüssel, Belgien) markiert. Als Kontrolle wurde ein Oligonukleotid mit der Erkennungssequenz für Sp-1 mittels der T4-Polynukleotidkinase

(Boehringer) mit [γ -³²P]ATP (>5000 Ci/mmol) (NEN) markiert. Nicht gebundene Nukleotide konnten über eine Sephadex G25-Säule (Boehringer Mannheim) abgetrennt werden. Die nukleären Extrakte (2-10 μ g Protein) wurden mit der radioaktiv markierten Oligo-DNA (10 ng, 10⁵ cpm, falls nicht anders angegeben) im Bindepuffer (20 mM Hepes, PH 7,9; 50 mM KCl; 1 mg/ml BSA; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1% Nonidet P-40; 5% Glycerin, 50 ng Poly[d(I-C)]/ μ l aufgenommen und für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe des Laufpuffers (0,25 x TBE-Puffer; 40% Glycerin; 0,2% Bromphenolblau) erfolgte anschließend die Auftrennung der Proteine in einem 6%igen Polyacrylamidgel in (10x TBE-Puffer: 1,0 M Tris; 0,9 M Borsäure; 10 mM EDTA). Es wurden routinemäßig verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt: Als positive Kontrolle dienten Extrakte von HeLa-Zellen und LPS-stimulierten THP-1-Zellen. Darüber hinaus wurde zu einem Ansatz unmarkiertes Oligonukleotid als spezifischer Kompetitor im Überschuß (10x bis 100x) zugegeben. Die Qualität und Proteinkonzentration der verwendeten nukleären Extrakte wurde parallel durch eine Inkubation mit dem Sp-1 Oligonukleotid überprüft. Die Gele wurden getrocknet und mittels Autoradiographie und Densitometrie quantitativ ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Anwendung des G/R-Filtersystems

Die zu erwartende Konzentration von aktiviertem NF- κ B in humanem Gewebe ist relativ gering, was eine niedrige Signalstärke erwarten läßt. Schwache Signale erfordern lange Belichtungszeiten für die Herstellung von Mikrophotos. Diese geringe Signalstärke zusammen mit der ausgeprägten Autofluoreszenz des fibrotischen Gewebes verhinderte eine adäquate Signalauswertung für aktiviertes NF- κ B im fibrotischen Gewebe mit dem Rhodaminfilter (24) (Abb. 4A).

Im Gegensatz dazu war bei Anwendung des G/R-Filters ein positives, distinktes Signal für aktiviertes NF- κ B identifizierbar (Abb. 4B). Der Hintergrund wurde bei Benutzung dieses Filters drastisch reduziert, indem er eine mehr gelbgrüne Färbung annahm, während das positive, spezifisch rote Signal ohne weiteres sichtbar blieb. Die Eigenfluoreszenz des Bindegewebes wurde im Kontrollschnitt, der ohne primären Antikörper inkubiert worden war, ebenfalls augenscheinlich (Abb. 4C). Letzterer zeigte kein spezifisches Signal, aber nichtsdestoweniger einen ähnlichen Grad von Autofluoreszenz des Hintergrundes. Im Gegensatz zu der niedrigen Intensität des exprimierten NF- κ B-Signals, das für eine adäquate fotografische Darstellung eine lange Belichtungszeit benötigte (1-2 min), zeigten sich bei der Dokumentation des stark exprimierten Antigens α -Aktin keine derartigen Probleme (Abb. 4D). Die ausreichende fotografische Darstellung solcher Signale erforderte kürzere Belichtungszeiten (10 sec) und folglich war auch die Untergrundfluoreszenz weniger problematisch. Kontrollpräparate, die ohne den primären Antikörper, aber mit einer Isotypkontrolle inkubiert worden waren, zeigten niemals ein spezifisches Cy3-Signal (Ergebnisse nicht gezeigt).

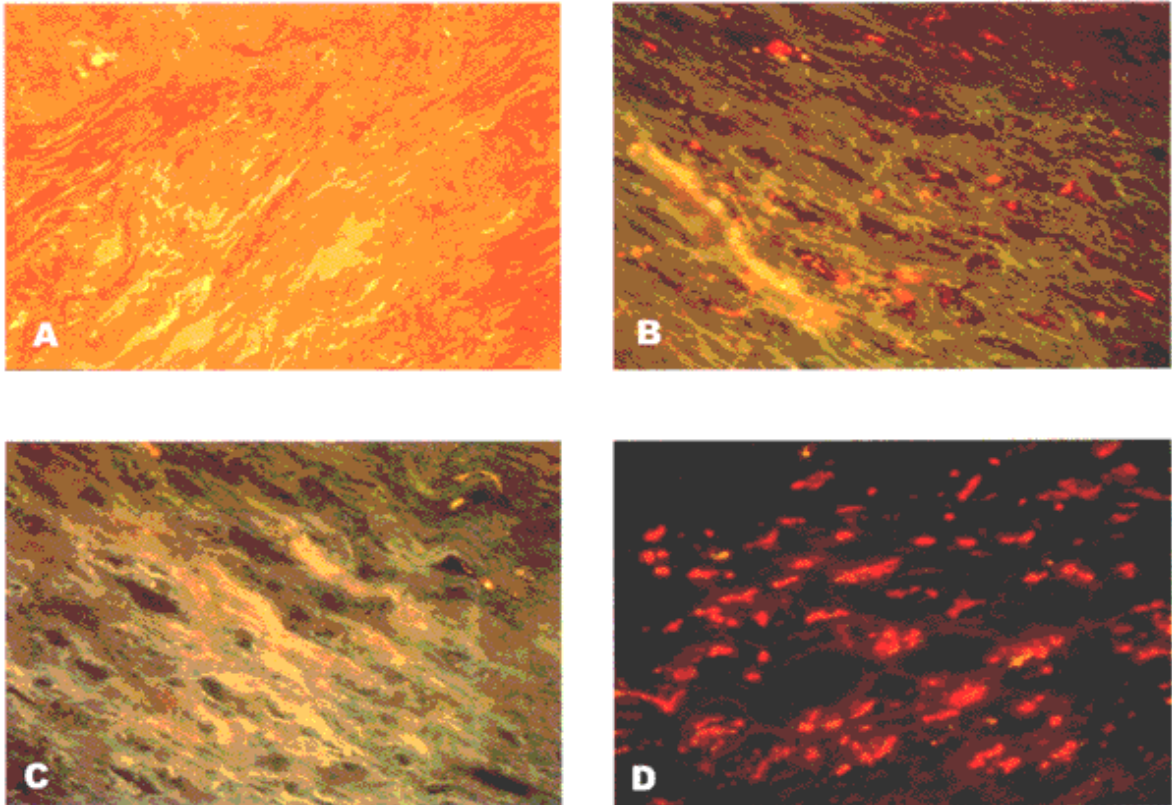


Abbildung 4: Anwendung des G/R-Filtersystems zur Detektion von Antigenen, die in geringer Intensität in fibrotischem Gewebe exprimiert werden. A) NF- κ B-Signal in fibrotischem Gewebe; Mikrophoto mit dem Filtersatz für Rhodamin. Die Autofluoreszenz des Gewebes überlagert das positive Signal. B) Identifizierung von aktiviertem NF- κ B in der fibrotisch verdickten Intima einer arteriosklerotischen Läsion mit dem G/R-Filtersystem. Aktiviertes NF- κ B erscheint rot, der autofluoreszierende Untergrund ist bis auf eine schwache gelbgrüne Färbung verschwunden. C) Färbung in Abwesenheit des primären Antikörpers. Es gibt kein positives Signal, nur die Autofluoreszenz ist sichtbar (mit G/R-Filter). D) Ein stark exprimiertes Antigen Anti- α -Aktin erfordert eine kürzere Belichtungszeit und ergibt mit dem G/R-Filter einen dunkleren Hintergrund. Vergrößerungen x220.

3.2 Untersuchtes Patientengut

In den dargestellten Experimenten wurde ausschließlich arteriosklerotisch verändertes Gewebe von Patienten verwendet, bei denen keine andere schwere Grunderkrankung diagnostiziert wurde. Patienten mit Tumorerkrankungen oder schweren Infektionen wurden aufgrund der Möglichkeit einer Aktivierung von NF- κ B durch derartige Prozesse ausgeschlossen. Der Grad der Arteriosklerose variierte von Frühstadien mit noch intakter Endothelzellschicht bis hin zu verkalkten komplexen Läsionen. In den vorgelegten Studien wurden überwiegend Gewebeproben mit fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsionen (fibrotische und atheromatöse Regionen mit gelegentlichen Kalkeinlagerungen) aus Arteria carotis, Koronararterien, Aorta abdominalis und Arteria renalis untersucht. Die Gewebeproben wurden bei Autopsien oder gefäßchirurgischen Rekonstruktionsverfahren gewonnen. Eine repräsentative Auswahl von Patienten mit Arteriosklerose zusammen mit ihrem klinischen Status oder der Todesursache ist in Tabelle 3 aufgeführt. Das Alter dieser Patienten lag zwischen 42 und 81 Jahren (8 weiblich, 10 männlich).

Tabelle 3. Klinischer Status/Todesursache der untersuchten Patienten mit Arteriosklerose

| Anzahl der Fälle | Diagnose/Todesursache | Gewebe |
|------------------|---|--------|
| 1 | Ösophagusvarizenblutung | A |
| 1 | Fulminante Lungenembolie | A |
| 1 | Chronisch obstruktive Lungenerkrankung/Lungenembolie | A |
| 1 | Herzversagen nach Infarkt | A |
| 3 | Aortendissektion | E |
| 10 | Stenose der Arteria carotis | E |
| 1 | Stenose der Arteria renalis (Hypertension) | E |

A, Autopsie; E, Endatherektomie

3.3 Darstellung von aktiviertem NF- κ B in arteriosklerotischen Läsionen

Zur Identifikation von aktiviertem NF- κ B im arteriosklerotisch veränderten Gewebe wurde die indirekte Immunfluoreszenstechnik zusammen mit dem G/R-Filtersystem eingesetzt. Mit dem Fluorochrom Cy3 wurde aktiviertes NF- κ B *in situ* sichtbar gemacht. Das aktivierte NF- κ B wurde in der fibrotisch verdickten Intima/Media von fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsionen identifiziert (Abb. 5A). Darüber hinaus zeigte das fibrotische Gewebe eine starke gelbgrüne Eigenfluoreszenz. Zur orientierenden Übersicht ist die in A abgelichtete Region in B abermals wiedergegeben, diesmal in einer HE-Färbung und in einer geringeren Vergrößerung. Es ist hier zu erkennen, daß es sich um eine relativ zellarme Region innerhalb der verdickten Intima handelt.

In den zellreicheren Randregionen von Atheromen wurden ebenfalls viele Zellen gefunden, in denen NF- κ B aktiviert war (Abb. 6A). Wiederum ist eine starke Eigenfluoreszenz zu entdecken. In der Übersichtsaufnahme erkennt man in der HE-Färbung eine Anhäufung von Zellen im untersuchten und fotografisch dokumentierten Bereich.

Bei Immunfluoreszenzfärbungen konnte bezüglich der NF- κ B Aktivierung kein Unterschied zwischen Autopsie- und Endatherektomiepräparaten festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Des Weiteren wurde kein NF- κ B-spezifisches Signal bei Austausch des primären α -p65mAb Antikörpers gegen einen unspezifischen Isotyp-Kontrollantikörper (Abb. 6A) oder einer Inkubation nur mit Streptavidin/Cy3 beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt).

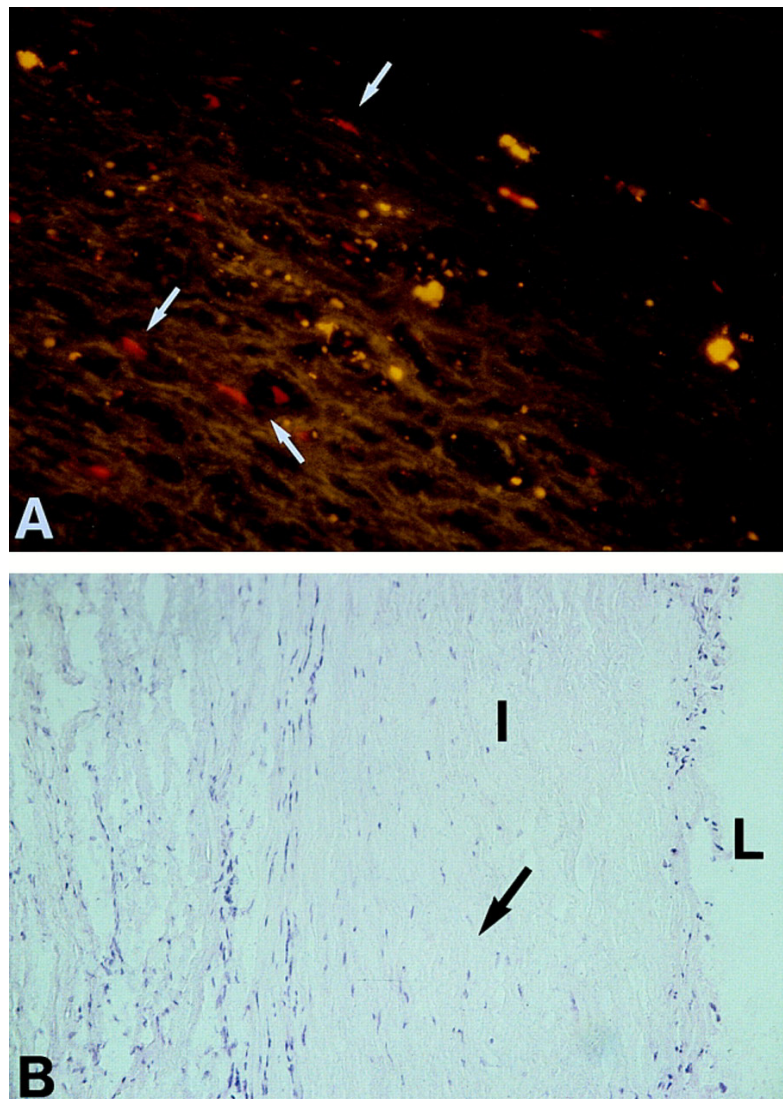


Abbildung 5: Aktiviertes NF- κ B in der fibrotisch verdickten Intima einer fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsion. A) Der α -p65mAb Antikörper (Verdünnung 1:34) erkennt aktiviertes NF- κ B, das dann mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenstechnik mit dem rot-fluoreszierenden Cy3-Farbstoff dargestellt wird (weiße Pfeile). Das fibrotische Gewebe in der Umgebung zeigt eine gelbgrüne Eigenfluoreszenz. x130. B) Die oben abgebildete Region ist in einer HE-Färbung nochmals in der Übersicht zu sehen. Das schwarze „I“ in der HE-Aufnahme steht für die verdickte Intima und der Buchstabe „L“ kennzeichnet das Gefäßlumen. x50.

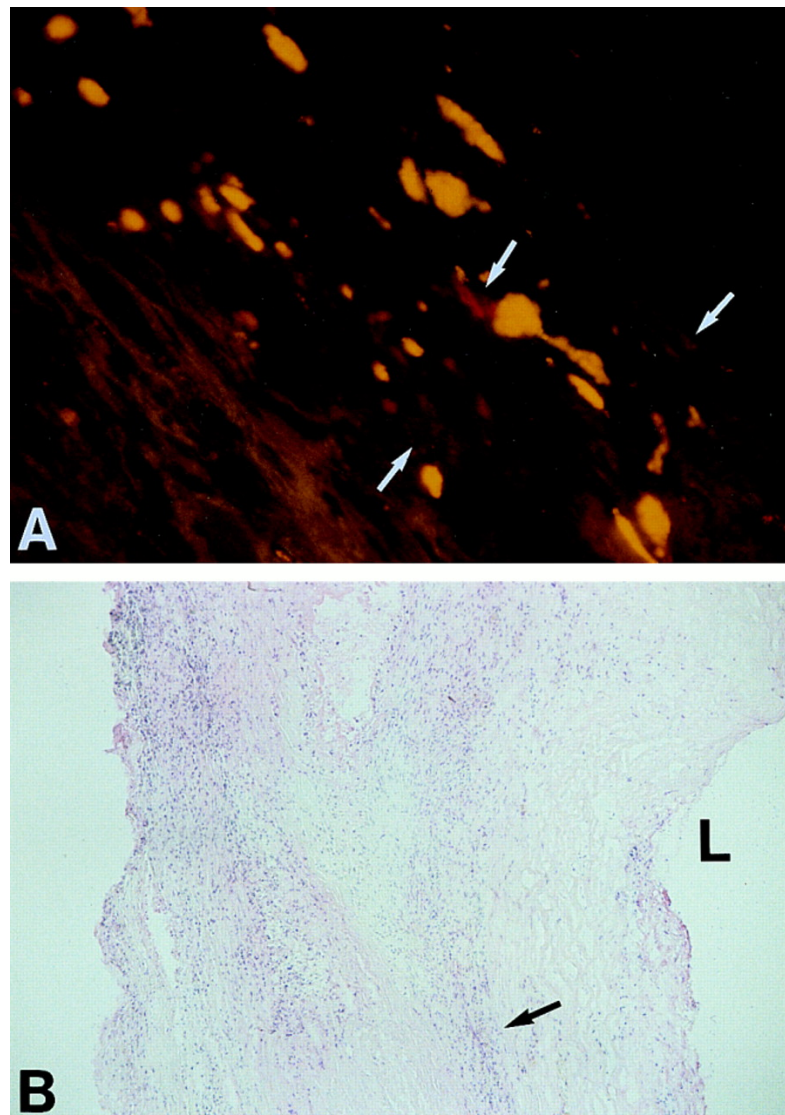


Abbildung 6: Aktiviertes NF- κ B am Rand einer atheromatösen Region in einer fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsion. A) Mit der indirekten Immunfluoreszenz wird die Anwesenheit von aktiviertem NF- κ B (weiße Pfeile) durch das rote Fluorochrom Cy3 sichtbar gemacht. Eine gelbgrünliche Autofluoreszenz ist wiederum zu beobachten. x140. B) Die HE-Aufnahme zeigt wieder eine Übersicht der Region und der schwarze Pfeil deutet auf die in A abgebildete Region. L, Lumen des Gefäßes. x20.

3.4 Aktivierungsstatus von NF- κ B in Gefäßen ohne Arteriosklerose

Aus Aorta und verschiedenen anderen Arterien ohne arteriosklerotische Veränderungen von neun verschiedenen Individuen sowie einer oberflächlichen Vene aus der unteren Extremität wurden Gefrierschnitte angefertigt und untersucht.

Die Gefäße wurden, wie oben beschrieben, inkubiert und nach den entsprechenden Protokollen für Immunfluoreszenz oder Immunhistochemie bearbeitet. In der Intima/Media Region gesunder Aorta war mit der Methode der Immunfluoreszenz keine oder nur eine minimale NF- κ B-Aktivierung zu entdecken (Abb. 7A).

Bei der immunhistochemischen Anfärbung normalen Aortengewebes mit α -p65mAb zeigte sich ebenfalls kein BDHC-Signal (Abb. 7B). Um das Gewebe sichtbar zu machen, wurde es nach der Immunhistochemie mit Eosin gegengefärbt. Auch bei Immundoppelfärbungen mit primären Zellmarkern und NF- κ B als Doppelfärbung war weder in der gesunden Aorta noch in normalen Arterien eine NF- κ B-Färbung nachzuweisen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Das venöse Gewebe zeigte, wie die anderen gesunden Gefäße, keine Anwesenheit von aktiviertem NF- κ B bei Immunfluoreszenzfärbungen, es wies jedoch eine relativ starke Autofluoreszenz auf (Abb. 7C).

Abbildung 7: (S. 26) Aktivierungsstatus von NF- κ B in gesunden Gefäßen. Kein oder nur sehr wenig aktiviertes NF- κ B ist in Arterien und Aorta ohne Arteriosklerose sowie Venen zu finden. In A (normale Arterie) und C (Vene) wird Immunfluoreszenztechnik verwendet. x200. Es ist nur eine schwache Eigenfluoreszenz des Gewebes sichtbar. In B (normale Aorta) wird ein immunhistochemisches Verfahren mit α -p65mAb (Verdünnung: 1:500) und BDHC/Eosin eingesetzt. Es sind einige Erythrozyten an der luminalen Gefäßwand zu erkennen. x100.

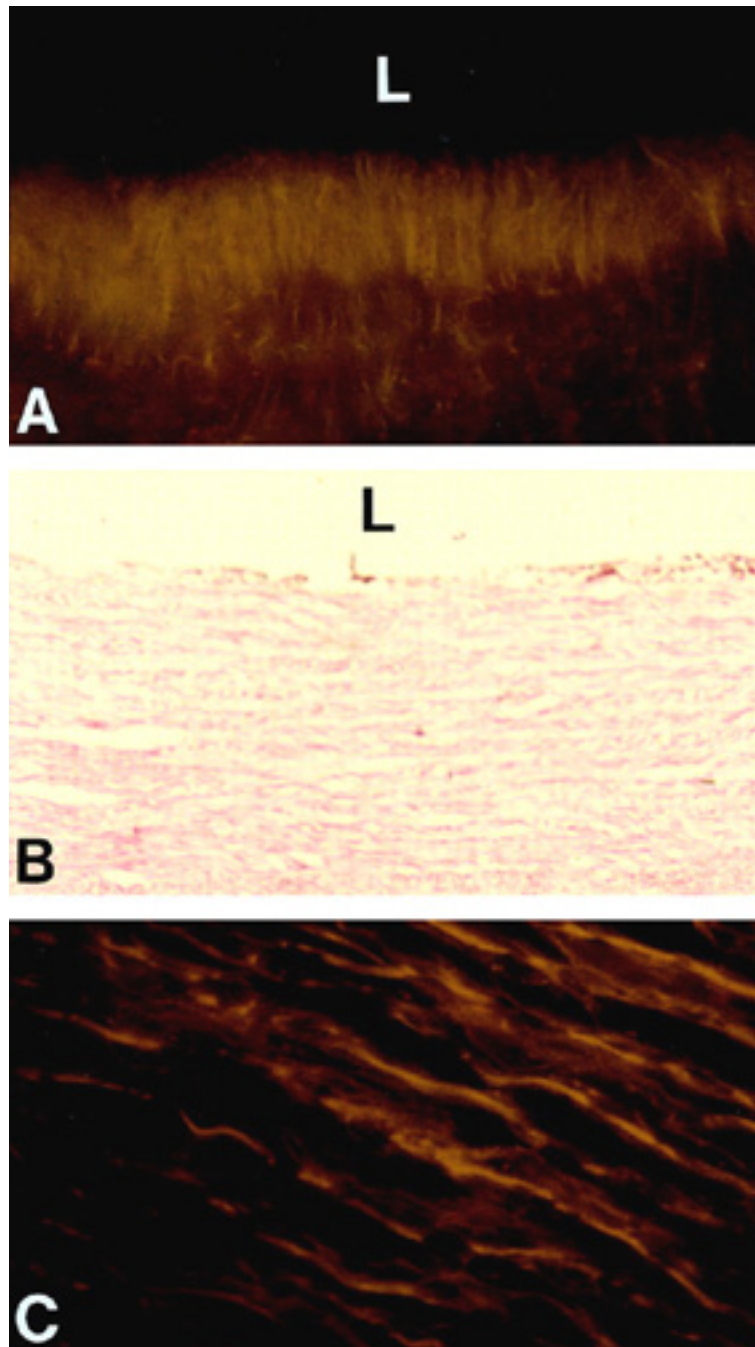


Abbildung 7

(Legende siehe S.25)

3.5 Identifizierung von NF- κ B in verschiedenen Zelltypen

Zur Identifizierung der unterschiedlichen Zelltypen, in welchen NF- κ B aktiviert war, wurden immunhistochemische Doppelfärbungen vorgenommen (58, 74), wobei im ersten Färbungsschritt die verschiedenen Zelltypen mit DAB markiert wurden und im darauf folgenden Schritt aktiviertes NF- κ B mit BDHC gegengefärbt wurde (74). Es ist für diese Technik demonstriert worden, daß diese beiden Farben nicht miteinander interagieren (74). Die Zellidentifikation mit Hilfe monoklonaler zellspezifischer Antikörper ergab, daß in fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsionen glatte Muskelzellen und Makrophagen, wie auch in der Literatur beschrieben, vorherrschen (47, 113). Die Zelleiber von glatten Muskelzellen bzw. von Makrophagen wurden mit einem Antikörper markiert und mit DAB braun gefärbt. Glatte Muskelzellen wurden Antikörper gegen α -Aktin markiert (Abb. 8A), Makrophagen mit einem Antikörper gegen CD68 (Abb. 8B). Aktiviertes NF- κ B konnte innerhalb dieser Zelleiber eher zentral nachgewiesen werden. Die zentrale Lokalisation deutet darauf hin, daß sich ein Großteil des aktivierten NF- κ B, wie beschrieben, im Zellkern befindet (57-59).

In vielen Gefäßpräparaten mit fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsionen war die Endothelschicht zerstört oder zu einem Pseudoendothel umgebaut worden. Es war deshalb zur Bestimmung des Aktivierungsgrades von NF- κ B in Endothelzellen notwendig, auf weniger fortgeschrittene Läsionen zurückzugreifen. Auch bei den Endothelzellen zeigte sich die blaue eher zentral lokalisierte NF- κ B-Färbung (Abb. 8C), was als Hinweis dafür interpretiert wurde, daß es sich auch hier um aktiviertes und in den Zellkern transloziertes NF- κ B handelte.

In den von uns untersuchten Präparaten fanden wir auch einige T-Zellen, in denen ebenfalls aktiviertes NF- κ B nachgewiesen wurde (Ergebnisse nicht gezeigt).

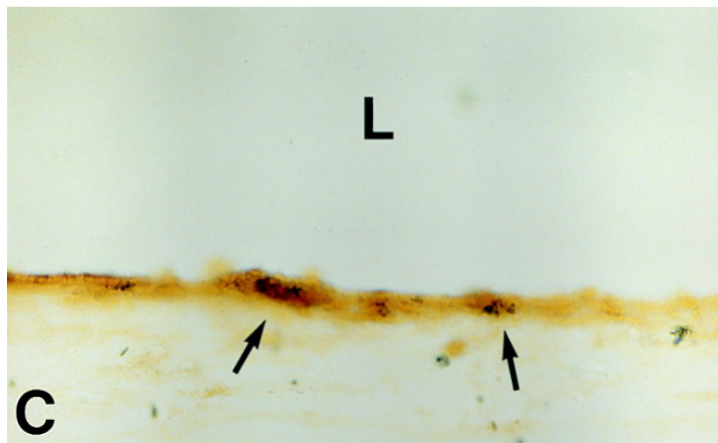
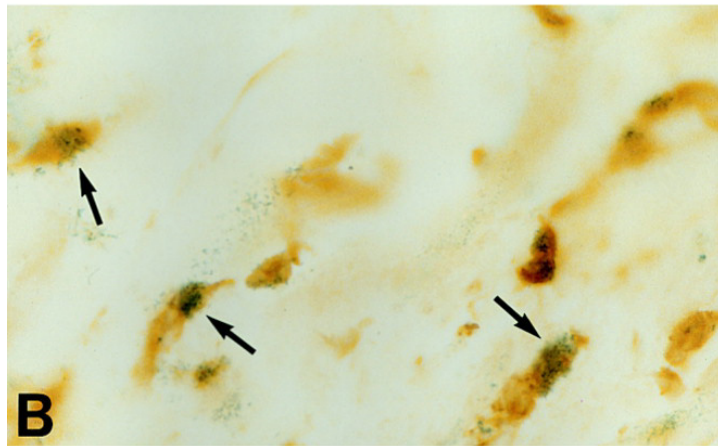
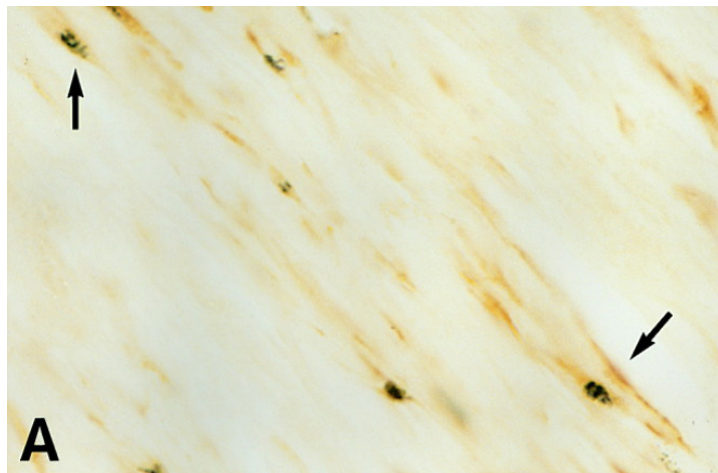


Abbildung 8

(Legende siehe S.29)

Abbildung 8: (S. 28) Darstellung von aktiviertem NF- κ B in verschiedenen Zelltypen. Für diese Experimente wurde arteriosklerotisches Gewebe aus der Arteria carotis (A; B) und der Aorta (C) verwendet. Immunhistochemische Doppelfärbungen wurden unter Verwendung von DAB (braunes diffuses Reaktionsprodukt) für die Markierung der verschiedenen Zelltypen im ersten Färbeschritt und BDHC (blaues, granuläres Reaktionsprodukt) für die Darstellung von aktiviertem NF- κ B durch den α -p65mAb Antikörper (Verdünnung 1:200) im zweiten Schritt durchgeführt. Zur Darstellung der verschiedenen Zelltypen wurden Antikörper gegen α -Aktin (A, glatte Muskelzellen, Verdünnung: 1:200, x380), CD68 (B, Makrophagen, 1:1000, x600,) und von Willebrandfaktor (C, Endothelzellen, 1:50, x380) eingesetzt. Im zweiten Färbeschritt wurde aktiviertes NF- κ B mit BDHC angefärbt (Pfeile). L: Lumen.

3.6 Kontrollexperimente

Um die Möglichkeit unspezifischer Bindungen des α -p65mAb Antikörpers in der Immunfluoreszenz zu überprüfen wurden Isotypkontrollantikörper (IgG3) eingesetzt. Unter diesen Bedingungen war nur die schon beschriebene Autofluoreszenz des arteriosklerotischen Gewebes sichtbar (Abb. 9A). Das Auslassen eines jeglichen primären Antikörpers ergab ebenso wie das Weglassen des primären und sekundären Antikörpers ebenfalls kein rotes Cy3-Signal (Ergebnisse nicht gezeigt).

Bei Kontrollexperimenten für die immunhistochemische Doppelfärbung wurde nach der Färbung mit α -Aktin (DAB) der Isotyp-Antikörper im Austausch mit α -p65mAb als primärem Antikörper im zweiten Färbeschritt eingesetzt, mit dem Ergebnis, daß ebenso die spezifische BDHC-Färbung ausblieb (Abb. 9B).

Unter Auslassung des primären und des sekundären Antikörpers im zweiten Färbungsschritt kam keine spezifische BDHC-Färbung zustande. Nur die mit CD68 im ersten Teil der Doppelfärbung markierten Makrophagen wurden mit DAB angefärbt (Abb. 9C).

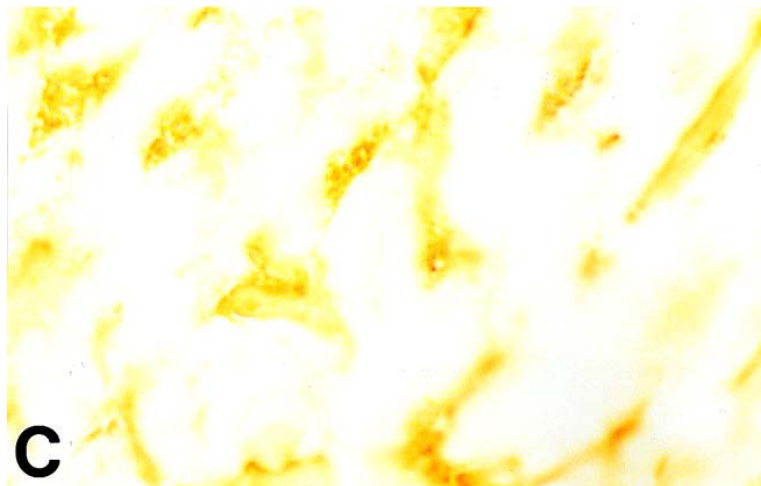
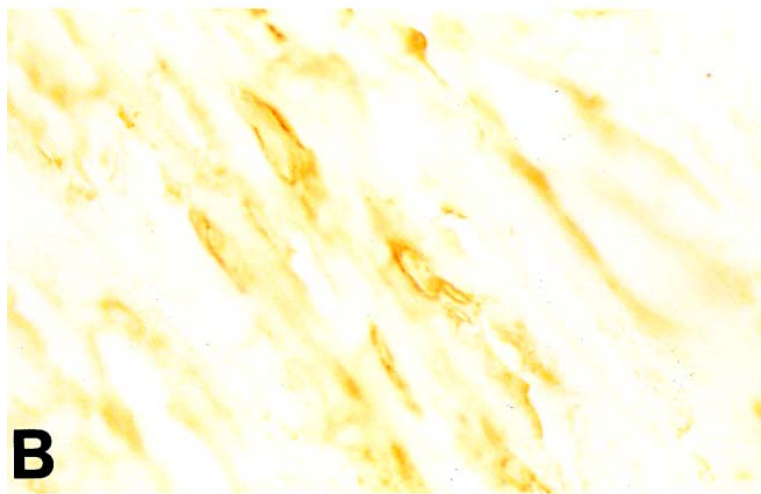
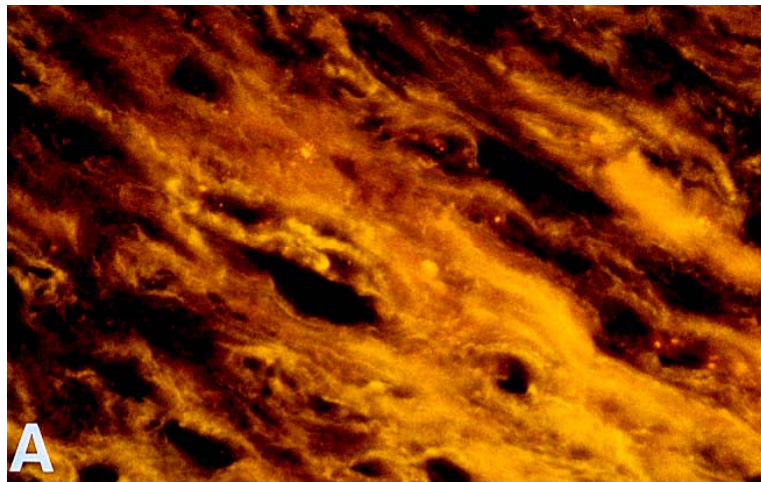


Abbildung 9

(Legende siehe S.31)

Abbildung 9: (S. 30) Kontrollexperimente mit arteriosklerotischem Gewebe, bei denen der spezifische α -p65mAb-Antikörper gegen einen unspezifischen Isotyp-Antikörper ausgetauscht (A und B) oder weggelassen wurde (C). A) Isotyp-Kontrollexperiment für die Immunfluoreszenz-Technik, bei dem der α -p65mAb-Antikörper gegen einen unspezifischen Isotyp-Antikörper ausgetauscht wurde. x220. Es konnte kein spezifisches Cy3-Signal beobachtet werden. B) Isotyp-Kontrollexperiment, bei dem im ersten Schritt der immunhistochemischen Doppelfärbung glatte Muskelzellen (α -Aktin, 1:200) mit DAB braun gefärbt und im zweiten Schritt statt des α -p65mAb-Antikörpers ein Isotyp-Antikörper eingesetzt wurde. x350. C) Kontrollexperiment, bei dem zuerst Makrophagen immunhistochemisch mit DAB angefärbt wurden (CD68, 1:1000) und im zweiten Schritt dieses Gewebe nur mit BDHC inkubiert wurde. x550. Bei keiner der verwendeten Kontrollfärbungen war eine spezifische BDHC-Färbung sichtbar.

3.7 Kolokalisation von aktiviertem NF- κ B und Zielgenen

Gelretardierungsassays gaben Aufschluß über die Bindungsaktivität nukleärer Extrakte aus normalen und arteriosklerotisch veränderten Gefäßen. In diesen Experimenten wurde eine deutlich erhöhte NF- κ B-Bindungsaktivität in den nukleären Extrakten aus arteriosklerotisch veränderten Gefäßen, verglichen mit gesundem Gewebe, festgestellt (Abb. 10A). Bei parallel durchgeführten Sp-1-Bindungsaktivitäts-Messungen fanden sich keine Unterschiede zwischen dem gesunden und dem arteriosklerotisch veränderten Gewebe.

Mögliche Auswirkungen von NF- κ B auf die Genregulation wurden mit Doppelfärbungen für aktiviertes NF- κ B und NF- κ B/Rel-gesteuerte Zielgene näher beleuchtet. Im ersten Färbeschritt wurden verschiedene NF- κ B-regulierte Genprodukte mit DAB markiert und im zweiten Schritt wurde aktiviertes NF- κ B mit BDHC angefärbt. Die Kolokalisation von aktiviertem NF- κ B und der Expression der NF- κ B-Zielgene TF (Abb. 10B) und ICAM-1 (Abb. 10C) ist beispielhaft dargestellt. Eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors in der arteriosklerotischen Läsion scheint also mit direkten Auswirkungen auf die Genregulation verbunden zu sein.

Funktionelle Implikationen von aktiviertem NF- κ B in der arteriosklerotischen Läsion

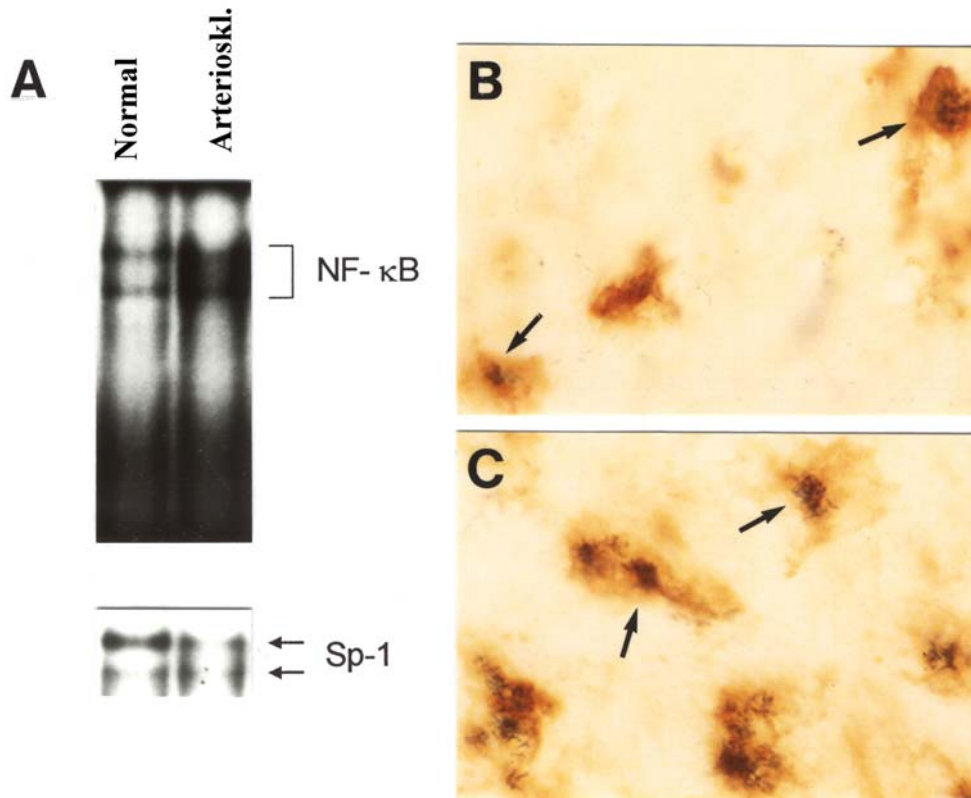


Abbildung 10: Funktionelle Aspekte von aktiviertem NF- κ B in der arteriosklerotischen Läsion. A) Aus normalen und arteriosklerotisch veränderten Gefäßen wurden nukleäre Extrakte isoliert und die DNA-Bindungsaktivität nukleärer Proteine an ein NF- κ B-spezifisches Oligonukleotid mit Gelretardierungsassays untersucht. Die Klammer zeigt aktiviertes NF- κ B an. Die Bindung nukleärer Proteine an ein Sp-1-Oligonukleotid wurde in den gleichen Extrakten analysiert (Doppelpfeil). In B) und C) ist die Kollokalisierung von aktiviertem NF- κ B und NF- κ B/Rel regulierten Genprodukten dargestellt. x700. Verwendet wurden dieselben immunhistochemischen Methoden wie in Abbildung fünf. In B ist die Expression von TF (Verdünnung: 1:200) und in C die Expression von ICAM-1 (1:200) jeweils mit DAB dargestellt. Durch den α -p65mAb Antikörper wurde aktiviertes NF- κ B wiederum mit BDHC angefärbt und ist durch die Pfeile markiert (blau-schwarz, granulär, zentral angeordnet).

4. Diskussion

4.1 Aktiviertes NF- κ B in der arteriosklerotischen Läsion

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten erstmalig die Anwesenheit von aktiviertem NF- κ B *in situ* in arteriosklerotisch veränderten Gefäßen. Für diese Experimente wurden sowohl Immunfluoreszenztechniken als auch immunhistochemische Verfahren verwendet (23). In allen wesentlichen Zelltypen, die am arteriosklerotischen Prozess beteiligt sind (113), war aktiviertes NF- κ B nachweisbar, was auf eine Aktivierung von NF- κ B *in vivo* hindeutet. So wurde die aktivierte Form von NF- κ B in der fibrotisch verdickten Intima/Media und im Randbereich atheromatöser Regionen vorwiegend in Monozyten/Makrophagen und glatten Muskelzellen gefunden. Die in erkrankte Gefäßareale eingewanderten T-Lymphozyten zeigten nur eine relativ geringe Aktivierung (Daten nicht gezeigt). In weniger stark arteriosklerotisch geschädigtem Gewebe, das noch eine intakte Endothelzellschicht aufwies, konnte aktiviertes NF- κ B in Endothelzellen nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu war keine oder kaum eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors in gesunden Arterien oder Venen zu finden.

Die Gelretardierungsassays ergaben eine erhöhte NF- κ B-Bindungsaktivität in nukleären Extrakten, die aus arteriosklerotisch verändertem Gewebe hergestellt wurden, während im Gegensatz dazu in nukleären Extrakten aus normalen Gefäßen nur eine minimale oder keine NF- κ B-Bindungsaktivität meßbar war. Diese mit den Gelretardierungsassays gewonnenen Aussagen bestätigen die durch Immunfluoreszenztechnik und immunhistochemische Verfahren gefundenen Resultate. Unsere Ergebnisse wurden durch Nachfolgearbeiten anderer Forschungsgruppen bestätigt (19).

In weiteren Versuchen wurde eine Kollokalisierung von aktiviertem NF- κ B und der Expression verschiedener NF- κ B/Rel-Zielgene untersucht. ICAM-1 und TF wurden in den hier gezeigten Experimenten gemeinsam mit aktiviertem NF- κ B dargestellt und sind nicht nur Zielgene des Transkriptionsfaktors NF- κ B (9, 100), sondern spielen auch im arteriosklerotischen Prozess bei Adhäsions- und Gerinnungsvorgängen eine wichtige Rolle (78, 113).

4.2 Stimuli für NF- κ B bei Arteriosklerose

Arteriosklerose wird heute als eine chronische Erkrankung mit einer entzündlichen Komponente angesehen. Diese Entzündungsreaktion hat, einmal angestoßen, eine starke Tendenz zur Chronifizierung. Dabei scheint erwähnenswert, daß CRP als ein neuer Risikoparameter bei der Einschätzung von Herzinfarkt gefährdeten Patienten eingesetzt wird (77, 78). In diesem Zusammenhang verdichteten sich die Hinweise, daß NF- κ B bei der Genese der Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielt (12, 13, 78, 79). Es sind zahlreiche Aktivatoren in der arteriosklerotischen Läsion zu finden, die zumindest *in vitro* in der Lage sind, das NF- κ B-System in den Schlüsselzellen der Arteriosklerose zu modulieren (13, 21, 22, 25): z.B. geringgradig oxidiertes LDL (oxLDL), TNF, IL-1, bakterielle Produkte, Viren wie CMV, aktivierte Thrombozyten, Wachstumsfaktoren wie PDGF, Thrombin, Fibronektin, glykosylierte Proteine, Sauerstoffradikale oder Angiotensin-II (7, 31, 42, 44, 67, 91, 102, 105, 107, 123). Im Folgenden werden exemplarisch einige Zusammenhänge zwischen NF- κ B und Risikofaktoren für die Arteriosklerose unter Einbeziehung der aktuellen Literatur diskutiert.

Geringgradig oxidiertes LDL, einer der ätiologischen Faktoren der Arteriosklerose, wurde als spezifischer Stimulus für NF- κ B in Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen identifiziert, während im Gegensatz dazu mit nativem LDL kein Effekt auf das NF- κ B-System beobachtet wurde (20, 21, 31, 131). Die Inkubation mit geringgradig oxidiertem LDL induziert in der Zelle vermutlich oxidativen Stress, der seinerseits als Stimulus für die Aktivierung von NF- κ B verantwortlich sein könnte (20, 36, 81, 83, 101, 117, 142). Eine konzentrationsabhängige Inhibierung der oxLDL-induzierten NF- κ B-Aktivierung wird durch die antioxidative und Wasserstoffperoxid-neutralisierende Substanz Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) demonstriert (21). Weiterhin kann der durch oxLDL stimulierte Abbau von I κ B- α dosisabhängig durch den Proteasominhibitor PSI gehemmt werden (21). Die Inkubation mit oxLDL führt also möglicherweise über eine Veränderung des Redoxstatus der Zelle zu einer Proteasom-assoziierten Proteolyse von I κ B und damit zur Mobilisierung des nun aktivierten NF- κ B-Dimers in den Zellkern. Außerdem wurde ein deutlicher Effekt von oxLDL auf die Transkription/Expression verschiedener NF- κ B-regulierter Proteine beschrieben (21, 129). Ferner wurde eine Aktivierung von NF- κ B durch oxLDL von anderen Arbeitsgruppen ebenso in Endothelzellen, aber nicht in glatten

Muskelzellen (2) gefunden, was auf unterschiedliche Mechanismen in verschiedenen Zelltypen hinweist.

Interessanterweise kann stärker oxidiertes LDL das NF- κ B-System in signifikanter Weise inhibieren (21, 40, 96). Vor allem eine Präinkubation mit vollständig oxidiertem LDL scheint mit deutlichen Hemmeffekten auf dieses transkriptionelle System verbunden zu sein, ohne direkt toxische Wirkungen auszuüben. Unter diesen Bedingungen wurde festgestellt, daß oxLDL die induzierbare Expression der NF- κ B-Zielgene TNF, IL-1 β und MCP-1 in Monozyten/Makrophagen hemmt (43, 51, 125). Dies spiegelt sich wider in einer Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung durch Vorbehandlung mit oxLDL in Zellen der monozytären Stammlinie (21). Ebenso wurde unter den gleichen Kulturbedingungen in der Anwesenheit von oxLDL eine Hemmung der stimulusabhängigen I κ B- α -Proteolyse in monozytären Zellen beobachtet (21). Während der fortschreitenden Oxidation von LDL erfolgt eine deutliche Zunahme einer ganzen Reihe von Substanzen wie Aldehyde, Hydroperoxide oder Lysophosphatidylcholin (LPC) (41, 99, 125). Sowohl LPC (40) als auch die Aldehydverbindung 4-Hydroxynonenal (HNE) konnten in jüngster Zeit als aktive, für die Hemmeffekte auf das NF- κ B-System mitverantwortliche Bestandteile innerhalb von oxLDL identifiziert werden (99). Die induzierte Degradation von I κ B- α durch spezifische Stimuli wird in monozytären Zellen durch HNE ebenso gehemmt wie die Proteolyse der beiden Inhibitorproteine I κ B- α und I κ B- β (99). Weiterhin wurde gezeigt, daß eine Präinkubation mit HNE zu einer spezifischen Hemmung der I κ B-Phosphorylierung (blau-schwarz, granulär, zentral angeordnet).

die I κ B-Kinase in der Anwesenheit von HNE nur noch schwach aktiviert werden kann (99). Die oxLDL-induzierte Dysregulation im Sinne einer Inhibierung von NF- κ B könnte unter bestimmten Bedingungen protektive entzündliche Reparatur- oder Immunmechanismen stören und damit zur Chronifizierung und Schaumzellbildung beitragen. Der Effekt von oxLDL auf das NF- κ B-System ist also möglicherweise für eine massive Beeinträchtigung verschiedener Funktionen in Monozyten/Makrophagen und glatten Muskelzellen sowie in anderen Zellen der Gefäßarchitektur verantwortlich (22, 25, 77).

Chlamydia pneumoniae, ein obligat intrazellulär wachsendes Bakterium (68, 126), wurde in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Methoden in atheromatösen Bereichen von

Arterien nachgewiesen (32, 68, 127). Es wurde gezeigt, daß *C. pneumoniae* die Sekretion verschiedener Zytokine (IL-1 β , TNF und IL-6) in kultivierten menschlichen Blutmonozyten induziert (18, 137). In Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen verursacht die Inkubation mit *Chlamydia pneumoniae* eine NF- κ B-Aktivierung und eine erhöhte Expression von NF- κ B-Zielgenen wie TNF, TF und IL-8 (18, 32, 35, 133).

Rauchen ist ein epidemiologisch etablierter Risikofaktor für Arteriosklerose (27, 70, 124). Es konnte nachgewiesen werden, daß Zigarettenrauch verschiedene am arteriosklerotischen Prozess beteiligte Zellen (Endothelzellen, Makrophagen und Thrombozyten) aktiviert und ein thrombogenes Milieu schafft (62, 63, 64, 76, 93, 136). Der Zigarettenrauch besteht aus ca. 4000 unterschiedlichen Stoffen, von denen ca. 92% der Substanzen gasförmig auftreten und der Rest (das Kondensat) flüssig oder fest vorkommen (27, 60, 106). In Experimenten konnten folgende Wirkungen von Zigarettenrauch auf Gefäßzellen nachgewiesen werden: Das Kondensat, der nicht gasförmige Bestandteil des Zigarettenrauches, verursacht eine Aktivierung von NF- κ B in kultivierten Endothelzellen, begleitet von einer gesteigerten Expression verschiedener NF- κ B-Zielgene, beispielsweise der Adhäsionsmoleküle wie ELAM-1, ICAM-1 und VCAM-1 (60, 62, 121). Sowohl in kultivierten Endothelzellen als auch bei Versuchstieren und Probanden kam es durch Zigarettenrauch zu einer gesteigerten Expression verschiedener NF- κ B regulierter Adhäsionsmoleküle (62, 71, 72, 73, 139). Blutmonozyten von Probanden, die direkt nach dem Rauchen gewonnen wurden, zeigten eine verstärkte Adhäsionsneigung aufgrund der verstärkten Expression des Adhäsionsmoleküls CD11b. Die Expression von CD11b wird von NF- κ B kontrolliert (100, 139). Plasma, das nach dem Rauchen gewonnen wurde, war in der Lage, Thrombozyten zu aktivieren (17). Die Bindung aktivierter Thrombozyten an Monozyten und Endothelzellen führt zu einer Aktivierung von NF- κ B und Zunahme der Expression von IL-1 β , IL-8, MCP-1 und ICAM-1 in diesen Zelltypen (25, 44). Weiterhin bedeutet der Zigarettenrauch für den Körper eine große Last von Radikalen verschiedenster Art, die NF- κ B aktivieren könnten (30, 94).

Im Rahmen einer diabetischen Grunderkrankung werden Proteine durch die hohen Blutzuckerspiegel glykosyliert (15, 115, 138). Für diese glykosylierten Proteine (AGE, „advanced glycolation products“) ist nachgewiesen worden, daß ihre Bindung an spezifische Zellrezeptoren (RAGE) oxidativen Stress in Endothelzellen auslöst, was eine Aktivierung von NF- κ B und eine gesteigerte Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1, von TF und anderen NF- κ B-Zielgenen zur Folge hat (16,

123, 136). Außerdem wurde an transgenen Mäusen, in deren Erbgut ein unter NF- κ B-Kontrolle stehendes β -Globin als Reportergen eingeschleust worden war, gezeigt, daß bei diesen Mäusen die Infusion von AGE-Albumin zu einer lang anhaltenden Expression dieses Reportergens führte (16). Des Weiteren konnte in den mononukleären Zellen von Typ 1-Diabetikern eine dauerhafte Aktivierung von NF- κ B nachgewiesen werden. (16).

Bei einer großen Anzahl von Hypertoniepatienten findet man im Serum erhöhte Angiotensin-II-Spiegel (38, 113). Angiotensin-II wirkt auf zwei Arten blutdrucksteigernd, einmal durch die Natrium-Wasserretention und zum anderen als Vasokonstriktor. Sowohl die Rückresorption von Natrium und Wasser als auch die Eigenschaften von Angiotensin-II als Vasokonstriktor wirken blutdrucksteigernd (78, 89, 102). Die Bindung von Angiotensin-II an seinen Rezeptor führt zu einer direkten Aktivierung von NF- κ B (67, 102). Weiterhin steht die Transkription von Angiotensinogen, dem Vorläuferprotein von Angiotensin-II als ein Akute-Phase-Protein in der Leber, unter NF- κ B-Kontrolle (75, 100).

Die bevorzugten Stellen, an denen sich eine arteriosklerotische Läsion entwickelt, finden sich an Bifurkationsstellen und starken Gefäßkrümmungen von Arterien (55, 130). Diese Verteilung ist wahrscheinlich auf die an diesen Stellen veränderten laminaren Strömungsverhältnisse und die vermindert auf die Endothelzellen einwirkenden Scherkräfte zurückzuführen (30, 48, 130, 145). An diesen Bifurkationsstellen kommt es zur Aufhebung der Laminarströmung, Richtungswechsel der Strömung und Stillstand (30), was für die exponierten Endothelzellen bedeutet, daß sie Scherkräften ausgesetzt sind, die chronisch ihre Richtung wechseln (49). Veränderungen in der Laminarströmung verändern die Genexpression (80, 90). Obwohl die Vorgänge bei der Signalübertragung in den Endothelzellen noch unklar sind, zeigen die Zellkulturstudien, daß mechanische Kräfte wie die durch das strömende Blut verursachten Scherkräfte in den Endothelzellen verschiedene Transkriptionsfaktoren induzieren und einen oxidativen Stress in der Zelle auslösen, was u.a. zu einer Aktivierung von NF- κ B führt (80, 90, 130). In kultivierten Endothelzellen konnte im Strömungsmodell eine deutliche Zunahme von nukleärem NF- κ B in denjenigen Zellen festgestellt werden, die turbulenten Strömungsverhältnissen ausgesetzt waren, im Kontrast zu Zellen, die eher gleich bleibenden Scherkräften und Strömungsverhältnissen ausgesetzt waren (80, 88, 90). Im Tiermodell konnte durch chirurgische Intervention, bei der in die Arterien künstliche Biegungen eingefügt wurden, nachgewiesen werden, daß diese gebogenen oder

stenosierten Abschnitte des Gefäßsystems eine höhere Anzahl arteriosklerotischer Veränderungen zeigen als nicht manipulierte Gefäße. (48, 49, 55, 130).

4.3 NF-κB-regulierte Genexpression und funktionelle Aspekte

Eine funktionelle Relevanz von NF-κB wird sowohl bei den frühen als auch späten Stadien der Arteriosklerose postuliert. So werden eine Vielzahl von NF-κB-Zielgenen in arteriosklerotisch veränderten Läsionen exprimiert (11, 29, 38, 77, 147). Bereits an der Initialisierung und Amplifizierung des durch Gefäßschädigung entstehenden primären Signals sind NF-κB-regulierte Zytokine und Chemokine beteiligt z.B. TNF, IL-1, IL-2, IL-6 und MCP-1 (11, 29, 89, 128). Diese Mediatoren induzieren die Chemotaxis von Monozyten und Lymphozyten, deren Transmigration wiederum durch spezielle NF-κB-gesteuerte endotheliale Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 koordiniert wird (13, 138). Auch in weiter fortgeschrittenen Stadien wird angenommen, daß NF-κB von Bedeutung ist z.B. bei der Produktion von Wachstumsfaktoren (M-CSF, GM-CSF), Metalloproteasen wie MMP-9 und prokoagulatorischen Proteinen wie TF, ferner bei Apoptose (19, 39, 76, 79, 142). Eine stadienabhängige Modulation des NF-κB-Systems bei Arteriosklerose durch aktivierende oder hemmende Moleküle sowie die zugrunde liegenden selektiven Signalübertragungskaskaden sind bisher noch nicht vollständig untersucht (13, 19, 39, 76, 79, 147).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß NF-κB möglicherweise an der Regulation einer ganzen Reihe von funktionell relevanten Genen sowohl in frühen als auch fortgeschrittenen Stadien der Arteriosklerose beteiligt ist (77, 78, 113). Die vorgeschlagene zentrale Rolle von NF-κB bei der (Dys)Regulation der Expression dieser Genprodukte in der arteriosklerotisch veränderten Gefäßwand in Monozyten/Makrophagen, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und T-Lymphozyten ist zusammen mit ihren funktionellen Konsequenzen schematisch in Abb. 11 (S. 39) dargestellt.

**Monozyten / Makrophagen
Glatte Muskelzellen
Endothelzellen
T-Lymphozyten**

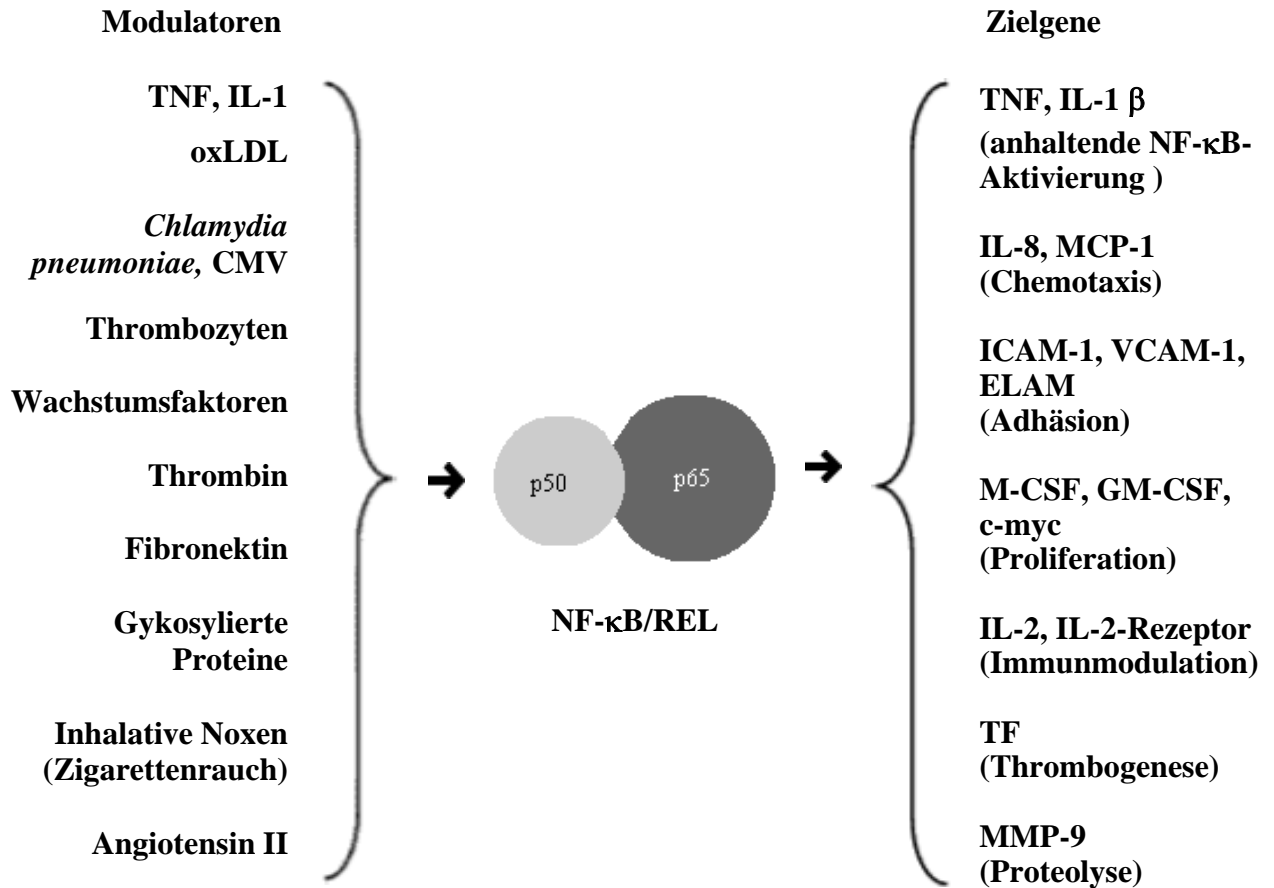


Abbildung 11: Modell für die zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors NF-κB bei der Entstehung von Arteriosklerose. Auf der linken Seite sind etablierte Stimuli aufgelistet, welche NF-κB in den bei Arteriosklerose beteiligten Zelltypen (Monozyten/Makrophagen, glatte Muskelzellen, Endothelzellen und T-Lymphozyten) aktivieren können. Die rechte Seite zeigt mehrere potentielle Zielgene, deren Expression durch NF-κB/Rel in der Läsion (dys)reguliert werden könnte. Eine Reihe von denkbaren funktionellen Konsequenzen sind ebenfalls skizziert. Die zugehörigen Literaturstellen werden im Text aufgeführt.

4.4 Weitere Ausblicke

Aufgrund seiner zentralen regulatorischen Funktion stellt das NF- κ B-System einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung spezifischer therapeutischer Strategien dar (22, 25). Für den Kardiologen bzw. Herz- oder Gefäßchirurgen bietet die Modulation von NF- κ B verschiedene Therapieansätze bei den Komplikationen der Arteriosklerose wie Angina pectoris, Herzinfarkt oder Apoplex bzw. bei therapeutischen Komplikationen wie Restenose (26, 86).

Für den breiter ausgerichteten Arzt sollte darüber hinaus betont werden, daß eine Modulation von NF- κ B auch für ein breites Spektrum akut oder chronisch entzündlicher Erkrankungen relevant zu sein scheint, z.B. Sepsis, entzündliche Magen/Darm- oder Hauterkrankungen, rheumatoide Arthritis sowie Alveolitiden (13).

Es sollte an dieser Stelle angemerkt werden, daß etablierte antiinflammatorische Substanzen, wie Glukokortikosteroide oder Acetylsalicylsäure, neben zahlreichen anderen Wirkungen auch in der Lage sind, NF- κ B zu hemmen (4, 8, 84, 104, 114, 144). Diese häufig therapeutisch eingesetzten Substanzen sind allerdings teilweise mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Zukünftige Strategien sollten deshalb das Ziel einer spezifischen Hemmung der Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors verfolgen. Dabei sind verschiedene Ansatzpunkte denkbar z.B. spezifische Inhibitoren des Proteasoms (28, 50, 134) oder verschiedener Kinasen (33, 69, 85, 109, 146) sowie antioxidative Substanzen (21, 71, 136, 139, 148), Antisense-Oligonukleotide (5, 97, 110, 116, 146), die posttranslationale Hemmung durch NF- κ B-Konsensus-Oligonukleotide, die als Transcription Factor Decoy-Methode bezeichnet wird (5, 14, 37, 92), die Überexpression von I κ B-Inhibitorproteinen (3, 26) und der Einsatz von spezifischen Peptiden z.B. NEMO-Peptid (85, 118). Auf jeden Fall sollte bedacht werden, daß die Hemmung des NF- κ B-Systems mit einer Suppression immunregulatorischer Vorgänge verbunden ist bzw. eine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Apoptose nach sich ziehen könnte (8).

5. Zusammenfassung

Transkriptionsfaktoren der Nuklearfaktor-kappa B (NF- κ B)/Rel-Familie sind an der Regulation zahlreicher Gene beteiligt. Der dimere NF- κ B-Komplex wird im Zytosol durch Inhibitor-kappa B (I κ B)-Proteine inaktiviert. Zahlreiche Stimuli induzieren eine Aktivierung und nukleäre Translokation von NF- κ B, indem sie eine Proteolyse dieser inhibitorischen I κ B-Proteine bewirken. Eine Dysregulation des NF- κ B-Systems wird sowohl bei entzündlichen als auch malignen Erkrankungen vermutet. Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Rolle von aktiviertem NF- κ B bei Arteriosklerose besser zu verstehen.

Zur Identifikation von NF- κ B im arteriosklerotisch veränderten Gewebe wurde die indirekte Immunfluoreszenztechnik zusammen mit dem G/R-Filtersystem eingesetzt. Für diese Experimente wurde ein Antikörper verwendet, der selektiv nur die aktivierte Form von NF- κ B erkennt. Mit dieser Technik konnte aktiviertes NF- κ B zum ersten Mal *in situ* in arteriosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden. Zur Darstellung der unterschiedlichen Zelltypen, in welchen NF- κ B aktiviert war, wurden immunhistochemische Verfahren verwendet (Doppelfärbungen). Aktiviertes NF- κ B konnte in Monozyten/Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen gezeigt werden. Bei histologischen Gewebepreparaten der Aorta und verschiedener anderer Arterien ohne arteriosklerotische Veränderungen sowie einer oberflächlichen Vene zeigte sich bei den Untersuchungen keine oder nur eine minimale NF- κ B-Aktivierung. Gelretardierungsassays gaben Aufschluß über die Bindungsaktivität nukleärer Extrakte aus normalen und arteriosklerotischen Läsionen. In diesen Experimenten wurde eine deutlich erhöhte NF- κ B-Bindungsaktivität in den nukleären Extrakten aus arteriosklerotisch veränderten Gefäßen, verglichen mit gesundem Gewebe, festgestellt. Mit Doppelfärbungen wurde eine Kolo-kalisation von NF- κ B und den NF- κ B/Rel-gesteuerten Zielgenen TF ("tissue factor") und ICAM-1 ("intercellular adhesion molecule-1") dargestellt. Eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors, scheint also mit direkten Auswirkungen auf die Genregulation verbunden zu sein.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die dargestellten Ergebnisse Hinweise liefern auf eine bedeutsame Rolle von NF- κ B bei der Entstehung der Arteriosklerose und bei den sich daraus entwickelnden Komplikationen. Das immer tiefer gehende molekulare Verständnis des

NF- κ B/Rel-Systems sollte zu einer Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien führen.

6. Abkürzungen

| | |
|--------|--|
| AdP | Adapterprotein |
| AGE | Advanced glycation end products |
| ARD | Ankyrin repeat domain |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BDHC | Benzidindihydrochlorid |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CD | Cluster of differentiation |
| CMV | Cytomegalovirus |
| CRP | C-Reaktives Protein |
| CTP | Cytidintriphosphat |
| DAB | Diaminobenzidin |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| EBNA | Epstein-Barr-Virus-Kern-Antigen |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELAM-1 | Endothelial leucocyte adhesion molecule-1 |
| G-CSF | Granulocyte colony-stimulating factor |
| GM-CSF | Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde |
| HA | Hämagglutinin |
| HE | Hämatoxylin/Eosin |
| HBV | Hepatitis-B-Virus |
| Hbx | x-Protein von HBV |
| HIV-1 | Human immunodeficiency virus type 1 |
| HSP | Heat Shock Protein |
| HSV | Herpes <i>simplex</i> -Virus |
| HTLV-1 | Human T-cell leukemia virus type 1 |

| | |
|--------|--|
| ICAM-1 | Intercellular adhesion molecule-1 |
| iCOX-2 | Induzierbare Cyclooxygenase-2 |
| IκB | Inhibitor-kappa B |
| IKK | Inhibitor-kappa B-Kinasekomplex |
| IL | Interleukin |
| iNOS | Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase |
| IRF-1 | Interferon regulatory factor-1 |
| LDL | Low Density-Lipoprotein |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M-CSF | Macrophage colony-stimulating factor |
| MCP-1 | Monocyte chemotactic protein-1 |
| MHC | Major histocompatibility complex |
| min | Minute |
| MMP | Matrix-Metalloprotease |
| mRNA | Messenger-Ribonucleinsäure |
| NF-κB | Nuklearfaktor-kappa B |
| OD | Optische Dichte |
| oxLDL | Oxidiertes Low Density-Lipoprotein |
| PBS | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PDGF | Platelet-derived growth factor |
| PDTC | Pyrrolidindithiocarbamat |
| PHA | Phytohämagglutinin |
| PMA | Phorbol-12-myristat-13-acetat |
| PMSF | Phenylmethansulfonylfluorid |
| PSI | N-Benzyloxycarbonyl-Ile-Glu(O-t-Bu)-Ala-leucinal |
| RAGE | Receptor for advanced glycation end products |
| RHD | Rel-Homologie-Domäne |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| ROI | Reactive oxygen intermediates |
| RSV | Rous-Sarkoma-Virus |
| sec | Sekunde |
| SV 40 | Simian virus 40 |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |

| | |
|--------|------------------------------------|
| TF | Tissue factor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TRF | Transkriptionsfaktor |
| uPA | Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator |
| VCAM-1 | Vascular cell adhesion molecule-1 |

7. Eigene Publikationen

1. Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A., Neumeier, D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J. Clin. Invest.* **97** (1996) 1715-1722.

2a. Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Knuechel, R., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A., Neumeier, D. Applications of the G/R filter System for immunofluorescence techniques in highly fibrotic tissues. *Scientific and Technical Information*, (1995) **XI** 50-53.

2b. Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Knuechel, R., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A., Neumeier, D. Anwendungen des G/R-Filtersystems für Immunfluoreszenz-Techniken bei stark fibrotischem Gewebe. *Mitteilungen für Wissenschaft und Technik* (1995) **Bd. XI** 50-53.

8. Danksagung

Vorrangig möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Korbinian Brand bedanken, der meine Arbeit mit immer neuen Anregungen und Verbesserungen außerordentlich gefördert hat. Insbesondere danke ich für die interessante Aufgabenstellung, die weit genug gefaßt war, mir nicht die Freiheit bei der Ausgestaltung der Arbeit zu nehmen und mich immer wieder neu gefordert hat. Die vielfältige Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft, Anregungen, Geduld und, soweit notwendig, Diplomatie haben mich fachlich und persönlich sehr gefördert.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dieter Neumeier, Direktor des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München, für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die vielfältige persönliche Unterstützung durch immer neue Anregungen und Ideen.

Dr. Sharon Page, Dr. Monika Haas, Dr. Claudia Fischer, Tamara Eisele und Dr. Ursula Kreuzel, um nur einige aus der Arbeitsgruppe Brand zu erwähnen, die mich während meiner Arbeit unterstützten. Ihnen allen danke ich für die intensive Betreuung und die zahlreichen Diskussionen während, vor und nach der Arbeitszeit, persönlich als auch telefonisch und per Email.

Herrn Prof. Dr. Patrick Bauerle von der Firma Micromet in Martinsried gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des damals neu entwickelten Antikörpers α -p65mAb, der diese Arbeit erst möglich gemacht hat.

Für die gute und konstruktive Zusammenarbeit möchte ich mich des weiteren bei Herrn Prof. Dr. Christian Kaltschmidt (Institut für Neurobiochemie, Universität Witten/Herdecke), Herrn Priv.-Doz. Dr. Gerhard Rogler (I. Med. Klinik, Universität Regensburg) und Frau Prof. Dr. Ruth Knuechel-Clarke (Institut für Pathologie, Universität Regensburg) bedanken.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen Eltern, Tante Witha und meiner Frau Maria, die leider viel zu früh von uns gegangen ist. Sie alle haben auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

„Es gibt eine Theorie, die besagt, daß wenn jemand genau herausfindet, wie das Universum funktioniert, es sich sofort in etwas noch Komplizierteres und Verrückteres verwandelt“.

„Es gibt eine andere Theorie, nach der das schon passiert ist.“

„Die Wahrheit ist da draußen“

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

geboren 02.06.1970 in Düsseldorf
Eltern Dipl.-Kfm. Wilfried Bartsch und Ursula Bartsch, beide Steuerberater

Familienstand verheiratet mit Dr. phil. Maria Brand-Bartsch seit 27.12.1993
Verwitwet 06.04.2001

Schulischer Werdegang

1976-1980 St.-Andreas-Grundschule Neuss-Norf
1980-1990 Naturwissenschaftliches Gymnasium Neuss-Norf
1990 Abitur
Aug.87-Juni 88 9 Monate Austauschaufenthalt an der High-School Elk Groove bei Sacramento/Kalifornien USA
Aug.90-Jan..91 Auslandsaufenthalt in Indien
Juni.1991-Aug.1992 Zivildienst in einer Arbeitseinrichtung für Behinderte in Neuss

Universitäre Ausbildung

März 93 Immatrikulation für Indologie
April 94 Wechsel zum Studiengang Humanmedizin

März 96 Physikum
Okt. 97 USMLE 1 (United States Medical Licensing Examination)
März 98 Erstes Staatsexamen
Aug.1999 Zweites Staatsexamen
Okt.2000 Drittes Staatsexamen

Praktisches Jahr:

Okt. 99-Feb. 2000 1.Tertial Chirurgie Großhadern (Viszeralchirurgie H7, Gefäßchirurgie G7)
Feb.-Juni 2000 2.Tertial Innere Medizin in der Poliklinik Pettenkoferstraße Innenstadt
Juni-Okt. 2000 3.Tertial Institut für Anaesthesiologie in Großhadern in folgenden Abteilungen
1. Kardiochirurgische Intensivstation H3A
2. Orthopädie
3. Notfall-OP

Arzt im Praktikum

Juni 2001-Nov.2002 Arzt im Praktikum in der Klinik für Anästhesie im Klinikum
Passau
Ab 01.01.2003 Assistenzarzt am St. Josef Hospital Klinik für Anästhesiologie der
Universität Bochum

10. Literaturverzeichnis

1. Alkalay, I., Yaron, A., Hatzubai, A., Orian, A., Ciechanover, A., Ben-Neriah, Y. Stimulation-dependent I κ B- α phosphorylation marks the NF- κ B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92** (1995) 10599-10603.
2. Ares, M. P. S., Kallin, B., Eriksson, P., Nilsson, J. Oxidized LDL induces transcription factor activator protein-1 but inhibits activation of nuclear factor- κ B in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* **15** (1995) 1585-1590.
3. Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M. S., Bachelierie, F., Thomas, D., Hay, R. Inducible nuclear expression of newly synthesised I κ B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* **15** (1995) 2689-2696.
4. Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmberg, A., Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* **270** (1995) 286-290.
5. Autieri, M. V., Yue, T. L., Ferstein, G. Z., Ohlstein, E. Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B inhibit human vascular smooth muscle cell adherence and proliferation and prevent neointima formation in rat carotid arteries. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **213** (1995) 827-836.
6. Baeuerle, P. A. Proinflammatory signalling. Last pieces in the NF- κ B puzzle? *Current Biology* **8** (1998) R19-22.
7. Baeuerle, P. A., Henkel, T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **12** (1994) 141-179.

8. Baeuerle, P. A., Baichwal, V. R. NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv. Immunol.* **65** (1997) 111-137.
9. Baeuerle, P. A., Baltimore, D. NF-κB ten years after. *Cell* **87** (1996) 13-20.
10. Baldwin, Jr. A. Jr. The NF-κB and IκB proteins. New discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14** (1996) 649-681.
11. Barath, P., Fishbein, M. C., Lao, J., Bernson, J., Helfaut, R. H., Forrester, J. Tumor necrosis factor gene expression in human vascular smooth muscle cells detected by in vitro hybridization. *Am. J. Pathol.* **137** (1990) 503-509.
12. Barnes, P. J., Karin, M. Nuclear factor-κB - a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* **336** (1997) 1066-1071.
13. Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards P. A., Watson, A. D., Lusis, A. J. Atherosclerosis basic mechanisms oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* **91** (1995) 2488-2496.
14. Bielinska, A., Shivdasani, R. A., Zhang, L. and Nabel, G. J. Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides. *Science* **250** (1990) 997-1000.
15. Bierhaus, A., Illmer, T., Kasper, M., Luther, T., Quehenberger, P., Tritschler, H., Wahl, P., Ziegler, R., Mueller, M., Nawroth, P. P. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* **96** (1997) 2262-2271.
16. Bierhaus, A., Schiekofler, S., Schwaninger, M., Andrassy, M., Humpert, P. M., Chen, J., Hong, M., Luther, T., Henle, T., Kloting, I., Morcos, M., Hofmann, M., Tritschler, H., Weigle, B., Kasper, M., Smith, M., Perry, G., Schmidt, A. M., Stern, D. M., Haring, H.

- U., Schleicher, E., Nawroth, P. P. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* **50** (2001) 2792-2808.
17. Blache, D. Involvement of hydrogen and lipid peroxides in acute tobacco smoking-induced platelet hyperactivity. *Am. J. Physiol.* **268** (1995) 679-685.
 18. Blessing, E., Kuo., C. C., Lin, T. M., Campbell, L. A., Bea, F., Chesebro, B., Rosenfeld, M. E. Foam cell formation inhibits growth of *Chlamydia pneumoniae* but does not attenuate *Chlamydia pneumoniae*-induced secretion of proinflammatory cytokines. *Circulation.* **105** (2002) 1976-1982.
 19. Bourcier, T., Sukhova, G., Libby, P. The nuclear factor κ B signalling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 15817-15824.
 20. Brand, K., Banka, C. L., Mackman, N., Terkeltaub, R. A., Fan, T., Curtiss, L. K. Oxidized LDL enhances lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in human adherent monocytes. *Arterioscler. Thromb.* **14** (1994) 790-797.
 21. Brand, K., Eisele, T., Kreusel, U., Page, M., Page, S., Haas, M., Gerling, A., Kaltschmidt, C., Neumann, F. -J., Mackman, N., Baeuerle, P. A., Walli, A. K., Neumeier, D. Dysregulation of monocytic nuclear factor- κ B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17** (1997) 1901-1909.
 22. Brand, K., Fischer, C., Donath, B., Baumgartner, B. und Neumeier, D. Dysregulation des NF-kappaB-Systems bei Arteriosklerose. *Die Medizinische Welt* **50** (1999) 316-320.
 23. Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A., Neumeier, D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J. Clin. Invest.* **97** (1996) 1715-1722.

24. Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Knuechel, R., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A., Neumeier, D. Applications of the G/R filter system for immunofluorescence techniques in highly fibrotic tissues. *Scientific and Technical Information, Leica*. **XI** (1995) 50-53.
25. Brand, K., Page, S., Walli, A. K., Neumeier, D. und Baeuerle, P. A. Role of nuclear factor- κ B in atherogenesis. *Experimental Physiology* **82** (1997) 297-304.
26. Breuss, J. M., Cejna, M., Bergmeister, H., Kadl, A., Baumgartl, G., Steurer, S., Xu, Z., Koshelnick, Y., Lipp, J., De Martin, R., Losert, U., Lammer, J., Binder, B. R. Activation of nuclear factor-kappa B significantly contributes to lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model. *Circulation*. **105** (2002) 633-638.
27. Church, D. F., Pryor, W. A. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.* **64** (1985) 111-126.
28. Cobb, R. R., Felts, K. A., Parry, G. C. N., Mackman, N. Proteasome inhibitors block VCAM-1 and ICAM-1 gene expression in endothelial cells without affecting nuclear translocation of nuclear factor- κ B. *Eur. J. Immunol.* **26** (1996) 839-845.
29. Collins, T., Cybulsky, M. I. NF- κ B pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J. Clin. Invest* **107** (2001) 255-264.
30. Collins, T. Endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab. Invest.* **68** (1993) 499-508.
31. Cushing, D., Berliner, J. A., Valente, A. J., Territo, M. C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C. J., Fogelman, A. M. Minimally modified LDL induces monocyte chemotactic protein-1 in human endothelial and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (1990) 5134-5138.

32. Dechend, R., Maass, M., Gieffers, J., Dietz, R., Scheidereit, C., Leutz, A., Gulba, D. C. Chlamydia pneumoniae infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI-1 expression a potential link to accelerated arteriosclerosis. *Circulation* **100** (1999) 1369-1373.
33. DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., Karin, M. A cytokine-responsive IκB kinase that activates the transcription factor NF-κB. *Nature* **388** (1997) 548-554.
34. DiDonato, J., A. Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S., Karin, M. Mapping of the inducible IκB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biol.* **16** (1996) 1295-1304.
35. Donath, B., Fischer, C., Page, S., Prebeck, S., Jilg, N., Weber, M., da Costa C, Neumeier, D., Miethke, T., Brand, K. Chlamydia pneumoniae activates IKK/IkappaB-mediated signaling, which is inhibited by 4-HNE and following primary exposure. *Atherosclerosis.* **165** (2002) 79.
36. Drake, T. A., Hannani, K., Fei, H., Lavi, S., Berliner, J. A Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am. J. Path.* **138** (1991) 601-607.
37. Eck, L., Perkins, N. D., Carr, D. P., Nabel, G. J. Inhibition of phorbol ester-induced cellular adhesion by competitive binding of NF-kappa B in vivo. *Mol Cell Biol.* **10** (1993) 6530-6536.
38. Edgington, T. S. More cellular signals for atherogenesis? *Circulation* **98** (1998) 1151-1152.
39. Edgington, T. S. So what is critically lacking with coronary atherosclerotic plaques? Perhaps the antithrombotic control. *Am. J. Pathol.* **159** (2001) 795-796.

40. Engelmann, B., Zieseniss, S., Brand, K., Page, S., Lentschat, A., Ulmer, A. J., Gerlach, E. Tissue factor expression of human monocytes is suppressed by lysophosphatidylcholine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19** (1999) 47-53.
41. Esterbauer, H., Jurgens, G., Quehenberger, O., Koller, E. Autoxidation of human low density lipoprotein loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J. Lipid. Res.* **28** (1987) 495-509.
42. Ferns, G. A., Raines, E. W., Sprugel, K. H., Motani, A. S., Reidy, M. A., Ross, R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* **253** (1991) 1129-1132.
43. Fong, L. G., Fong, T. A. T., Cooper, A. D. Inhibition of lipopolysaccharide -induced interleukin-1 β mRNA expression in mouse macrophages by oxidised low density lipoprotein. *J. Lipid. Res.* **32** (1991) 1899-1910.
44. Gawaz, M., Neumann, F. -J., Dickfeld, T., Koch, W., Laugwitz, K. -L., Adelsberger, H., Langenbrink, K., Page, S., Neumeier, D., Schömig, A., Brand, K. Activated platelets induce secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* **98** (1998) 1164-1171.
45. Goldberg, A. L. Functions of the proteasome lysis at the end of the tunnel. *Science* **268** (1995) 522-523.
46. Ghosh, S. Regulation of inducible gene expression by the transcription factor NF-kappaB. *Immunol. Res.* **19** (1999) 183-189
47. Gown, A. M., Tsukada, T. and Ross, R. Human atherosclerosis. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.* **125** (1986) 191–207.

48. Grimbrone, M. A. Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces and atherogenesis. *Am. J. Pathol.* **155** (1999) 1–5.
49. Gyurko, G, Szabo, M. Experimental investigations of the role of hemodynamic factors in formation of intimal changes. *Surgery.* **66** (1969) 871–874.
50. Haas, M., Page, S., Page, M., Neumann, F. -J., Marx, N., Adam, M., Ziegler-Heitbrock, H. W. L., Neumeier, D., Brand, K. Effect of proteasome inhibitors on monocytic I κ B- α and - β depletion, NF- κ B activation and cytokine production. *J. Leuc. Biol.* **63** (1998) 395-404.
51. Hamilton, T. A., Ma, G., Chisholm, G. M. Oxidised low density lipoprotein suppresses the expression of tumor necrosis factor- α mRNA in stimulated murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **144** (1990) 2343-2350.
52. Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Krönke, M., Ben-Neriah, Y., Baeuerle, P. A. Rapid proteolysis of I κ B- α is necessary for activation of transcription factor NF- κ B. *Nature* **365** (1993) 182-185.
53. Hilt, W., Wolf, D. H. Proteasomes destruction as a programme. *TIBS* **21** (1996) 96-102.
54. Israel, A. The IKK complex an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends. Cell. Biol.* **4** (2000) 129-133.
55. Imparato, A. M., Lord, J. W. Jr., Texon M., Helpert, M. Experimental atherosclerosis produced by alteration of blood vessel configuration. *Surg. Forum.* **12** (1961) 245–247.
56. Johnson, D. R., Douglas, I., Jahnke, A., Ghosh, S., Poher, J. A sustained reduction in I κ B- β may contribute to persistent NF- κ B activation in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 16317-16322.

57. Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Neumann, H., Wekerle, H., Baeuerle, P. A. Constitutive NF- κ B activity in neurons. *Mol. Cell. Biol.* **14** (1994) 3981-3992.
58. Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Lannes-Vieira, J., Kreutzberg, G. W., Wekerle H., Baeuerle, P. A., Gehrmann, J. Transcription factor NF- κ B is activated in microglia during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **55** (1994) 99-106.
59. Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Henke, T., Stockinger, H., Baeuerle, P. A. Selective recognition of the activated form of transcription factor NF- κ B by a monoclonal antibody. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376** (1995) 9-16.
60. Kalra, V. K. Y. Ying, K., Deemer, R., Natarajan, J., Nadler, L., Coates, T. D. Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J. Cell Physiol.* **160** (1994) 154-162.
61. Karin, M., Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination. The control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18** (2000) 621-663.
62. Kilburn, K. H., McKenzie, W. Leukocyte recruitment to airways by cigarette smoke and particle phase in contrast to cytotoxicity of vapor. *Science (Wash. DC)* **189** (1975) 634-637.
63. Kita, T., Yokode, M., Arai, H., Iiyama, M., Ueda, Y., Ueyama, K., Narumiya, S. Cigarette smoke, LDL and cholesteryl ester accumulation in macrophages. Implications for atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* (1993) **686** 91-96.
64. Klut, M. E., Doerschuk, C. M., Van Eeden, S. F., Burns, A. R., Hogg, J. C. Activation of neutrophils within pulmonary microvessels of rabbits exposed to cigarette smoke. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **9** (1993) 82-89.

65. Knippers, R.
RNA-Polymerasen und die Grundlagen der Transkription von eukaryonten Genen.
In „Molekulare Genetik“
Knippers R. (Hrgs.) Georg Thieme Verlag,
Stuttgart-New York, 1997, 7. Auflage 299-328.
66. Knippers, R.
Regulation proteincodierender Gene.
In „Molekulare Genetik“
Knippers R. (Hrgs.) Georg Thieme Verlag,
Stuttgart-New York, 1997, 7. Auflage, 329-378.
67. Kranzhöfer, R., Browatzki, M., Schmidt, J., Kubler, W. Angiotensin-II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257** (1999) 826-828.
68. Kou, C. C., Grayston, J. T., Cambell, L. A., Goo, Y. A., Wissler, R. W., Benditt, E. P. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92** (1995) 6911-6114.
69. Lee, F. S., Hagler, J., Chen, Z. J., Maniatis, T. Activation of the I κ B α kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* **88** (1997) 213-222.
70. Lehr, H. A. Adhesion-promoting effects of cigarette smoke on leukocytes and endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci.* **686** (1993) 112-118.
71. Lehr, H. A., Frei, B., Arfors, K. E. Vitamin C prevents cigarette smoke-induced leukocyte aggregation and adhesion to endothelium in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91** (1994) 7688-7692.
72. Lehr, H. A., Kirkpatrick, C. J. Atherosclerosis-progression by nonspecific activation of the immune system. *Med. Klin.* **97** (2002) 229-235.

73. Lehr, H. A. E., Kress, M. D., Menger, H. P., Friedl, C., Huebner, K., Arfors, E., Messmer, K. Cigarette smoke elicits leukocyte adhesion to endothelium in hamsters inhibition by CuZn-SOD. *Free Radical Biol. Med.* **14** (1993) 573-581.
74. Levey, A. I., Bolam, J. P., Rye, D. B., Hallanger, A. E., Demuth, R. M., Mesulam, M. - M., Wainer, B. H. A light and electron microscopic procedure for sequential double antigen localization using diaminobenzidine and benzidine dihydrochloride. *J. Histochem. Cytochem.* **34** (1986) 1449-1457.
75. Li, J., Brasier, A. R. Angiotensinogen gene activation by angiotensin-II is mediated by the relA (nuclear factor-kappaB p65) transcription factor one mechanism for the renin-angiotensin system positive feedback loop in hepatocytes. *Mol. Endocrinol.* **10** (1996) 252-264.
76. Libby, P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis inflammation, thrombosis and stabilisation. *Am. J. Cardiol.* **86** (2000) J3-8.
77. Libby, P., Ridker, P. M., Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* **105** (2002) 1135-1143.
78. Libby, P. Atherosclerosis the new view. *Sci. Am.* **286** (2002) 46-55.
79. Libby, P., Aikawa, M. Vitamin C, collagen, and cracks in the plaque. *Circulation.* **105** (2002) 1396-1398.
80. Lin, M. C., Almus-Jacobs, F., and Chen, H. H. Shear stress induction of the tissue factor gene. *J. Clin. Invest.* **99** (1997) 737-744.
81. Lipton, B. A., Parthasarathy, S., Ord, V. A., Clinton, K., Libby, P., Rosenfeld, M. E. Components of the protein fraction of oxidized low density lipoprotein stimulate interleukin-1 alpha production by rabbit arterial macrophage-derived foam cells. *J. Lipid Res.* **36** (1995) 2232-2242.

82. Mackman, N., Brand, K., Edgington, T. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor κ B binding sites. *J. Exp. Med.* **174** (1991) 1517-1526.
83. Maziere, C., Auclair, M., Djavaheri-Mergny, M., Packer, L., Maziere, J. C. Oxidized low density lipoprotein induces activation of the transcription factor NF kappa B in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells *Biochem Mol. Biol. Int.* **39** (1996) 1201-1207.
84. Marx, J. How the glucocorticoids suppress immunity. *Science.* **270** (1995) 232-233.
85. May, M. J., D'Acquisto, F., Madge, L. A., Glockner, J., Pober, J. S., Ghosh, S. Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science.* **289** (2000) 1550-1554.
86. Meiners, S., Laule, M., Rother, W., Guenther, C., Prauka, I., Muschick, P., Baumann, G., Kloetzel, P. M., Stangl, K. Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. *Circulation.* **105** (2002) 483-489.
87. Mitchell, P. J., Tjian, R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245** (1989) 371-378.
88. Mohan, S., Mohan, N., Sprague, E. A. Differential activation of NF-kappa B in human aortic endothelial cells conditioned to specific flow environments. *Am. J. Physiol.* **273** (1997) C572-578.
89. Munro, J. M., Cotran, R. The pathogenesis of atherosclerosis atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* **58** (1988) 249-261.

90. Nagel, T., Resnik, N., Dewey, C. F., Grimborne, M. A. Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* **19** (1999) 1825-1834.
91. Neumann, F. -J., Marx, N., Gawaz, M., Brand, K., Ott, I., Rokitta, C., Sticherling, C., Meinl, C., May, A., Schömig, A. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* **95** (1997) 2387-2394.
92. Neurath, M. F., Pettersson, S., Meyer zum Büschenfelde, K. -H., Strober, W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B abrogates established experimental colitis in mice. *Nature Medicine* **2** (1996) 998-1003.
93. Niki, E., Minamisawa, S., Oikawa, M., Komuro, E. Membrane damage from lipid oxidation induced by free radicals and cigarette smoke. *Ann N Y Acad Sci.* **686** (1993) 29-37.
94. Nishikawa, M., Kakemizu, N., Ito, T., Kudo, M., Kaneko, T., Suzuki, M., Udaka, N., Ikeda, H., Okubo, T. Superoxide mediates cigarette smoke-induced infiltration of neutrophils into the airways through nuclear factor-kappaB activation and IL-8 mRNA expression in guinea pigs in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2** (1999) 189-198.
95. Nordheim, A.
Genregulation bei Eukaryonten.
In „Lehrbuch der Genetik“
Seyffert, W., Gassen, H. G., Hess, O., Jäckle, H., Fischbach, K. F. (Hrsg.)
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck Ulm, 1998, 1. Auflage 200-217.
96. Ohlsson, B. G., Englund, M. C., Karlsson, A. L., Knutsen, E., Erixon, C., Skribeck, H., Liu, Y., Bondjers, G., Wiklund, O. Oxidized low density lipoprotein inhibits lipopolysaccharide-induced binding of nuclear factor-kappa B to DNA and the subsequent expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in macrophages. *J. Clin. Invest.* **98** (1996) 78-89.

97. Orian, A., Whiteside, S., Israel, A., Stancovski, I., Schwartz, A. L., Ciechanover, A. Ubiquitin-mediated processing of NF-kappa B transcriptional activator precursor p105. Reconstitution of a cell-free system and identification of the ubiquitin-carrierprotein, E2, and a novel ubiquitin-proteinligase E3, involved in conjugation. *J Biol. Chem.* **270** (1995) 21707-21714.
98. Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L., Maniatis, T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* **78** (1994) 773-785.
99. Page, S., Fischer, C., Baumgartner, B., Haas, M., Kreusel, U., Loidl, G., Hayn, M., Ziegler-Heitbrock, H. W., Neumeier, D., Brand, K. 4-Hydroxynonenal prevents NF-kappaB activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting IkappaB phosphorylation and subsequent proteolysis. *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 11611-11618.
100. Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors *Oncogene* **18** (1999) 6853-66.
101. Parhami, F., Fang, Z. T., Fogelman, A. M., Andalibi, A., Territo, M. C., Berliner, J. A. Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *J. Clin. Invest* **92** (1993) 471-478.
102. Pueyo, M. E.,Gonzalaz, W., Nicoletti, A., Savoje, F., Arnal, J. F., Michel, J. B. Angiotensin-II endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20** (2000) 645-651.
103. Perkins, N. D., Schmid, R. M., Duckett, C. S., Leung, K., Rice, N. R., Nabel, G. J. Distinct combinations of NF- κ B subunits determine the specificity of transcriptional activation. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992) 1529-1533.

104. Poligone, B., Baldwin, A. S. Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2 roles of different prostaglandins. *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 38658-38664.
105. Prebeck, S., Kirschning, C., Durr, S., da Costa, C., Donath, B., Brand, K., Redecke, V., Wagner, H., Miethke, T. Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in Chlamydia pneumoniae-induced activation of dendritic cells. *J. Immunol.* **167** (2001) 3316-3323.
106. Pryor, W. A., Stone, K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate, and peroxynitrite. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **686** (1993) 12-27.
107. Qwarnström, E. E., Ostberg, C. O., Turk, G. L., Richardson, C. A., Bomsztyk, K. Fibronectin attachment activates the NF- κ B p50/p65 heterodimer in fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 30765-30768.
108. Rajavashisth, T. B., Yamada, H., Mishra, N. K. Transcriptional activation of the macrophage-colony stimulating factor gene by minimally modified LDL. Involvement of nuclear factor-kappa B. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15** (1995) 1591-1598.
109. Régnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z., Rothe, M. (1997) Identification and characterization of an I κ B kinase. *Cell* **90** 373-383.
110. Reuning, U., Wilhelm, O., Nishiguchi, T., Guerrini, L., Blasi, F., Graeff, H., Schmitt, M. Inhibition of NF-kappaB-Rel. A expression by antisense oligodeoxynucleotides suppresses synthesis of urokinase-type plasminogen activator (uPA) but not its inhibitor PAI-1. *Nucl. Acids Res.* **23** (1995) 3887-3893.
111. Rivett, A. J. Proteasomes multicatalytic proteinase complexes. *Biochem. J.* **291** (1993) 1-10.
112. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis a perspective for the 1990s. *Nature* **362** (1993) 801-809.

113. Ross, R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med* **340** (1999) 115-126.
114. Scheinman, R. I., Cogswell, P. C., Lofquist, A. K., Baldwin, A. S. Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*. **270** (1995) 283-286.
115. Schmidt, A.M., Hori, O., Brett, J., Yan, S.D., Wautier, J.L., Stern, D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler. Thromb.* **10** (1994) 1521-1528.
116. Schmitt, M., Harbeck, N., Thomssen, C., Wilhelm, O., Magdolen, V., Reuning, U., Ulm, K., Höfler, H., Jänicke, F., Graeff, H. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb. Haemost.* **78** (1997) 285-296.
117. Schreck, R., Rieber, P., Baeuerle, P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **10** (1991) 2247-2258.
118. Schwamborn, K., Weil, R., Courtois, G., Whiteside, S. T., Israel, A. Phorbol esters and cytokines regulate the expression of the NEMO-related protein, a molecule involved in a NF-kappa B-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 22780-22789.
119. Shapiro, D. J., Sharp, P. A., Wahli, W. W., Keller, M. J. Laboratory methods. A high-efficiency HeLa cell nuclear transcription extract. *DNA* **7** (1988) 47-55.
120. Scheidereit, C. Signal transduction. Docking IkappaB kinases. *Nature* **395** (1998) 225-226.

121. Shen, Y., Rattan, V., Sultana, C., Kalra, V. K. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression transendothelial migration of monocytes. *Am. J. Physiol.* **39** (1996) H124-1633.
122. Siebenlist, U., Franzoso, G., Brown, K. Structure, regulation function of NF- κ B. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10** (1994) 405-455.
123. Sousa, M. M., Yan, D., Stern, D., Saraiva, M. J. Interaction of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) with transthyretin triggers nuclear transcription factor κ B (NF- κ B)-activation. *Lab. Invest.* **80** (2000) 1101-1110.
124. Stein, Y., Harats, D., Stein, O. Why is smoking a major risk factor for coronary heart disease in hyperlipidemic subjects? *Ann N Y Acad Sci.* **686** (1993) 66-69.
125. Steinberg, D. LDL Oxidation. Low density lipoprotein oxidation its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 20963-20966.
126. Suvi-Sirku, E., Kaukoranta, T., Teppo, A. M., Laitinen, K., Saikku, P., Linnavuori, K., Leinonen, M. Growth of *Chlamydia pneumoniae* in cultured human peripheral blood mononuclear cells induction of a cytokine response. *Microbial. Pathogenesis* **21** (1996) 215-221.
127. Taylor-Robinson, D. *Chlamydia pneumoniae* in vascular tissue. *Artherosclerosis* **140** (1998) Sup. 1 S21-24.
128. Terkeltaub, R., Boisvert, W. A., Curtiss, L. K. Chemokines atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **9** (1998) 397-405.
129. Terkeltaub, R., Banca, C. L., Solan, J., Santoro, D., Brand, K., Curtiss, L. K. Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity. *Arterioscler. Thromb.* **14** (1994) 47-53.

130. Texon, M. A. Hemodynamic concept of atherosclerosis, with particular reference to coronary occlusion. *Arch Intern Med.* **99** (1957) 418–427.
131. Thai, F., Lewis, J. G., Williams, R. B., Johnson, P., Adams, D. O. Effects of oxidized LDL on mononuclear phagocytes inhibition of induction of four inflammatory cytokine gene RNAs, release of NO, cytolysis of tumor cells. *J. Leukoc. Biol.* **57** (1995) 427-433.
132. Thanos, D., Maniatis, T. NF- κ B a lesson in family values. *Cell* **80** (1995) 529-532.
133. Tiran, A., Gruber, H. J., Graier, W. F., Wagner, A. H., Van Leeuwen, E. B., Tiran, B. Aspirin inhibits Chlamydia pneumoniae-induced nuclear factor-kappa B activation, cytokine expression, and bacterial development in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22** (2002) 1075-80.
134. Traeckner, E.-B.-M., Wilk, S., Baeuerle, P. A. A proteasome inhibitor prevents activation of NF- κ B stabilizes a newly phosphorylated form of I κ B- α that is still bound to NF- κ B. *EMBO J.* **13** (1994) 5433-5441.
135. Tran, K., Merika, M., Thanos, D. Distinct functional properties of I κ B α and I κ B β . *Mol Cell Biol.* (1997) 5386-5399.
136. Van Antwerpen, L., Theron, A. J., Myer, M. S., Richards, G. A., Wolmarans, L., Booyesen, U., van der Merwe, C. A., Sluis-Cremer, G. K., Anderson, R. Cigarette smoke-mediated oxidant stress, phagocytes, vitamin C, vitamin E, and tissue injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **686** (1993) 53-65.
137. Wahl, C., Oswald, F., Simnacher, U., Weiss, S., Marre, R., Essig, A. Survival of Chlamydia pneumoniae-infected Mono Mac 6 cells is dependent on NF-kappaB binding activity. *Infect. Immun.* **11** (2001) 7039-7045.
138. Wautier, J. L., Wautier, M. P., Schmidt, A. M., Anderson, G. M., Hori, O., Zoukourian, C., Capron, L., Chappey, O., Yan, S. D., Brett, J., et al. Advanced glycation end

products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **91** (1994) 7742-7746.

139. Weber, C., Erl, W., Weber, K., Weber, P. C. Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers. *Circulation* **93** (1996) 1488-1492.
140. Whiteside, T., Israel, A. I κ B proteins structure, function and regulation. *Sem. Cancer Biol.* **8** (1997) 75-82.
141. Wilcox, J. N., Smith, K. M., Schwartz, M., Gordon, D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 2839-2843.
142. Witztum, J. L., Steinberg, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* **88** (1991) 1785-1792.
143. Wulczyn, F. G., Krappmann, D., Scheidereit, C. The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families mediators of immune response and inflammation. *J. Mol. Med.* **74** (1996) 749-769.
144. Yin, M. J., Yamamoto, Y., Gaynor, R. B. The anti-inflammatory agent's aspirin and salicylate inhibit the activity of I (kappa) B kinase-beta. *Nature* **396** (1998) 77-80.
145. Zand, T., Majno, G., Nunnari, J. J., Hoffman, A. H., Savelonis, B. J., MacWilliams, B., Joris, I. Lipid deposition and intimal stress and strain. A study in rats with aortic stenosis. *Am. J. Pathol.* **139** (1991) 101-113.

146. Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., Karin, M. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell* **91** (1997) 243-252.
147. Zebrack, J. S., Anderson, J. L. The role of inflammation and infection in the pathogenesis and evolution of coronary artery disease. *Curr. Cardiol. Rep.* **4** (2002) 278-88.
148. Ziegler-Heitbrock, H. W. L., Sternsdorf, T., Liese, J., Belohradsky, B., Weber, C., Wedel, A., Schreck, R., Baeuerle, P. A., Ströbel, M. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits NF- κ B mobilization and TNF production in human monocytes. *J. Immunol.* **151** (1993) 6986-6993.