

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier)

DYSREGULATION VON NF- κ B BEI ARTERIOSKLEROSE

Caroline Nothdurfter

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. apl.Prof. Dr. K. Brand
2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 03.09.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 17.11.2004 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 NF- κ B/Rel-Transkriptionsfaktoren	4
1.2 Regulation des NF- κ B-Systems durch den IKK-Komplex	6
1.3 Arteriosklerose, eine chronisch entzündliche Gefäßerkrankung	8
1.4 Rolle von NF- κ B bei Arteriosklerose	9
1.5 Aktivierung von NF- κ B durch Thrombozyten im Endothel	10
1.6 Testung des Effekts verschiedener Arteriosklerose-relevanter Substanzen auf das NF- κ B-System	10
1.7 Das ApoE ^{-/-} -Maus-Modell	12
1.8 Fragestellung	12
2. Material und Methodik	14
2.1 Material	14
2.1.1 Antikörper	14
2.1.2 Reagenzien	14
2.1.3 Plasmide	15
2.2 Methodik	16
2.2.1 Zellkultur	16
2.2.2 Endotoxintest	17
2.2.3 Zytotoxizitätstest (WST)	17
2.2.4 Isolierung zytosolischer und nukleärer Extrakte	17
2.2.5 Präparation von Gewebeproben	18
2.2.6 Thrombozytenpräparation	19
2.2.7 Transfektion und Überexpression	19
2.2.8 Gelretardierungsassay	20
2.2.9 Western Blot-Analyse	21
2.2.10 Immunpräzipitation und Kinaseassay	22
2.2.11 Statistische Auswertung	23

3. Ergebnisse	24
3.1 Effekt von Thrombozyten auf das NF-κB-System	24
3.1.1 Aktivierung von NF- κ B durch aktivierte Thrombozyten	24
3.1.2 Proteolyse von I κ B nach Inkubation mit Thrombozyten, IL-1 β und TNF	25
3.1.3 Aktivierung des IKK-Komplexes durch aktivierte Thrombozyten, IL-1 β und TNF	28
3.1.4 Die Rolle von IKK- β und NIK bei Thrombozyten-induzierter NF- κ B-Aktivierung	31
3.2 Testung weiterer Substanzen mit Bezug zur Arteriosklerose	34
3.2.1 Nikotin	34
3.2.2 Nandrolon	36
3.2.3 Rapamycin	38
3.3 Aktivierungsstatus von NF-κB in der ApoE^{-/-}-Maus	40
3.3.1 Aktivierung von NF- κ B in <i>Aorta</i> und <i>A. carotis</i>	40
3.3.2 NF- κ B-Aktivierung in der ApoE ^{-/-} -Maus im Zeitverlauf	43
4. Diskussion	45
4.1 Aktivierung des NF- κ B-Systems durch Thrombozyten	45
4.2 Effekt von Nikotin, Nandrolon und Rapamycin auf das NF- κ B-System	48
4.3 Aktivierungsstatus von NF- κ B <i>in vivo</i> bei Arteriosklerose	51
4.4 Dysregulation von NF- κ B bei Arteriosklerose	52
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis	58
7. Anhang	69
1.1 Abkürzungen	69
7.2 Publikationen und Kongressbeiträge	73
7.3 Danksagung	74

1. Einleitung

1.1 NF- κ B/Rel-Transkriptionsfaktoren

NF- κ B-Transkriptionsfaktoren spielen eine zentrale Rolle bei entzündlichen und immunologischen Prozessen sowie bei Proliferation, Differenzierung und Apoptose (2,138). Es handelt sich hierbei um regulatorische Proteine, die aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt sind, die entweder in homo- oder heterodimerischer Form vorliegen. Der prototypische Komplex besteht aus den Untereinheiten p50 und p65 (RelA). Es existieren jedoch noch weitere Untereinheiten wie etwa c-Rel, p52, RelB, sowie zwei Vorläuferproteine, p105 (für p50) und p100 (für p52) (125,138). Gemeinsam ist allen diesen Proteinen eine spezielle Region, die Rel-Homologie-Domäne (RHD) (15).

Im nicht aktivierten Zustand liegt NF- κ B im Zytoplasma an spezifische Inhibitorproteine gebunden vor, die sog. I κ B-Proteine (2,125,133,138). Am längsten bekannt ist I κ B- α (2), es existieren jedoch noch weitere Inhibitorproteine wie I κ B- β und I κ B- ε (2,84,133). Charakteristisch ist für alle I κ B-Proteine ein Abschnitt mit mehreren repetitiven Ankyrin-Motiven (ARD, „ankyrin repeat domain“) (2,15). Auch die Vorläuferproteine p105 (I κ B- γ) und p100 (I κ B- δ) weisen in ihrem C-terminalen Abschnitt derartige Motive auf (15).

NF- κ B wird durch eine Reihe von Stimuli aktiviert, darunter Zytokine, bakterielle und virale Produkte oder oxidativer Stress (2,138) (Abb.1). Aufgrund eines Stimulus kommt es zunächst zur Phosphorylierung der Inhibitorproteine I κ B an spezifischen N-terminalen Serinresten (2,133), daraufhin zur Polyubiquitinierung und schließlich zum proteolytischen Abbau durch das Proteasom, einem multikatalytischen Proteasekomplex (125,138). Befreit vom Inhibitor kann das aktivierte NF- κ B nun in den Zellkern wandern, wo es an regulatorische κ B-Promoter- und Enhancer-Regionen bindet und so für die Transkription zahlreicher Zielgene verantwortlich ist. Hierzu zählen Zytokine, chemotaktische Substanzen, Zelladhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren, gerinnungsaktive Substanzen und immunmodulatorische Moleküle (4,138).

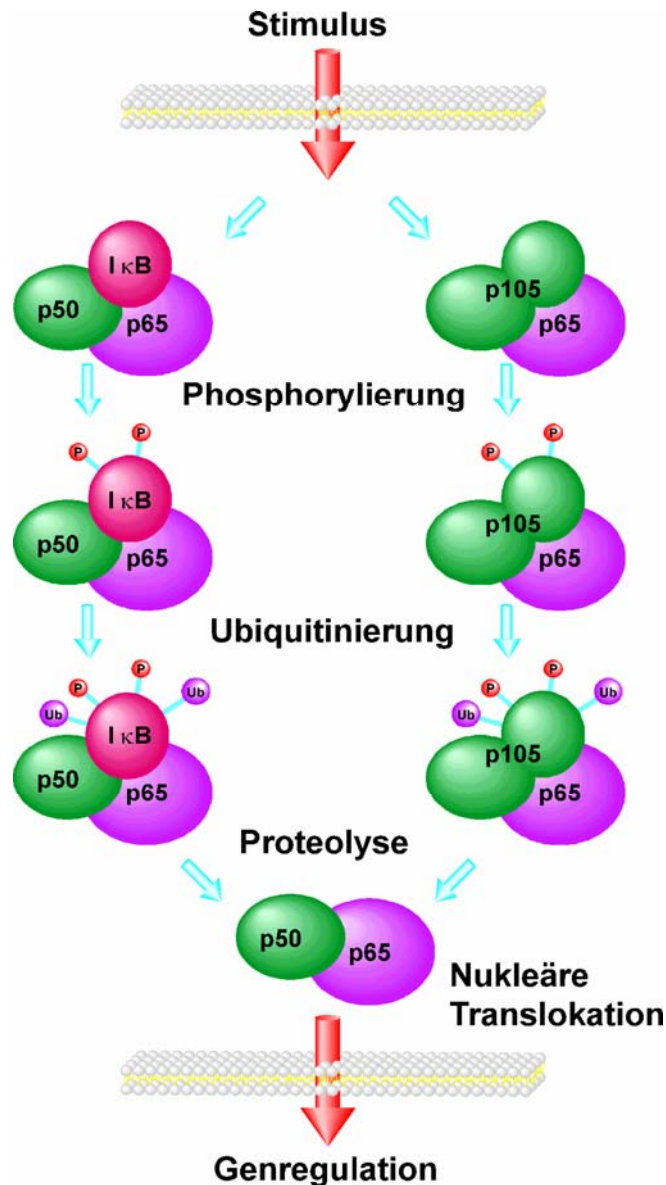


Abbildung 1. Die Aktivierung von NF-κB. Durch einen Stimulus der Zelle kommt es zur Phosphorylierung und Ubiquitinmarkierung von IκB, sowie p105/p100. Dieser Vorgang ist das Signal zur Proteolyse der IκB-Proteine. Der nun vom Inhibitor befreite und damit aktivierte NF-κB-Komplex kann nun in den Zellkern übertreten, um dort an regulatorische κB-Promoter- und Enhancer-Elemente verschiedener Zielgene zu binden und so deren Transkription zu beeinflussen.

1.2 Regulation des NF- κ B-Systems durch den IKK-Komplex

Obwohl verschiedene Stimuli das NF- κ B-System durch unterschiedliche Rezeptoren und Signaltransduktionswege aktivieren (2,88,133), kommt es doch schließlich in den meisten Fällen zur Serin-Phosphorylierung von I κ B. Für diese Phosphorylierung von I κ B wird ein hochmolekulares Kinasesystem verantwortlich gemacht, welches als I κ B-Kinase-Komplex (IKK-Komplex) bezeichnet wird (57,61,84,114) (Abb.2). Der „klassische Komplex“ besteht aus den beiden Kinasen IKK- α (85 kDa) und IKK- β (87 kDa) und dem Adapterprotein IKK- γ (50 und 52 kDa), die im Zytosol als hochmolekulare Komplexe vermutlich in hetero- oder homodimerischer Form vorliegen (57,61,84,114). Die beiden kinaseaktiven Bestandteile IKK- α und IKK- β weisen sehr ähnliche Strukturen auf und besitzen eine N-terminale Kinasedomäne (KD) und ein C-terminales Helix-Loop-Helix-Motiv (HLH), welches die KD-Aktivität moduliert und an der Interaktion mit IKK- γ beteiligt ist. Für die Bindung der IKK- α -IKK- β -Heterodimere wird eine weitere Struktur benötigt, nämlich der Leucin-Zipper (LZ), der sich zwischen der KD und dem HLH-Motiv befindet (28,122,137,140).

Es konnte gezeigt werden, dass vor allem IKK- β eine besondere Rolle sowohl bei der Aktivierung des IKK-Komplexes durch proinflammatorische Stimuli wie auch der anschließenden Inaktivierung zukommt (35,61). Die Bedeutung von IKK- α dagegen ist bis heute weniger klar; es wird vermutet, dass IKK- α eine wichtige Rolle spielt bei der Reifung von B-Lymphozyten sowie verschiedenen Differenzierungsvorgängen und proliferativen Prozessen der Haut (19,55,57,116). Einer weiteren Komponente des IKK-Komplexes, dem Adapterprotein IKK- γ , werden regulatorische Funktionen zugeschrieben (43,61,114,111).

Die Ursache für das relativ hohe und variable Molekulargewicht des IKK-Komplexes ist noch teilweise unklar. Eine Möglichkeit besteht darin, dass es zur Polymerisierung der genannten Bestandteile im Komplex kommt. Ferner könnte es durch besondere strukturelle Eigenschaften oder die transiente Interaktion mit weiteren Proteinen erklärt werden (57,61,114). Auf diese Weise wurden eine Reihe von assoziierten Kinasen und Adapterproteinen gefunden, wie etwa NIK (NF- κ B-induzierende Kinase) (79,137,139), Act 1 (NF- κ B-Activator 1) (74) und CIKS („connection to IKK and SAPK/JNK“) (72). In einer neueren Studie wurden die Moleküle Cd37 („cell division molecule 37“) und Hsp90 (Hitzeschockprotein 90) gefunden, die im IKK-Komplex als zusätzlicher Bestandteil zu IKK- α , IKK- β und IKK- γ einen hochmolekularen Komplex bilden und direkt mit den Kinasedomänen von IKK- α und IKK- β interagieren könnten (20).

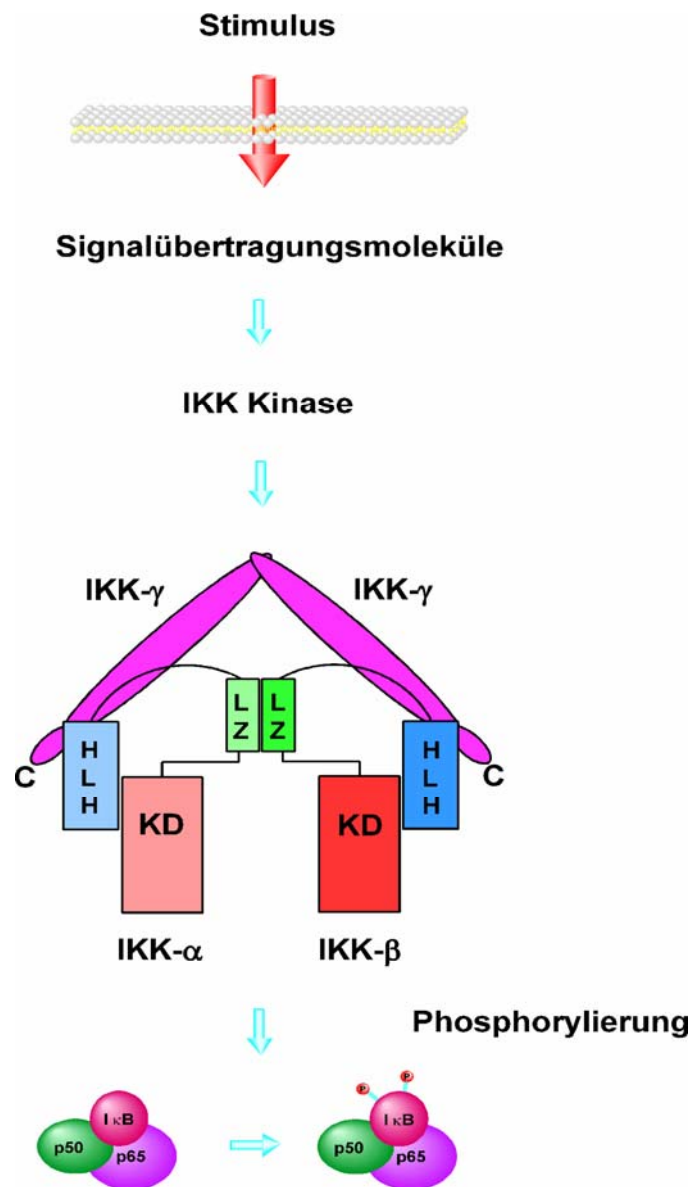


Abbildung 2. Die zentrale Rolle des IKK-Komplexes im NF-κB-Signalweg. Nach erfolgter Stimulation der Zelle kommt es durch IKK-Kinasen zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung des IKK-Komplexes. Der IKK-Komplex ist aus den beiden Untereinheiten IKK- α und IKK- β aufgebaut, die jeweils über eine Helix-Loop-Helix-Domäne (HLH), einen Leucin Zipper (LZ) und eine Kinasedomäne (KD) verfügen. Ein weiterer Bestandteil des IKK-Komplexes ist das Adapterprotein IKK- γ , welches an die beiden kinaseaktiven Komponenten IKK- α und IKK- β über seine C-terminale Region bindet. Der IKK-Komplex wird für die Phosphorylierung der I κ B-Proteine und damit letztlich für ihre Degradierung verantwortlich gemacht.

Ferner unzureichend geklärt sind Signalwege, die oberhalb des IKK-Komplexes angebunden sind (43,57,61). Für diese Verknüpfung spielt möglicherweise IKK- γ eine bedeutende Rolle, da verschiedene Stimuli (zumindest unter bestimmten Bedingungen) verschiedene Subregionen von IKK- γ für die Aktivierung des IKK-Komplexes benötigen (61,87,114). Außerdem wird das Vorkommen spezifischer IKK-Kinasen (IKKKs) postuliert, welche in der Lage sind die IKKs zu phosphorylieren und so zu aktivieren (57). Hierzu sollen NIK, Akt (Proteinkinase B), PKC (Proteinkinase C)-Isoformen, NAK (NF- κ B-aktivierende Kinase) und MEKK-1 („mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase1“) zählen (61,79,96,126). Möglicherweise existieren auch gewebespezifische I κ B-Kinasen, wie die Identifizierung eines Phorbol-ester-induzierbaren I κ B-Kinase-Komplexes, der IKK- ϵ enthält, sowie Experimente mit UV-Licht, nahe legen (8,101).

1.3 Arteriosklerose, eine chronisch entzündliche Gefäßerkrankung

Nach wie vor stellt die Arteriosklerose die wichtigste Ursache für die häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrieländern dar, nämlich koronare Herzerkrankung und akuter Myokardinfarkt, sowie zerebraler Insult (110). Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung von Arteriosklerose und deren Folgen zählen in erster Linie eine familiäre Disposition, höheres Lebensalter und das männliche Geschlecht (unbeeinflussbare Faktoren), aber auch Fettstoffwechselstörungen (Hypercholesterinämie), arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und das Zigarettenrauchen (beeinflussbare Faktoren). Des Weiteren sind noch untergeordnete und seltenere Risikofaktoren zu nennen wie etwa Hyperhomocysteinämie und erhöhte Werte von Lipoprotein(a) (47). In Anbetracht der weiten Verbreitung arteriosklerotischer Gefäßerkrankungen ist es von besonderer Bedeutung, die Mechanismen ihrer Entstehung besser verstehen zu lernen. Es sollen hier besonders inflammatorische Aspekte in der Pathogenese der Arteriosklerose betrachtet werden, die für das Gesamtkonzept der Arteriosklerose eine bedeutende Rolle spielen.

In frühen Stadien der Arteriosklerose kommt es zu einer Beeinträchtigung der Gefäßintegrität und einer Ablagerung verschiedener Substanzen (z.B. von Lipiden) in die vorgeschädigte Gefäßwand (9,22,136). Ferner können sich aktivierte Thrombozyten an die äußerlich noch intakte Gefäßwand anlagern und dort durch die Ausschüttung proinflammatorischer und vasoaktiver Substanzen einen Reizzustand der Gefäßwand mitverursachen (41). Dies führt zu einer Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen aus der

Gefäßwand selbst, welche dann Monozyten und Lymphozyten chemotaktisch anlocken. Die Transmigration dieser Entzündungszellen durch die Gefäßwand wird durch endotheliale Adhäsionsmoleküle gesteuert, die ebenfalls von aktivierten Zellen der Gefäßwand produziert werden. Die Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen, die oxidierte Lipoproteine aufnehmen und dann als „Schaumzellen“ bezeichnet werden. Die Einwanderung der Zellen in die glatte Muskulatur der Gefäßwand ist begleitet von der Produktion von Wachstumsfaktoren und extrazellulärer Matrix, was zu einer Verdickung der Gefäßintima führt (9,110). Im weiteren Verlauf kommt es zu einer deutlichen Beeinträchtigung zellulärer Funktionen (z.B. Reparations- und Immunmechanismen) und einem Fortschreiten der Läsion mit massiver Fibrosierung (und damit Gefäßlumeneinengung) und Atherombildung (110). Die gefürchtetste Komplikation in diesen fortgeschrittenen Stadien ist sicher die Plaqueruptur, welche die völlige Verlegung des Gefäßlumens und Thrombenbildung zur Folge hat: die pathophysiologischen Grundlagen für koronare Herzkrankheit, akuten Myokardinfarkt und zerebralen Insult (9,110).

1.4 Rolle von NF- κ B bei Arteriosklerose

Bereits seit mehreren Jahren wird vorgeschlagen, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B bei der Pathogenese der Arteriosklerose eine Rolle spielt und hier insbesondere bei den entzündungsähnlichen und proliferativen Prozessen dieser Erkrankung (9,22,41). Die Anwesenheit von aktiviertem NF- κ B kann *in situ* in der arteriosklerotischen Läsion nachgewiesen werden (12,16). Hierbei wird die aktivierte Form von NF- κ B vor allem in Monozyten und Makrophagen, sowie glatten Muskelzellen gefunden. In früheren Stadien der Arteriosklerose lässt sich aktiviertes NF- κ B auch in Endothelzellen im Bereich arteriosklerotischer Läsionen nachweisen. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass sich in der Läsion zahlreiche Moleküle befinden, welche zumindest *in vitro* das NF- κ B-System in den entscheidenden Zellen, die an der Pathogenese der Arteriosklerose beteiligt sind, aktivieren können. Hierzu zählen Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1 (IL-1), aktivierte Thrombozyten, Wachstumsfaktoren, bakterielle und virale Produkte, geringgradig oxidiertes LDL (oxLDL), Thrombin und Fibronectin (14,39,97,138). Durch diese Substanzen wird die Chemotaxis von Monozyten und Lymphozyten gesteuert, deren Transmigration wiederum durch spezifische NF- κ B-regulierte endotheliale Adhäsionsmoleküle gesteuert wird. Auch in späteren Stadien der Arteriosklerose wird eine Bedeutung von NF- κ B vermutet, z.B. bei der

Produktion von Wachstumsfaktoren, Proteasen und prokoagulatorischen Proteinen sowie Apoptose (2,110,138).

1.5 Aktivierung von NF- κ B durch Thrombozyten im Endothel

Thrombozyten spielen sowohl bei der Initiierung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen als auch bei fortgeschrittenen Prozessen der Arteriosklerose eine bedeutende Rolle (113,132). Entscheidend ist die Tatsache, dass Thrombozyten unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind *in vitro* wie auch *in vivo* an das intakte Endothel zu adhären (40,86). Während dieses Adhäsionsvorgangs setzen die Thrombozyten bestimmte Substanzen frei, wie z.B. IL-1 β oder CD40-L (cluster of differentiation40-Ligand) (38,46,80). Es wird postuliert, dass diese Substanzen wiederum die Endothelzellen über NF- κ B- oder MAP-Kinase p38-vermittelte Signalwege zur Sekretion chemotaktischer Faktoren wie z.B. MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) und zur Expression von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche führen, z.B. ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) und VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecule-1) (27,39). In dieser Arbeit sollte der Effekt von aktivierten Thrombozyten auf den NF- κ B-Signalweg und insbesondere auf den IKK-Komplex weiter charakterisiert werden.

1.6 Testung des Effekts verschiedener Arteriosklerose-relevanter Substanzen auf das NF- κ B-System

Da das Zigarettenrauchen mit einer deutlich erhöhten Inzidenz von arteriosklerotischen Gefäßveränderungen und deren Folgen korreliert, zählt es zu den wichtigsten Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen (18). In welcher Weise das Zigarettenrauchen jedoch Einfluß auf das menschliche Gefäßsystem nimmt ist noch nicht endgültig geklärt. Der Rauch einer Zigarette besteht aus etwa 4000 verschiedenen Bestandteilen (103,112), so dass eine komplexe Genese arteriosklerotischer Gefäßveränderungen durch das Zigarettenrauchen angenommen werden muß. Ein besonders wichtiger Bestandteile ist das Nikotin, welches auch maßgeblich für das Suchtpotential des Zigarettenrauchens verantwortlich zu machen ist (109). Im Hinblick auf die besondere Bedeutung des Nikotins wurde in dieser Arbeit auf dessen Auswirkungen auf das NF- κ B-System in der Endothelzelle näher eingegangen.

Ein weiterer Faktor, der entscheidend auf die Gefäßintegrität Einfluß nimmt, ist der Hormonhaushalt (58,118). Insbesondere Sexualhormone scheinen hier eine nicht unbedeutende Rolle zu spielen: Es konnte gezeigt werden, dass Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter weniger häufig an Arteriosklerose und deren Folgen leiden als gleichaltrige Männer (52,58,118). Erst nach der Menopause gleicht sich das Verhältnis Männer zu Frauen bezüglich der Inzidenz an arteriosklerotischen Gefäßveränderungen weitgehend aus (52). Auf diese Weise wurde angenommen, dass weibliche Sexualhormone (Estrogene) einen protektiven Effekt auf das Gefäßsystem zu haben könnten. Diese Annahme konnte tatsächlich bestätigt werden, speziell im Hinblick auf einen immunmodulatorischen Effekt auf das NF- κ B-System in Endothelzellen (118) und Cardiomyocyten (99,100). Im klinischen Alltag werden Estrogene deswegen nicht nur zur Prophylaxe der Osteoporose eingesetzt (107), sondern auch wegen ihres auf verschiedenen Ebenen wirkenden protektiven Effekts auf das Gefäßsystem (34,54). Da in unserer heutigen Gesellschaft Fitness und Gesundheitsbewusstsein eine sehr große Rolle spielen, wollten wir näher untersuchen, ob die in Sportlerkreisen missbräuchlich verwendeten anabolen Steroide einen Einfluß auf das NF- κ B-System in der Endothelzelle haben. Nandrolon, einer der bekanntesten Vertreter anaboler Steroide, stellt bekanntermaßen einen Risikofaktor für die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen dar. In Studien konnte bereits mehrfach belegt werden, dass die Inzidenz Arteriosklerose-assoziiierter Erkrankungen bei Personen, die regelmäßig anabole Steroide konsumieren, erhöht ist (90).

Rapamycin ist ein Immunsuppressivum, das besonders in der Kardiologie bei der interventionellen Behandlung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen erprobt wird (98). Im Rahmen dieser Behandlung werden bei Patienten mit KHK durch perkutane transluminare Koronarangioplastie Stents in die Herzkranzarterien eingebracht, die mit Rapamycin beschichtet sind. Dadurch erhofft man sich ein geringeres Auftreten der Hauptkomplikation dieses Eingriffs, nämlich dem erneuten Auftreten koronarer Stenosen (Restenose) (89,119). Die Tatsache, dass Rapamycin einen günstigen Effekt auf das arterielle System im Sinne einer Proliferationshemmung nach Eingriffen an arteriosklerotisch veränderten Gefäßen zu haben scheint, legt die Frage nahe, ob Rapamycin auch für die Prophylaxe der Entstehung solcher Gefäßveränderungen geeignet sein könnte. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob Rapamycin in der Lage ist, das NF- κ B-System in der Endothelzelle zu modulieren

1.7 Das ApoE^{-/-}-Maus-Modell

Um das Verständnis komplexer Vorgänge wie Arteriosklerose zu erweitern, wurden experimentelle Tiermodelle entwickelt, die mit arteriosklerotischen Prozessen beim Menschen vergleichbar sind und helfen sollen diese besser zu verstehen. Die Entwicklung sogenannter „transgener Mäuse“ hat hierbei zu einer wesentlichen Erweiterung der experimentellen Möglichkeiten geführt. In der vorliegenden Arbeit wurden ApoE-defiziente Mäuse (C57/BL6) verwendet, derzeit eines der Standardmodelle in der Arterioskleroseforschung (31,53). Aufgrund ihres genetisch determinierten ApoE-Mangels entwickeln diese Mäuse sowohl frühe Typ I-Läsionen (mikroskopisch und chemisch nachweisbare Lipidablagerungen) als auch späte Typ II-Läsionen im Sinne von intrazellulären Lipidablagerungen („fatty streaks“) (53,134). Diese Mäuse wurden mit einer Cholesterin-reichen „westlichen Diät“ gefüttert, um die Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen zu beschleunigen. Nach bestimmten festgelegten Zeitpunkten wurden die Tiere dann geopfert und Teile ihres arteriellen Gefäßsystems, die als anfällig für das Auftreten arteriosklerotischer Veränderungen gelten, im Hinblick auf das NF-κB-System genauer untersucht.

1.8 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung verschiedener Substanzen mit Bezug zur Arteriosklerose auf das NF-κB-System genauer zu untersuchen und den Aktivierungsstatus von NF-κB in einem geeigneten In vivo-Modell für Arteriosklerose darzustellen.

- Schwerpunktmäßig wurde der Effekt von aktivierten Thrombozyten auf das NF-κB-System untersucht. Hierbei wurde insbesondere die Bedeutung des IKK-Komplexes als zentrale Schaltstelle des NF-κB-Systems, näher charakterisiert.
- Weiterhin wurde der Effekt verschiedener Substanzen mit Bezug zur Arteriosklerose auf das NF-κB-System genauer untersucht. Zum einen sollten Risikofaktoren wie Nikotin und Nandrolon getestet werden, auf der anderen Seite sollte Rapamycin als Beispiel für einen möglichen therapeutischen Ansatz näher untersucht werden.
- Zuletzt wurde noch der Aktivierungsstatus des NF-κB-Systems in der ApoE^{-/-}-Maus, einem etablierten In vivo-Modell für Arteriosklerose, genauer skizziert, um genauere Informationen über die In vivo-Situation zu gewinnen.

Die nachfolgenden Experimente sollen ein besseres Verständnis der Prozesse in der Gefäßwand liefern, die über eine Aktivierung des NF- κ B-System zu arteriosklerotischen Veränderungen und deren Folgen führen. Da das Wissen in Bezug auf die molekularen Mechanismen der Regulation des NF- κ B-Systems ständig wächst, sollte dies Anlass zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien in der Arteriosklerose-Forschung geben.

2. Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

In den Experimenten dieser Arbeit wurden Antikörper (Ak) gegen folgende Antigene (Ag) verwendet:

I κ B- α	polyklonaler Kaninchen-Ak (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
p-I κ B- α	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen die phosphorylierte Form von I κ B- α (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
I κ B- ε	polyklonaler Kaninchen-Ak (Santa Cruz Biotechnology)
p-I κ B- ε	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. N. Rice, NIH, Frederick, MD
IKK- α	polyklonaler Kaninchen-Ak (Santa Cruz Biotechnology)
IKK- β	polyklonaler Kaninchen-Ak (Santa Cruz Biotechnology)
α -Aktin	polyklonaler Kaninchen-Ak (Sigma, Deisenhofen)
Sekundärer Antikörper	Peroxidase-konjugierter polyklonaler Ziege-Ak gegen Kaninchen-IgG (Dianova, Hamburg)

2.1.2 Reagenzien

Interleukin IL-1 β	IL-1 β (IL-1F2) aus <i>E. coli</i> (R&D Systems, Wiesbaden)
Lipopolysaccharid (LPS)	LPS aus <i>E. coli</i> 0111:B4 (Sigma)
TNF	Tumornekrosefaktor (Sigma)
Nandrolon	19-Nortestosteron (Nandrolon) (Sigma)
Nikotin	(-)-Nikotin([-]-1-Methyl-2-[3-Pyridyl]Pyrolidin, freie Base (Sigma)
Rapamycin	Rapamycin aus <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (Sigma)

2.1.3 Plasmide

In den Transfektionsstudien wurden folgende Plasmide verwendet:

IKK- α	pRK5 IKK- α , freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Rothe, Tularik Inc., South San Francisco, CA
IKK- α_{KA}	Mutante, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Rothe
IKK- β	pRK5 IKK- β , freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Rothe
IKK- β_{KA}	Mutante, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Rothe
NIK	NIK, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Rothe
NIK _{KA}	Mutante, freundlicherweise zur Verfügung von Dr. M. Rothe
MCP-1	pGLNeoMCP-1, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. T. Yoshimura, NIH, Frederick, MD
VCAM-1	VCAM-1.luci, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. N. Mackman, Scripps Research Institute, La Jolla, CA

Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe des Renilla-Luciferase-Plasmids pRLTk (HSV-Thymidinkinase-Promoter) (Promega, Mannheim) kontrolliert.

Als Negativkontrolle diente ein R_cCMV-Plasmid ohne Insert (Invitrogen, Groningen, Niederlande).

2.2 Methodik

2.2.1 Zellkultur

Für die Experimente wurden verschiedene Zelllinien benutzt, in der Hauptsache monozytäre THP-1-Zellen (DSMZ, Braunschweig). Zur Kultivierung dieser Zellen wurde RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) verwendet, welches mit 7,5% fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alle Reagenzien von Biochrom) angereichert wurde, um die Zellen bis zu einer Dichte von 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml in der Zellkulturflasche heranzuzüchten. Der Endotoxingehalt des Mediums und aller Bestandteile lag unter 10 pg/ml. Für die Experimente wurden die Zellen dann in 6-Well-Kulturplatten (Nunc, Eggenstein) mit einer Dichte von $2-3 \times 10^6$ Zellen pro Schale in 3 ml Medium ausgesät.

Des Weiteren wurden endotheliale HUVEC-Zellen (Human umbilical vein endothelial cells, Promocell, Heidelberg) verwendet, welche in Endothelial Cell Growth Medium (Promocell) kultiviert wurden. Das fertige Medium wurde zusätzlich mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin und 10% fetalem Kälberserum versehen. Um mit diesen adhären Zellen arbeiten zu können wurden diese zunächst von ihrer Unterlage gelöst indem sie mit 10 ml Trypsin (0,025%; EDTA 10 mM) für 5 min bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die in Trypsin suspendierten Zellen für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, um das Trypsin wieder absaugen zu können. Dann wurden die Zellen in einer ausreichenden Menge Medium resuspendiert, um sie schließlich in 6-Well-Kulturplatten (Nunc) auszusäen und ein Anwachsen der Zellen in je 3 ml Medium pro Schale bis zur Konfluenz abzuwarten.

Es wurden ferner ECV-304-Zellen (Human urinary bladder carcinoma, derivative of T-24, DSMZ) eingesetzt, deren Kultivierung in Medium 199 Earle (Biochrom, Berlin) erfolgte (Zusatz von 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin und 10% fetalem Kälberserum). Um mit den Zellen zu arbeiten, wurden sie in gleicher Weise wie die HUVEC-Zellen bei Konfluenz zunächst mit 10 ml Trypsin (0,025%; EDTA 10 mM) für 5 min bei 37°C inkubiert, um sie von der Unterlage zu lösen. Zur Entfernung des Trypsins wurden die Zellen dann zentrifugiert (5 min, 1000 rpm) und der Überstand abgesaugt. Die Resuspension erfolgte dann in einer ausreichenden Menge Medium, um die Zellen in 6-Well-Kulturplatten (Nunc) auszusäen und ihr Anwachsen in 3 ml Medium pro Schale bis zur erneuten Konfluenz abzuwarten.

Die Kulturbedingungen bestanden jeweils aus 37°C, 9% relative Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂.

2.2.2 Endotoxintest

Zu Beginn der Experimente wurde in allen eingesetzten Medien und Reagenzien der Gehalt an Endotoxin bestimmt. Mit Hilfe des chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Assays (Bio Whittaker, Verviers, Belgien) wurde quantitativ die Endotoxin-abhängige Spaltung des Substrats Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA bei 405 nm bestimmt. Es fanden ausschließlich Substanzen Verwendung, deren Pyrogen-Gehalt weniger als 10 pg/ml betrug.

2.2.3 Zytotoxizitätstest (WST-Test)

Zur Überprüfung der Zell-Viabilität wurde der kolorimetrische WST-1-Test (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Zunächst wurden $1,5 \times 10^6$ THP-1-Zellen pro 150 µl Medium in Mikrotiterplatten (Nunc) mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanzen inkubiert. Anschließend wurde das Tetrazolium-Salz 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat (WST-1) zugegeben. Zur Auswertung des Tests wurde schließlich die Spaltung von WST-1 zu Formazan durch Dehydrogenasen intakter Zellen photometrisch bei 405 nm gemessen. Über die erhaltene optische Dichte (OD) ließ sich dann quantitativ die Stoffwechselaktivität der Zellen bestimmen. Die Bestimmungen wurden jeweils 6-fach durchgeführt.

Ferner wurde mittels der Trypanblau-Färbung routinemäßig das Verhältnis lebender zu toter Zellen bestimmt und mikroskopisch die Morphologie der Zellen beurteilt.

2.2.4 Isolierung zytosolischer und nukleärer Extrakte

Die Herstellung der zellulären Extrakte erfolgte nach einem in der Literatur beschriebenen, leicht modifizierten Verfahren (83,97).

Zur Isolierung der Extrakte wurden THP-1-Zellen ($2-3 \times 10^6$), bzw. HUVEC-Zellen oder ECV-Zellen (bei adhärennten Zellen zunächst absaugen des Mediums und Zugabe von 1 ml

PBS pro Schale, dann abschaben der Zellen von der Unterlage) verwendet und zunächst abzentrifugiert bei 200xg, 7 min, 4°C und einmal in PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden nach erneuter Zentrifugation (2000xg, 7 min, 4°C) schließlich in Puffer A (0,1% Nonidet P-40; 10 mM HEPES, pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 mM Dithiothreitol (DTT); 300 mM Saccharose; je 0,75 µg/ml Pepstatin, Antipain, Chymostatin, Aprotinin und Leupeptin, sowie 0,5 mM PMSF) resuspendiert und darin 5 min inkubiert. Auf diese Weise wurde die äußere Zellmembran aufgebrochen. Um nun den zytosolischen Extrakt von den Zellmembranresten und den Zellkernen zu separieren wurde erneut zentrifugiert, diesmal mit 15.800xg für 30 sec bei Raumtemperatur (RT). Der Überstand entsprach der zytosolischen Fraktion des Zellextrakts. Um eine Verunreinigung der im Zellpellet verbliebenen Zellkerne zu umgehen wurden diese einmal mit Puffer A gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zusammen mit der oben gewonnenen zytosolischen Fraktion des Zellextrakts bei -80°C aufbewahrt.

Anschließend wurden die Pellets mit Puffer B (20 mM HEPES, pH 7,9; 100 mM KCl; 100 mM NaCl; 20% Glycerin; 0,5 mM DTT; Proteaseinhibitoren wie bei Puffer A) resuspendiert und die Kernmembranen mittels eines Ultraschalldesintegrators aufgebrochen. Nach erneuter Zentrifugation bei 15.800xg, 30 sec, RT konnten analog zu den zytosolischen nun die nukleären Extrakte abgenommen werden. Auch diese wurden bei -80°C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der zytosolischen und nukleären Extrakte kam der Bradford-Assay (Biorad, München) zum Einsatz (13). Als Bezugsmessgröße diente hierbei die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blau G250 von 465 nm zu 595 nm in der Photometrie durch Proteinbindung.

2.2.5 Präparation von Gewebeproben

ApoE^{-/-}-Mäuse wurden mit einer Cholesterin-reichen „westlichen“ Diät über verschiedene Zeiträume hinweg gefüttert. Nach bestimmten festgelegten Zeitpunkten wurden die Mäuse dann geopfert und die *A. carotis* (*Arteria carotis*) und die *Aorta abdominalis* herauspräpariert und entnommen. Diese Gewebestücke wurden dann augenblicklich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -80°C gelagert, um später einer Präparation zur Verfügung zu stehen.

Für die Präparation wurde ein ähnliches Protokoll verwendet wie für die Isolierung zellulärer und nukleärer Extrakte aus THP-1-Zellen, HUVEC-Zellen und ECV-Zellen. Abweichend von diesem Protokoll seien folgende Schritte genannt: Zunächst wurden die bei -80°C gelagerten Gewebeprobe mit einem geeisten Mörser fein pulverisiert und dann sofort mit Puffer A (Proteaseinhibitoren in 10-facher Konzentration; 0,2% Nonidet P-40; insgesamt bis $400\ \mu\text{l}$ pro Probe je nach Gewebevolumen) versetzt. Um eine Degradierung des Gewebes zu vermeiden erfolgten diese beiden ersten Schritte bei 4°C . Zur Isolierung der nukleären Extrakte wurde Puffer B (Proteaseinhibitoren in 10-facher Konzentration) in einer Menge von bis zu $200\ \mu\text{l}$ pro Probe eingesetzt.

2.2.6 Thrombozytenpräparation

Thrombozyten wurden aus mit ACD-antikoagulierte Blut (Zusatz von 12,5 g Trisodiumcitrat; 6,82 g Zitronensäure; 10 g Glucose; auf 500 ml Aqua dest.; pH-Titration auf 4,69 mit NaOH; sterile Filtration) isoliert indem das Thrombozyten-reiche Plasma zunächst durch Zentrifugation (1000 rpm, 20 min) von den übrigen Blutbestandteilen abgetrennt wurde. Daraufhin folgten verschiedene Waschstschritte, zunächst mit Tyrodes pH 6,5 (150 ml Tyrodes pH 7,4 auf pH 6,5 mit NaOH oder HCl) und anschließend mit Tyrodes pH 7,4 (0,2 g BSA; 0,2 g Glucose; auf 20 ml Tyrodes 10x; auf 200 ml Aqua dest.; pH auf 7,4 mit NaOH oder HCl). Zur Stimulierung von HUVEC-Zellen wurden 4×10^8 Thrombozyten in Tyrodes pH 7,4 ($500\ \mu\text{l}$) pro konfluentem Zell-Monolayer einer Schale in einer 6-Well-Platte (Nunc) verwendet. Vorstimuliert wurden die Thrombozyten mit α -Thrombin (2 U/ml, Sigma). Nach Beendigung der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Thrombozyten abgesaugt und durch Medium ersetzt.

2.2.7 Transfektion und Überexpression

Die transiente Transfektion adhärenter ECV-Zellen erfolgte mit dem SuperFect Transfektionsreagenz nach einem Protokoll von Qiagen (Hilden). Es wurden folgende Plasmide transfiziert: IKK- α , IKK- β , NIK, NIK_{KA}, MCP-1 und VCAM-1.

Die Zellen wurden zunächst einmal in PBS gewaschen, um dann für 2 h bei 37°C mit einer Mischung aus DNA, SuperFect Transfektionsreagenz und Medium (ohne Zusatz von

FKS und Penicillin/Streptomycin) inkubiert zu werden. Anschließend wurde diese Mischung entfernt und durch Medium (mit Zusatz von FKS und Penicillin/Streptomycin) ersetzt.

Die Zellen wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert um am nächsten Tag mit aktivierten Thrombozyten (2×10^8 /ml) oder IL-1 β (100 pg/ml) für 60min stimuliert zu werden. Nach weiteren 15 h wurden die Zellen dann mit Lysis-Puffer (Promega) (15 min Inkubation bei RT) lysiert. Danach wurde die Aktivität der induzierten Firefly-Luciferase mit dem Luciferase-Reporter-Assay (Promega) mit Hilfe eines Luminometers quantitativ bestimmt und das Ergebnis unter Einbeziehung der Aktivität der konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase normalisiert.

Zur Kontrolle der Effizienz der Überexpression wurden die ECV-Zellen mit den jeweiligen Überexpressionsplasmiden transient transfiziert, bzw. blieben unbehandelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen dann einmal in PBS gewaschen und darin abgeschabt, um zytosolische und nukleäre Extrakte gemäß 2.2.4 herzustellen. Die zytosolische Fraktion des Extrakts wurde dann mittels Western Blot-Analyse (2.2.9) auf die Menge der überexprimierten Proteine im Vergleich zur untransfizierten, bzw. CMV-transfizierten Kontrolle bestimmt. Die nukleären Extrakte wurden darüber hinaus mittels Gelretardierungsassay (2.2.8) untersucht.

2.2.8 Gelretardierungsassay

Um nukleäre Extrakte auf die Anwesenheit von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren zu überprüfen wurden Gelretardierungsassays durchgeführt. Hierfür wurden doppelsträngige Oligonukleotide mit Erkennungssequenz für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren verwendet: Als NF- κ B-Konsensussequenz diente ein Oligonukleotid mit dem prototypischen I κ B-Motiv (5'-CAGAGGGGACTTTCCGAGA-3', MWG-Biotech, Ebersberg). Mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I (Roche Diagnostics) wurde dieses Oligonukleotid in Anwesenheit der erforderlichen Nukleotide mit [α -³²P]dCTP (>3000 Ci/mmol) (Perkin Elmer Life Sciences, Zaventem, Belgien) markiert. Um eine gleichmäßige Proteinladung zu gewährleisten wurde zur Kontrolle parallel ein Oligonukleotid mit der Erkennungssequenz für den konstitutiv aktivierten Transkriptionsfaktor Sp-1 (5'-ATTTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3', Promega, Mannheim) verwendet, welches mittels T4-Polynukleotidkinase (Promega) mit [γ -³²P]ATP (>5000 Ci/mmol) (Perkin Elmer Life Sciences) markiert wurde. Um nicht gebundene Nukleotide zu entfernen wurden Sephadex

G50 (NF- κ B-Oligonukleotid), bzw. G25-Säulen (Sp-1-Oligonukleotid) (Roche Diagnostics) verwendet. Schließlich wurden äquivalente Proteinmengen nukleärer Extrakte (2-6 μ g) in 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 von Roche Diagnostics) aufgenommen und dann 30 min mit dem jeweiligen radioaktiv markierten Oligonukleotid (10 ng, 10^5 cpm) inkubiert. Nachdem der Ladepuffer (0,25x TBE-Puffer; 40% Glycerin; 0,2% Bromphenolblau) zugegeben wurde erfolgte schließlich die Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese in einem 4 oder 6%igen Polyacrylamidgel in 0,25x TBE-Puffer (10x TBE-Puffer: 890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA, pH 8,0). Routinemäßig wurden Extrakte LPS-, TNF- oder IL-1 β -stimulierter THP-1-Zellen als Positiv-Kontrollen verwendet. Ferner wurden die Extrakte der stimulierten THP-1-Zellen im Überschuß mit unmarkiertem Oligonukleotid als spezifischem Kompetitor inkubiert und mitaufgetrennt. Zuletzt wurden die Gele getrocknet, um dann mittels Autoradiographie und Densitometrie ausgewertet zu werden.

2.2.9 Western Blot-Analyse

Zur Untersuchung der zytosolischen Extrakte wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden gleiche Proteinmengen (5-10 μ g) mit SDS-Probenpuffer (20,8 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1,27% SDS; 4% Glycerin; 1,2% Mercaptoethanol; 330 μ M EDTA; 0,2% Bromphenolblau) 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine in einem 12%igen Polyacrylamid-Fertiggerel (NovexTM Pre-Cast Gel, Invitrogen, Groningen, Niederlande). Um die Größen der aufgetrennten Proteine erfassen zu können wurden gleichzeitig vorgefärbte Molekulargewichtsstandards (Rainbow, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Low Range, Biorad) mit aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Gele in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 0,2 M Glycerin) 15 min äquilibriert und die Proteine im Wet Blot-Verfahren auf eine ebenfalls äquilibrierte Nitrocellulosemembran (Biorad) transferiert. Anschließend wurden die Membranen mit Aqua dest. gewaschen und dann mit Ponceau S (Sigma) gefärbt, um die gleichmäßige Übertragung der Proteine aus den Gelen auf die Membranen zu überprüfen. Nach dem Abspülen dieser Proteinfärbung wurden die Membranen 1 h lang mit 5% Magermilchpulver in PBST (PBS + 0,05% Tween 20) behandelt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Schließlich erfolgte die Inkubation der Membranen mit den gewünschten primären

Antikörpern in der empfohlenen Verdünnung (je nach Antikörper 1:200 bis 1:2000, jeweils in PBST + 1% Milchpulver) für 1 h bei RT, bzw. über Nacht bei 4°C. Daraufhin wurden die Membranen 3x10 min mit PBST + 1% Milchpulver bei RT gewaschen, um anschließend für 1 h bei RT mit einem sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper (Verdünnung in PBST + 1% Milchpulver: für Anti-Kaninchen 1:20.000) inkubiert zu werden. Es folgten weitere Waschschrte mit PBST: 1x15 min, dann 4x5 min. Zum Schluß wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe auf den Membranen mit Hilfe des ECL-Verfahrens auf Röntgenfilm (beides von Perkin Elmer Life Sciences) sichtbar gemacht und dann mittels Densitometrie ausgewertet oder direkt gescannt.

2.2.10 Immunpräzipitation und Kinaseassay

Zur Fällung bestimmter Proteine wurden Immunpräzipitationen (IP) durchgeführt. Hierzu wurden zytosolische Extrakte mit TNT-Puffer (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5% BSA; 1 mM DTT; 0,5 µM 4-(2-)Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (AEBSF), sowie jeweils 0,75 µg/ml Leupeptin, Antipain, Aprotinin, Pepstatin A und Chymostatin; evtl. Zusatz von 1% Triton X-100) behandelt. Die Fällung erfolgte anschließend beim Kinaseassay mit 1 µg eines Anti-Kinase-Antikörpers (Santa Cruz Biotechnology) und 35 µl 6%iger Protein-Agarose (Protein-A-Agarose für polyklonale Ak, Protein-G1-Agarose für monoklonale Ak), bei 4°C für 2 h.

Es folgten mehrere Waschschrte, für die Assoziation wie folgt: 5x Waschen mit IP-Puffer ohne Zusatz von BSA und dann Zugabe von SDS-Probenpuffer (+ 10% Glycerin). Die Proben wurden dann in einem Polyacrylamid-Fertiggel aufgetrennt und die mit dem gefällten Antigen assoziierten Proteine mittels Antigen-Antikörper-Komplex (siehe 2.2.9) detektiert.

Für die Vorbereitung zum Kinaseassay wurden die gefällten Proteine folgendermaßen gewaschen: zunächst 3x mit TNT-Puffer (ohne Zusatz von BSA), dann 3x mit Kinasepuffer (20 mM Hepes, pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 100 µM Na₃VO₄; 20 mM β-Glycerophosphat; 50 mM NaCl; 2 mM DTT; 0,5 µM AEBSF; und jeweils 0,75 µg/ml Leupeptin, Antipain, Aprotinin, Pepstatin A und Chymostatin). Schließlich konnten die gefällten Proteine im Kinaseassay untersucht werden. Die Kinasereaktion erfolgte in Anwesenheit von [γ -³²P]ATP (5 µCi/Probe) (Perkin Elmer Life Sciences) mit 500 ng GST-IκB-α (Santa Cruz Biotechnology) als Substrat in Kinasepuffer für 30 min, bei 30°C. Die Proteine wurden dann in einem Polyacrylamid-Fertiggel aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele geblottet (2.2.9), um die Membran dann

quantitativ mittels Autoradiographie (Perkin Elmer Life Sciences) auszuwerten. Um eine gleichmäßige Ladung sicherzustellen wurde zuletzt die Membran mit dem jeweiligen Anti-Kinase-Antikörper nachbehandelt und die Antigen-Antikörper-Komplexe mittels Western-Blot-Verfahren sichtbar gemacht und ausgewertet.

2.2.11 Statistische Auswertung

Die densitometrische Auswertung der Experimente erfolgte mit Microsoft Excel 5.0/95. Statistische Unterschiede einzelner Werte wurden mittels Student's t-Test bewertet und bei einem p-Wert < 0,05 als signifikant angenommen, die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Effekt von Thrombozyten auf das NF- κ B-System

Sowohl bei der Entstehung arteriosklerotischer Prozesse als auch bei fortgeschrittenen Gefäßläsionen spielen Thrombozyten eine bedeutende Rolle. Um einen Teil dieser komplexen Pathomechanismen der Interaktion Thrombozyt – Endothel näher zu charakterisieren wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

3.1.1 Aktivierung von NF- κ B durch aktivierte Thrombozyten

HUVEC-Zellen wurden mit aktivierten Thrombozyten (Stimulation mit α -Thrombin) für 5, 15, 30, 45 und 60 min inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Anschließend wurden nukleäre Extrakte aus diesen Zellen gewonnen, die dann mit Hilfe des Gelretardierungsassay auf eine mögliche Aktivierung von NF- κ B hin untersucht wurden. Die Sp-1-Bindungsaktivität wurde bestimmt, um die Qualität der Extrakte sowie vergleichbare Ladung auf dem Gel zu überprüfen.

Es zeigte sich in diesen Experimenten, dass aktivierte Thrombozyten tatsächlich in der Lage sind, das NF- κ B-System in HUVEC-Zellen zu aktivieren (Abb. 3), und zwar in einem Zeit-abhängigen Modus: Nach 5 min war die Aktivität von NF- κ B gerade merklich, doch dann stieg sie kontinuierlich an in direkter Abhängigkeit zur fortschreitenden Inkubationszeit. Die stärkste Aktivität zeigte NF- κ B schließlich nach 60 min (Abb. 3 und nicht gezeigte Daten).

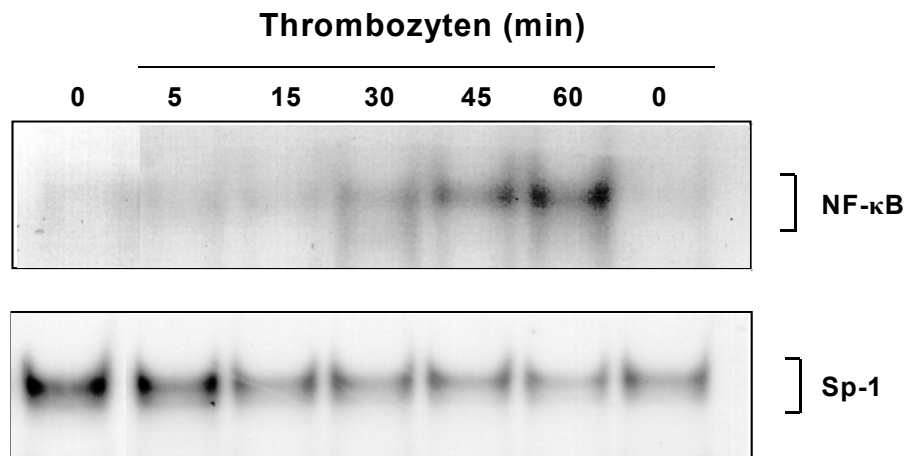


Abbildung 3. Thrombozyten-abhängige NF- κ B-Aktivierung in HUVEC. Die Zellen wurden mit aktivierten Thrombozyten (Thrombozyten 2×10^8 /ml, Aktivierung mit 2 U/ml α -Thrombin für 15 min) für 0, 5, 15, 30, 45 und 60 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und daraus nukleäre Extrakte gewonnen. Diese Extrakte wurden mittels Gelretardierungsassay auf eine Aktivierung von NF- κ B und Sp-1 (zur Kontrolle der Extrakt- und Ladungsqualität) hin untersucht.

3.1.2 Proteolyse von I κ B nach Inkubation mit Thrombozyten, IL-1 β und TNF

Um das Proteolysemuster von I κ B nachzuweisen wurden folgende weitere Experimente durchgeführt: HUVEC-Zellen wurden mit aktivierten Thrombozyten, IL-1 β und TNF behandelt. Nach verschiedenen Inkubationszeiten für die einzelnen Substanzen (Thrombozyten 0-60 min, IL-1 β 0-90 min und TNF 0-30 min) wurden zytosolische Extrakte aus den vorbehandelten Zellen hergestellt, in denen mittels Western Blot-Analyse die Proteolyse von I κ B untersucht wurde. α -Aktin wurde in diesen Experimenten als Ladungskontrolle verwendet.

Es zeigte sich, dass sich das Proteolysemuster der I κ B-Proteine nach der Inkubation mit aktivierten Thrombozyten und die Ergebnisse der Gelretardierungsassays ergänzten (Abb. 4A), vgl. Abb. 3. I κ B- α war nach 5 min noch kaum abgebaut, doch das Signal wurde mit zunehmender Inkubationszeit immer schwächer, bis es nach 30 min schließlich sein Minimum erreichte. I κ B- ε bot ein ähnliches Bild, nämlich ein Maximum der Proteolyse nach 30 min. Es konnte also gezeigt werden, dass sich die NF- κ B-Aktivierung im Gelretardierungsassay und die Konzentration der I κ B- α -Proteine in der Western Blot-Analyse nach Inkubation mit aktivierten Thrombozyten genau spiegelbildlich verhielten. IKK- α und IKK- β waren zu allen Zeitpunkten des Experiments weitgehend gleichmäßig nachzuweisen. Die Ladungskontrolle mit α -Aktin ergab ebenfalls ein gleichmäßiges Bild.

Im Vergleich zu den aktivierten Thrombozyten zeigte sich bei der Inkubation mit IL-1 β ein ähnliches Proteolysemuster der I κ B-Proteine (Abb. 4B): Wenngleich der proteolytische Abbau von I κ B- α mit zunehmender Inkubationszeit etwas schneller voranzuschreiten schien, so fand er doch auch hier ein Maximum nach 30 min. I κ B- ε dagegen war erst zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich nach 60 min, maximal degradiert. Auch hier waren bei IKK- α und IKK- β keine signifikanten Signalunterschiede festzustellen und α -Aktin als Qualitätskontrolle konnte eine gleichmäßige Ladung der Proteine bestätigen.

Des Weiteren wurden HUVEC-Zellen mit TNF inkubiert, wobei sich hier ein völlig anderes Proteolysmuster bezüglich der I κ B-Proteine zeigte (Abb. 4C): Bereits nach 10 min war I κ B- α bei Inkubation mit TNF maximal abgebaut. Gleichsam zeigte sich der Abbau von I κ B- ε auch hier deutlich akzeleriert im Vergleich zur Inkubation mit aktivierten Thrombozyten oder IL-1 β .

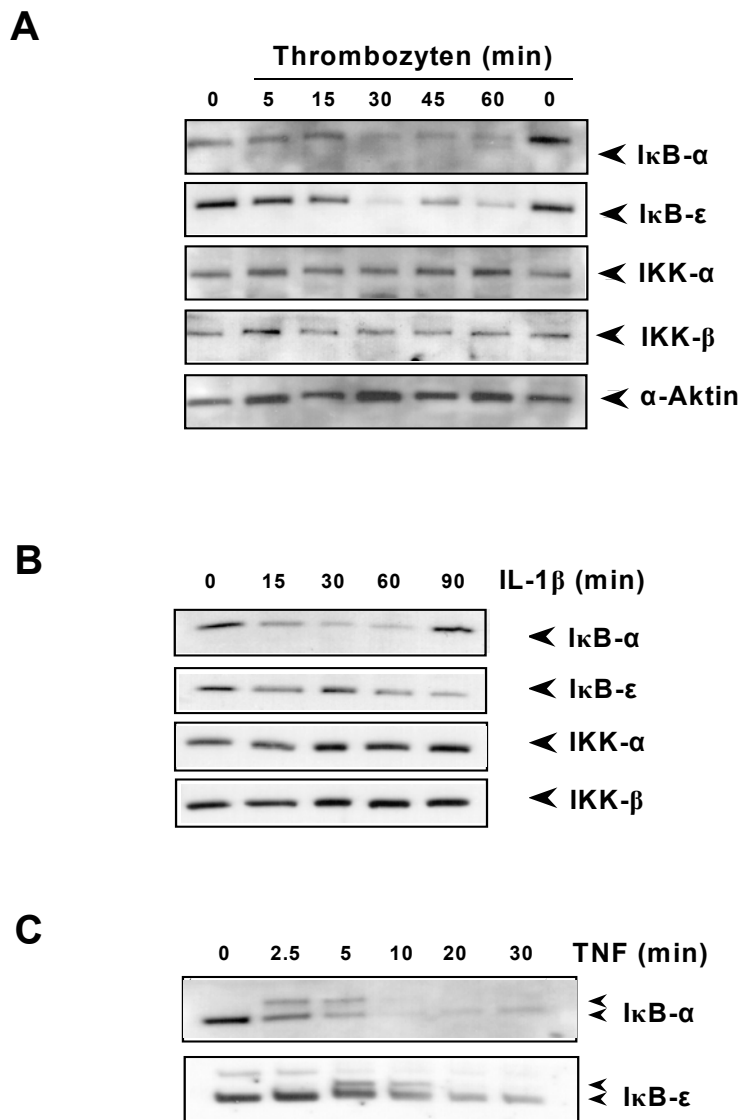


Abbildung 4. Proteolyse von I κ B nach Inkubation mit aktivierten Thrombozyten, IL-1 β und TNF. HUVEC-Zellen wurden mit aktivierten Thrombozyten (2×10^8 /ml, Inkubation 0-60 min) (A), IL-1 β (100 pg/ml, Inkubation 0-90 min) (B) und TNF (1,67 ng/ml, Inkubation 0-30 min) (C) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und zytosolische Extrakte hergestellt. Diese Extrakte wurden mittels Western Blot-Analyse auf die Konzentration von I κ B- α , I κ B- ϵ , IKK- α und IKK- β hin untersucht. α -Aktin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Die oberen Pfeile in (C) zeigen die phosphorylierte Form von I κ B- α/ϵ . In allen drei Fällen sind repräsentative Experimente gezeigt (n=3).

3.1.3 Aktivierung des IKK-Komplexes durch aktivierte Thrombozyten, IL-1 β und TNF

Als nächstes wurde der Effekt von aktivierten Thrombozyten, IL-1 β und TNF auf den IKK-Komplex mit einer weiteren Serie von Experimenten gezeigt. HUVEC-Zellen wurden mit den oben genannten Substanzen für verschiedene Zeitpunkte inkubiert (aktivierte Thrombozyten 0-60 min, IL-1 β 0-90 min und TNF 0-20 min) und anschließend geerntet, um daraus zytosolische Extrakte herzustellen. Mit Hilfe von Anti-Kinase-Antikörpern (Anti-IKK- α und Anti-IKK- β) wurde mit diesen Extrakten Immunpräzipitationen durchgeführt und dann das Präzipitat mit GST-I κ B- α als Substrat in Anwesenheit von 32 P-ATP auf eine mögliche Kinase-Aktivität getestet. Zur Darstellung kam die Phosphorylierung des Substrats durch die aktivierten IKK-Kinasen (Abb. 5). Eine quantitative Erfassung der Kinaseassays wurde mittels Densitometrie durchgeführt, deren Ergebnisse in Abb. 6 noch einmal graphisch dargestellt sind.

Bei Zugabe von aktivierten Thrombozyten zeigte sich eine deutliche Aktivierung des IKK-Komplexes, wobei ein Maximum nach 30 min sowohl bei Verwendung von Anti-IKK- α wie auch für Anti-IKK- β erreicht wurde (Abb. 5A und 6). Nach 60 min konnte dann ein Aktivierungsstatus des IKK-Komplexes festgestellt werden, der wieder dem Ausgangsniveau entsprach.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit IL-1 β erzielt, wobei das Maximum der IKK-Komplex-Aktivierung zu einem etwas späteren Zeitpunkt anzusetzen war, nämlich bei 45 min (Abb. 5B und 6). Der Abfall der Aktivierung des IKK-Komplexes dauerte allerdings wesentlich länger an als mit aktivierten Thrombozyten, denn auch nach 90 min kehrte die IKK-Aktivität immer noch nicht wieder vollständig auf das Ausgangsniveau zurück.

Mit TNF zeigte sich dagegen ein rapider Anstieg der IKK-Aktivität (Abb. 5C und 6). Bereits nach 2,5 min war das Maximum erreicht, das dann ebenfalls vergleichsweise schnell wieder auf das Ausgangsniveau zurückkehrte. Nach 20 min war nur noch eine minimal erhöhte IKK-Aktivität festzustellen.

Es lässt sich also zusammenfassend feststellen, dass sowohl aktivierte Thrombozyten, wie auch IL-1 β und auch TNF den IKK-Komplex aktivieren, dass jedoch das Aktivitätsmuster im Zeitverlauf deutliche Unterschiede aufweist.

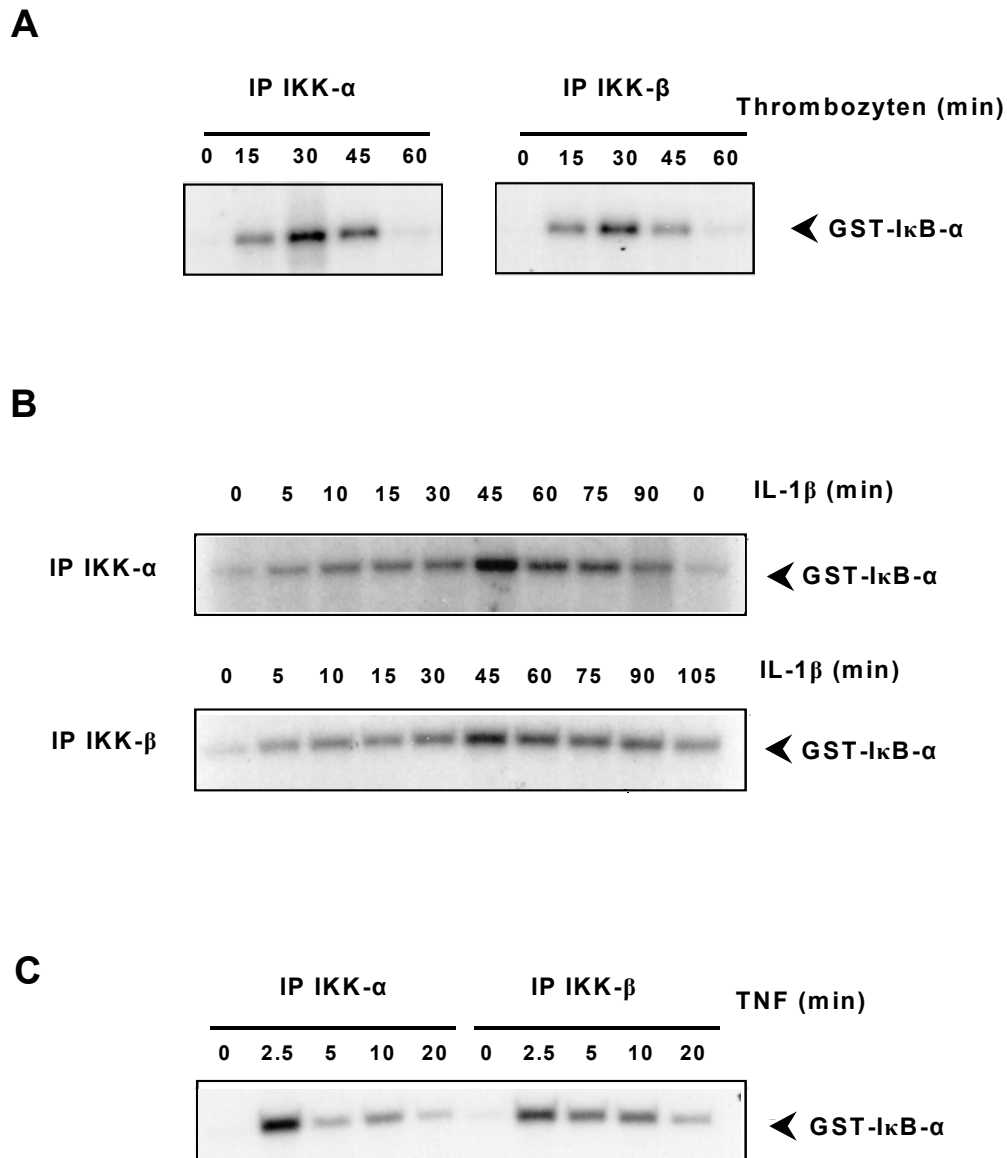


Abbildung 5. Aktivierung des IKK-Komplexes in HUVEC. Die Zellen wurden mit aktivierten Thrombozyten, IL-1 β und TNF für verschiedene Zeitpunkte inkubiert und anschließend zytosolische Extrakte gewonnen. Die Extrakte wurden immunpräzipitiert mit Anti-Kinase-Antikörpern (Anti-IKK α und Anti-IKK β) und schließlich das Präzipitat mit dem Kinase-Assay mit GST-I κ B- α als Substrat in Anwesenheit von 32 P-ATP auf die Kinase-Aktivität hin getestet. Gezeigt ist die Zeit-abhängige Phosphorylierung des Substrats für die Stimulation von HUVEC mit aktivierten Thrombozyten (2×10^8 /ml) (A), IL-1 β (100 pg/ml) (B) und TNF (1,67 ng/ml) (C). In jedem Fall ist ein repräsentatives Experiment gezeigt (n=3).

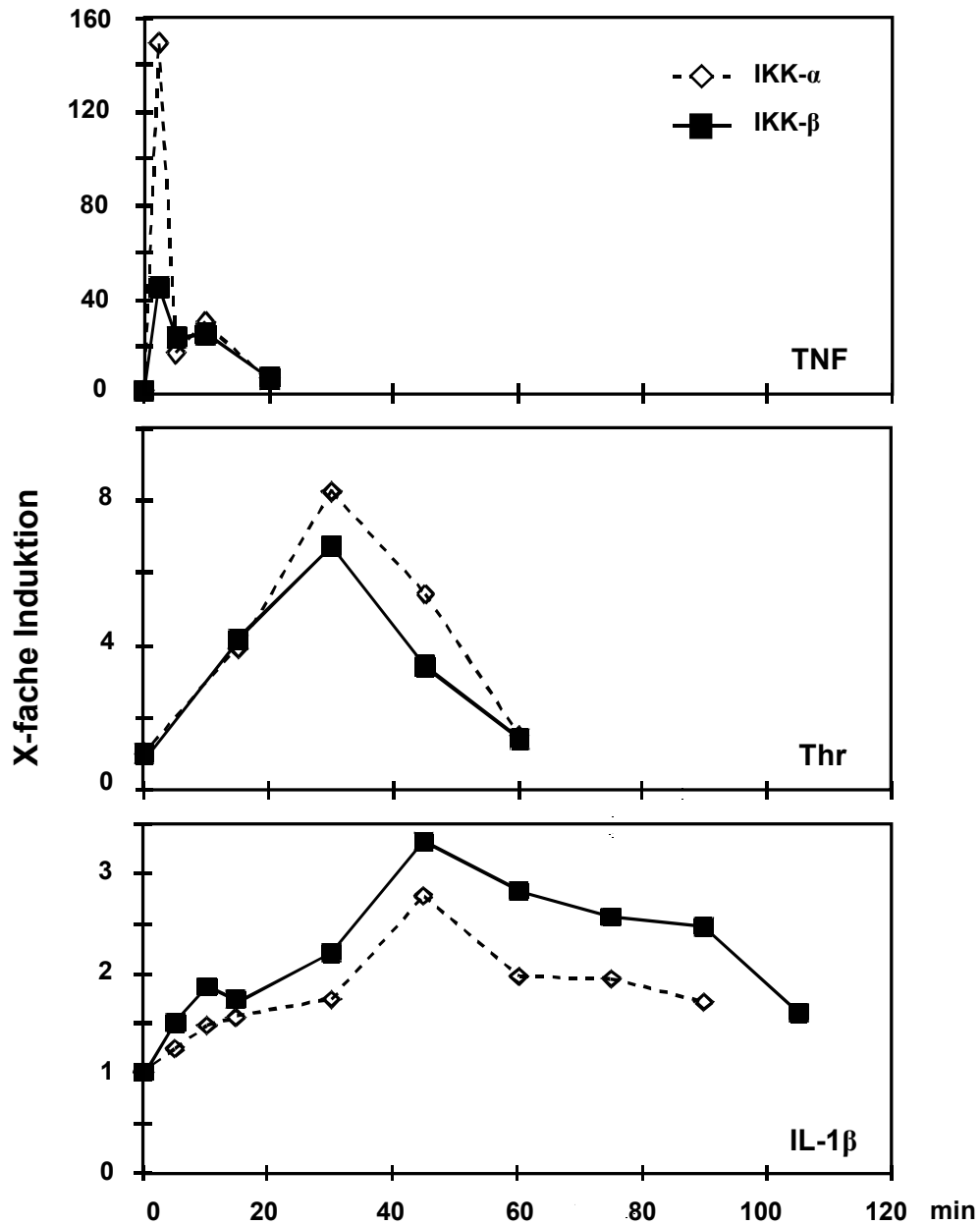


Abbildung 6. Aktivierung des IKK-Komplexes in HUVEC. Die Auswertung der Assays aus der Abbildungen 5 erfolgte densitometrisch. Das Diagramm zeigt die x-fache Induktion der IKK-Aktivität gegenüber der Kontrolle nach erfolgter Stimulation mit TNF, aktivierten Thrombozyten (Thr) und IL-1 β .

3.1.4 Die Rolle von IKK- β und NIK bei der Thrombozyten-induzierten NF- κ B-Aktivierung

Um die Rolle von IKK und NIK in Bezug auf die Aktivierung des NF- κ B-Systems durch Thrombozyten zu untersuchen, wurden ECV304-Zellen mit Überexpressionsplasmiden für Flag-markierte Wildtyp (wt) oder mutierte Kinasen zusammen mit dem κ B-Reporter-Plasmid (3 \times κ B.luci) transfiziert. Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen mit aktivierten Thrombozyten oder IL-1 β für jeweils 60 min stimuliert. Nach weiteren 15 h wurden die Zellen lysiert und dann das Signal der Firefly-Luziferase und Renilla-Luziferase mittels Luziferaseassay gemessen. Zur Qualitätskontrolle wurde mittels Western Blot-Analyse mit einem Anti-Flag-Antikörper überprüft, ob eine Überexpression erfolgreich stattgefunden hatte (Daten nicht gezeigt). Um zu zeigen, dass nur die Flag-markierten Wildtyp-Proteine, und nicht die Mutanten, eine Kinaseaktivität aufweisen, wurden Kinaseassays durchgeführt (Daten nicht abgebildet).

Bei der Überexpression von NIK zeigte sich ein deutlicher Anstieg des 3 \times κ B.luci-Signals im Vergleich zur CMV-Kontrolle (Abb. 7, linke Seite). Die Signalaktivität konnte sowohl durch aktivierte Thrombozyten (Abb. 7A) als auch durch IL-1 β (Abb. 7B) weiter erhöht werden im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Dagegen war bei den Zellen, die mit der Mutante von NIK (NIK_{KA}) transfiziert worden waren ein deutlich reduziertes Signal festzustellen. Die Ko-Transfektion von Wildtyp-IKK- α und -IKK- β hatte ebenfalls einen direkten aktivierenden Effekt auf das 3 \times κ B.luci-Signal, welches noch weiter erhöht wurde durch die Stimulierung mit aktivierten Thrombozyten oder IL-1 β . Die Überexpression der mutierten Formen von IKK- α und IKK- β hatten keinen direkten Effekt auf das 3 \times κ B.luci-Signal, verhinderten aber eine Zunahme des Signals trotz Stimulation mit aktivierten Thrombozyten oder IL-1 β . Sobald die Kinasen einzeln überexprimiert wurden zeigte sich eine deutliche Abnahme des Signals bei Expression von mutiertem IKK- β (KA), während bei IKK- α _{KA} kein wesentlicher inhibitorischer Effekt festzustellen war (Abb. 7, rechte Seite).

Ferner wurden mutiertes IKK- α und IKK- β hinsichtlich eines Effekts auf Thrombozyten- oder IL-1 β -induzierte Transkription untersucht. Dafür wurden ECV304-Zellen mit Vektoren für Wildtyp oder mutierten Kinasen zusammen mit Reportergenkonstrukten, die Fragmente des MCP-1- oder VCAM-1-Promoters enthalten, transfiziert. In diesem Fall zeigte sich, dass lediglich die Überexpression von IKK- β _{KA}, nicht jedoch von IKK- α _{KA} eine signifikante Reduktion der Thrombozyten- oder IL-1 β -induzierten Transkription zur Folge hatte.

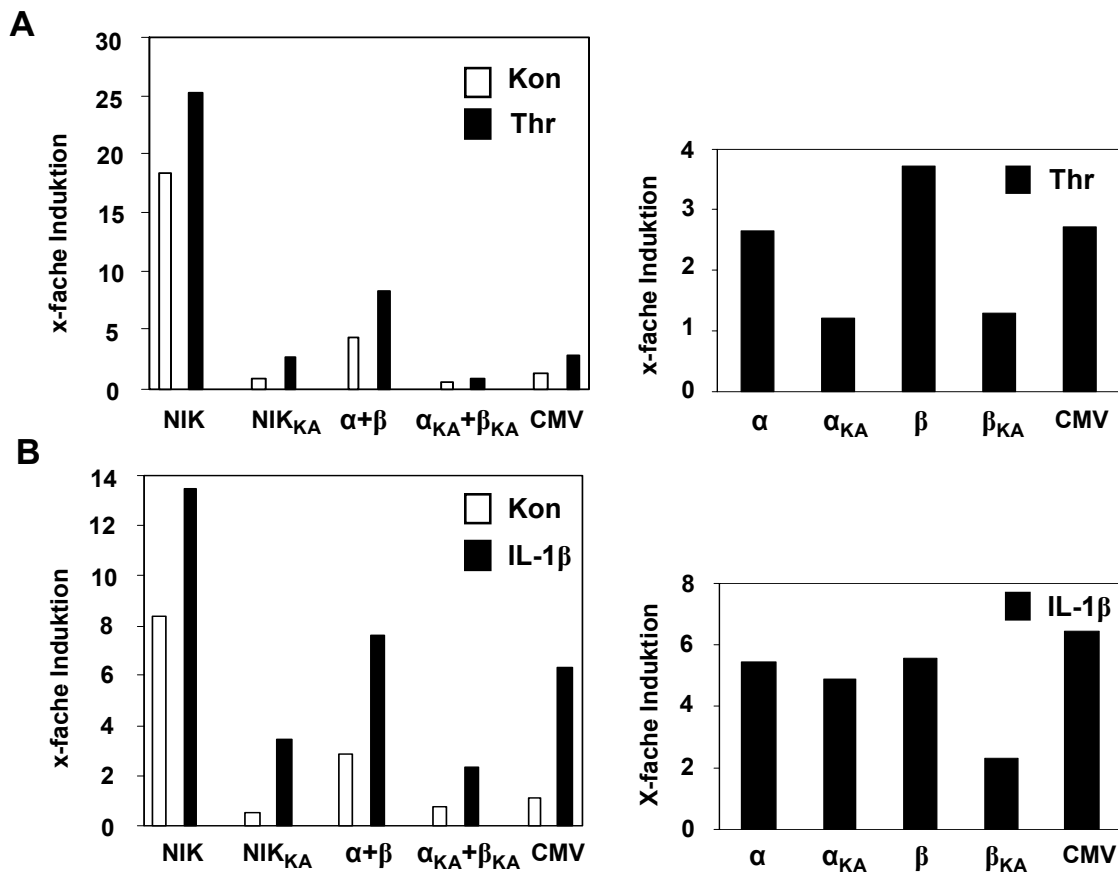


Abbildung 7. Inhibition der κ B-abhängigen Transkription durch IKK- β_{KA} und NIK_{KA}. ECV-Zellen wurden kotransfiziert mit 3 κ B.luci, pRLtk und Kinase-Überexpressionsplasmiden (IKK- α oder - β und NIK, jeweils als Wildtyp oder Mutante; CMV; allein oder in Kombination). Nachdem die Zellen so über Nacht inkubiert worden waren, wurden sie mit aktivierten Thrombozyten (2×10^8 /ml) (A) oder mit IL-1 β (100 pg/ml) (B) für 60 min stimuliert. Nach weiteren 15 h wurden die Zellen lysiert und das Signal der Firefly- und der Renilla-Luziferase im Luziferaseassay gemessen. Die Ergebnisse sind als x-fache Induktion bezüglich des unstimulierten CMV-Transfektionssignals dargestellt. Die linken Diagramme zeigen den Effekt von NIK, IKK- α und IKK- β (Wildtyp, mutiert KA) auf die κ B-abhängige Transkription. Die rechten Diagramme zeigen den individuellen Effekt von IKK- α oder IKK- β (Wildtyp, mutiert KA) bei Stimulation mit Thrombozyten oder IL-1 β , bezogen auf die unstimulierte CMV-Kontrolle. α , IKK- α ; β , IKK- β ; KA, Kinase-aktive Stelle mutiert.

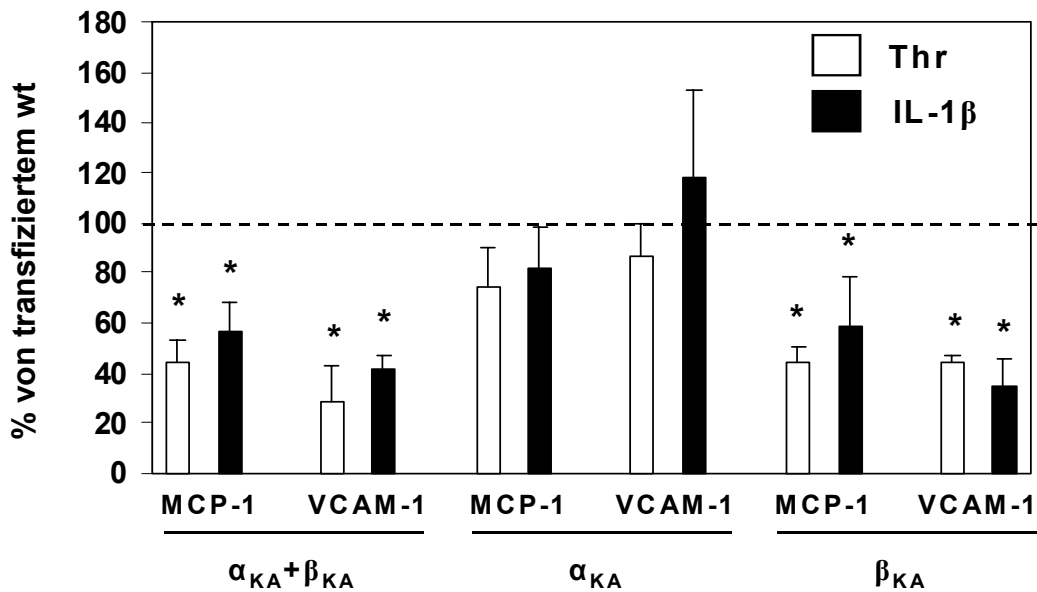


Abbildung 8. Inhibition der MCP-1/VCAM-1-Promoter-abhängigen Transkription bei Kotransfektion mit IKK- α_{KA} und IKK- β_{KA} . ECV-Zellen wurden entweder mit einem MCP-1- oder VCAM-1-Promoter-Fragment-abhängigen Luciferase-Reporter-Plasmid zusammen mit pRLtk- und IKK-Überexpressionsplasmiden transfiziert. Nach der Stimulation mit Thrombozyten oder IL-1 β wurde das Signal der Firefly- und Renilla-Luziferase mittels Luziferaseassay gemessen. Die Ergebnisse zeigen die prozentuale Inhibition im Vergleich zu den mit dem jeweiligen Wildtyp transfizierten Zellen (gestrichelte Linie bei 100%). Der Mittelwert und die Standardabweichung sind für n=3 Experimente dargestellt. wt, Wildtyp; α , IKK- α ; β , IKK- β ; KA, Kinase-aktive Stelle mutiert. *zeigt die Signifikanz im Vergleich zum Basissignal (100%) ($p < 0,05$).

3.2 Testung weiterer Substanzen mit Bezug zur Arteriosklerose

Das Spektrum der Risikofaktoren für die Initiierung und auch die Progression arteriosklerotischer Gefäßveränderungen und deren Folgen ist, wie bereits angedeutet, sehr vielfältig. Neben den Thrombozyten, die wie oben gezeigt direkt mit dem Endothel kommunizieren können, sollte in der vorliegenden Arbeit noch der Effekt von zwei weiteren Substanzen mit Bezug zur Arteriosklerose, sowie einer Substanz mit einem therapeutischen Ansatzpunkt, auf das NF- κ B-System näher charakterisiert werden.

3.2.1 Nikotin

Im Hinblick auf die besondere Bedeutung des Zigarettenrauchens als Risikofaktor ersten Ranges für arteriosklerotische Gefäßveränderungen wurde auf das Nikotin, als ein wesentlicher Bestandteil des Zigarettenrauchs, in dieser Arbeit näher eingegangen und seine Auswirkungen auf das NF- κ B-System in der Endothelzelle genauer untersucht.

ECV-Zellen wurden mit verschiedenen Dosen von Nikotin für unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde für 1 h mit 0,1 sowie 1, 10 und 100 μ g/ml Nikotin behandelt, um den direkten Effekt von Nikotin im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erfassen. Der andere Teil der Zellen, der anschließend noch mit IL-1 β für 1 h stimuliert werden sollte, wurde für 30 min mit den gleichen Dosen von Nikotin präinkubiert. Nach den jeweiligen Stimulationen wurden die Zellen geerntet und daraus nukleäre Extrakte gewonnen. Diese wurden dann mittels Gelretardierungsassay auf eine mögliche Aktivierung von NF- κ B hin untersucht. Sp-1 diene als Ladungs- und Qualitätskontrolle der Extrakte. Ferner wurden auch eine unstimulierte Kontrolle und eine IL-1 β -stimulierte Positivkontrolle eingesetzt.

Es zeigte sich, dass mit steigender Nikotin-Dosis ein leichter, aber kontinuierlicher Anstieg des NF- κ B-Signals zu verzeichnen war (Abb. 9). Jedoch war das Aktivitätsniveau auch bei der höchsten Dosis von 100 μ g/ml noch deutlich geringer als die IL-1 β -stimulierte Positivkontrolle. Bei den IL-1 β -stimulierten Proben zeigte sich, dass auch steigende Dosen von Nikotin keinen wesentlichen Effekt auf das Aktivitätsniveau von NF- κ B hatten. Weder ließ sich eine Steigerung der Aktivierung zusätzlich zur IL-1 β -Stimulation nachweisen, noch ließ sich aus diesem Experiment eine mögliche Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch Nikotin ableiten.

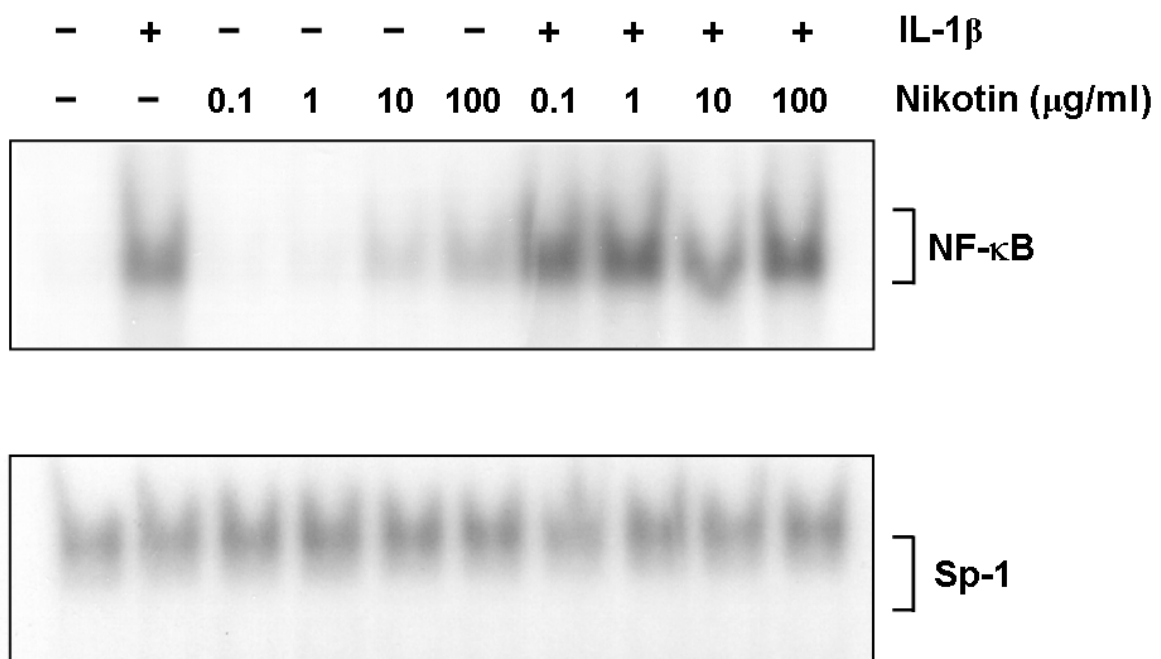


Abbildung 9. Effekt von Nikotin auf NF- κ B in ECV-Zellen. Um einen direkten Effekt von Nikotin zu zeigen wurde die eine Hälfte der Zellen für 1 h mit steigenden Dosen von Nikotin inkubiert (0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{g/ml}$). Die andere Hälfte der Zellen wurde 30 min mit den gleichen Dosen Nikotin vorbehandelt, um dann anschließend noch einmal stimuliert zu werden. Diese anschließende Stimulation erfolgte mit IL-1 β (100 pg/ml) für 1 h. Die Zellen wurden dann nach erfolgter Stimulation geerntet, um daraus nukleäre Extrakte herstellen zu können. Schließlich wurden die Extrakte mittels Gelretardierungsassay auf eine Aktivierung von NF- κ B und Sp-1 hin untersucht.

3.2.2 Nandrolon

Ein weiterer bedeutender Faktor, der auf die Gefäßintegrität entscheidend Einfluß nimmt, ist der Hormonhaushalt. Da sich anabole Steroide in unserer heutigen Zeit nicht nur in Profisportlerkreisen einer nicht zu unterschätzenden Beliebtheit erfreuen und als ein Eingriff in den Hormonhaushalt zu betrachten sind, sollte ihre Wirkung auf das NF- κ B-System in der Endothelzelle getestet werden. Auf diese Weise könnten Anhaltspunkte für eine mögliche Gefährdung durch anabole Steroide in Bezug auf arteriosklerotische Gefäßveränderungen eruiert werden. In den vorliegenden Experimenten wurde Nandrolon als Testsubstanz gewählt, da es eines der ersten und nach wie vor häufig eingesetzten anabolen Steroide ist.

ECV-Zellen wurden mit steigenden Dosen von Nandrolon (0,1; 1; 10 ng/ml) über einen Zeitraum von jeweils 1 h und 5 h behandelt. Anschließend wurde je eine Hälfte der Zellen für eine weitere Stunde mit IL-1 β stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen dann geerntet und der Präparation zugeführt, um nukleäre Extrakte daraus herzustellen. Mittels Gelretardierungsassay wurden die Proben dann auf eine mögliche Aktivierung von NF- κ B hin untersucht. Sp-1 diente als Kontrolle für Qualität und Ladung. Außerdem wurde eine unstimulierte und eine IL-1 β -stimulierte Kontrolle hinzugefügt, die beide nicht mit Nandrolon präinkubiert worden waren.

Es zeigte sich, dass eine Inkubation mit Nandrolon weder dosis- noch zeitabhängig im Rahmen dieses Experiments einen Einfluß auf die Aktivierung von NF- κ B hatte (Abb. 10). Sowohl steigende Dosis wie auch unterschiedliche Inkubationszeiträume konnten das NF- κ B-Signal weder im Sinne einer Aktivierung, noch im Sinne einer Inhibierung beeinflussen. Das gleiche galt auch für die präinkubierten Proben: Das NF- κ B-Signal konnte bei IL-1 β -stimulierten Zellen durch steigende Dosen von Nandrolon über unterschiedliche Inkubationszeiträume (1 h und 5 h) nicht messbar beeinflusst werden.

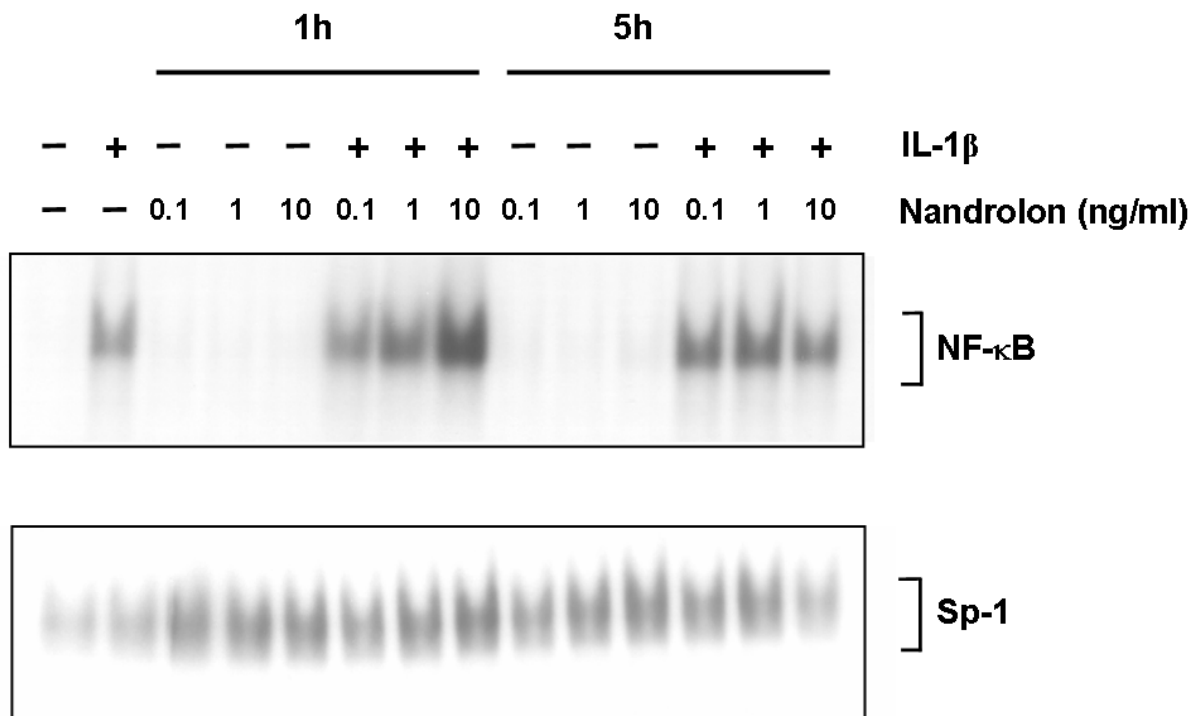


Abbildung 10. Effekt von Nandrolon auf das NF- κ B-System in ECV-Zellen. Die Zellen wurden mit steigenden Dosen von Nandrolon (0,1; 1; 10 ng/ml) über verschiedene Zeiträume (1 h und 5 h) inkubiert. Anschließend wurde je eine Hälfte der Zellen für eine weitere Stunde mit IL-1 β (100 pg/ml) stimuliert. Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen dann der Präparation zugeführt, um nukleäre Extrakte zu gewinnen. Diese Extrakte wurden dann mittels Gelretardierungsassay auf eine Aktivierung von NF- κ B und Sp-1 hin untersucht.

3.2.3 Rapamycin

Rapamycin, ein vor allem in der Kardiologie eingesetztes Immunsuppressivum, wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine mögliche Modulation des NF- κ B-Systems in der Endothelzelle hin getestet. Anhand der nachfolgenden Experimente sollte untersucht werden, ob die günstigen Effekte von Rapamycin auf arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen über das NF- κ B-System vermittelt sein könnten.

ECV-Zellen wurden mit ansteigenden Dosen von Rapamycin (1; 10; 100 μ g/ml) für 1 h behandelt. Eine anschließende Stimulation eines Teils der Zellen erfolgte für eine weitere Stunde mit IL-1 β . Schließlich wurden die Zellen geerntet, um aus ihnen nukleäre Extrakte herzustellen. Diese Extrakte wurden dann mittels Gelretardierungsassay auf den Aktivierungsstatus von NF- κ B hin untersucht. Auch hier wurde die Sp-1-Bindungsaktivität als Kontrolle von Qualität der Gelretardierungsassays und Gleichmäßigkeit der Proteinladung herangezogen. Als Negativ- und Positivkontrollen wurden zwei Proben ohne Rapamycin-Präinkubation verwendet, wobei die eine mit IL-1 β behandelt wurde und die andere unstimuliert blieb.

In oben beschriebenem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass Rapamycin allein auch in ansteigender Dosis keinen wesentlichen Effekt auf das NF- κ B-Signal hatte, welches konstant im Sinne einer Basisaktivierung blieb (Abb. 11). Aber auch bei den mit IL-1 β stimulierten Proben konnte keine Alteration des Aktivierungsstatus von NF- κ B verzeichnet werden. Das Aktivitätsniveau blieb konstant hoch ohne dabei auch bei steigenden Dosen von Rapamycin beeinflusst zu werden, weder im Sinne einer zusätzlichen Aktivierung, noch im Sinne einer Inhibition.

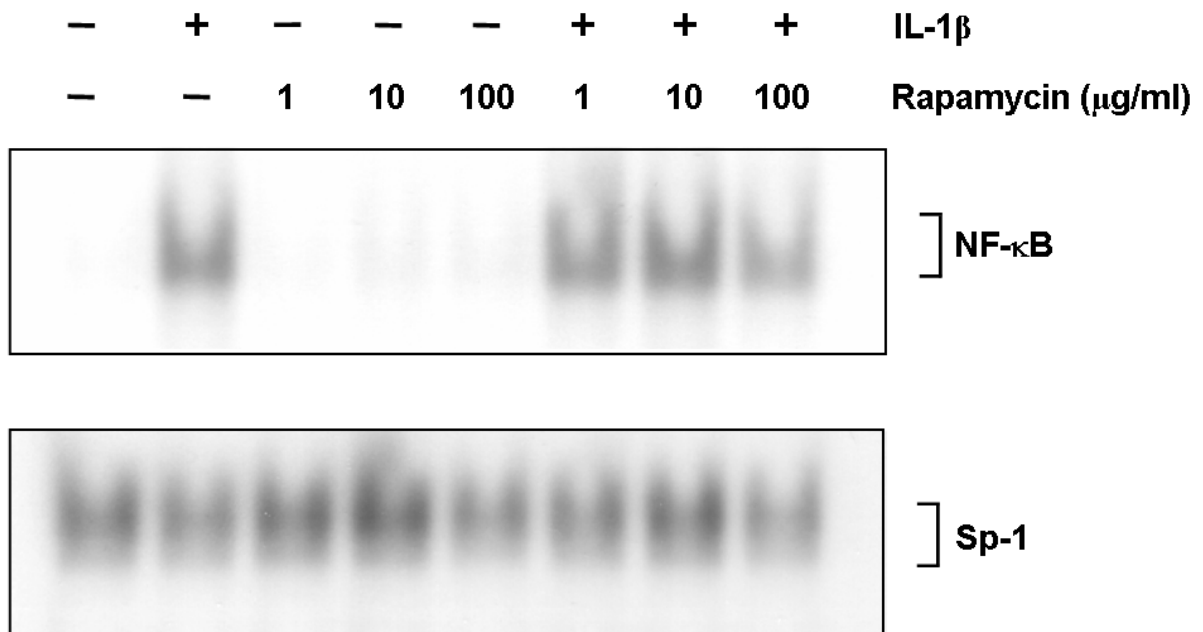


Abbildung 11. Effekt von Rapamycin auf das NF- κ B-System in ECV-Zellen. Die Zellen wurden mit steigenden Dosen von Rapamycin (1; 10; 100 $\mu\text{g/ml}$) für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Hälfte der Zellen mit IL-1 β (100 pg/ml) für 1 h stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet, um daraus nukleäre Extrakte herzustellen. Diese wurden schließlich mittels Gelretardierungsassay auf eine Aktivierung von NF- κ B und Sp-1 hin untersucht.

3.3 Aktivierungsstatus von NF- κ B in der ApoE^{-/-}-Maus

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit sollte der Aktivierungsstatus von NF- κ B bei Arteriosklerose *in vivo* dargestellt werden. Hierzu wurde die ApoE^{-/-}-Maus als etabliertes Modell für Arteriosklerose ausgewählt.

3.3.1 Aktivierung von NF- κ B in Aorta und A. carotis

In dieser Serie von Experimenten wurden ApoE^{-/-}-Mäuse ab der 5. Lebenswoche mit einer speziellen Cholesterin-reichen „westlichen“ Diät gefüttert. Zur Kontrolle wurden diese Mäuse direkt mit Wildtyp-Mäusen verglichen, die ebenfalls ab der 5. Lebenswoche eine Cholesterin-reiche Diät erhielten. Beide Gruppen von Mäusen wurden nach 4 Wochen Fütterung geopfert und folgendermaßen untersucht: *Aorta abdominalis* und *A. carotis* wurden präpariert, entnommen und anschließend schockgefroren. Aus diesen Gefäßproben wurden Extrakte hergestellt, deren nukleäre Fraktionen mittels Gelretardierungsassay auf eine mögliche Aktivierung von NF- κ B und Sp-1 als Kontrolle hin untersucht wurden. Die Auswertung der Gelretardierungsassays erfolgte densitometrisch. Der Aktivierungsstatus berechnete sich aus dem Quotienten aus NF- κ B-Aktivität geteilt durch die zugehörige Sp-1-Bindungsaktivität der jeweiligen Gewebeprobe. Zur Berechnung der relativen NF- κ B-Aktivität wurde das Wildtyp-Signal gleich 1 gesetzt.

Nach 4 Wochen „westlicher Diät“ zeigte sich eine deutliche Aktivierung von NF- κ B in der *Aorta abdominalis* in der ApoE^{-/-}-Maus im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 12). Es konnte in 10 unabhängigen Experimenten gezeigt werden, dass beim Wildtyp das Signal lediglich basal aktiviert war, während bei der ApoE-defizienten Maus eine Aktivierung auf das 3,4-fache dieser Basalaktivität stattgefunden hatte. Die Sp-1-Aktivität war bei beiden Gruppen gleichmäßig im Sinne einer guten Proben- und Ladungsqualität zu bewerten.

In der *A. carotis* war die Situation vergleichbar: Auch hier wurden die ApoE^{-/-}-Mäuse mit Wildtyp-Mäusen (beide gefüttert) verglichen, die nach 4 Wochen geopfert wurden. Die nuklearen Extrakte der präparierten *A. carotis* wurden ebenfalls im Gelretardierungsassay auf eine Aktivierung von NF- κ B und Sp-1 hin untersucht und anschließend densitometrisch ausgewertet (Abb. 13). Der Quotient aus NF- κ B und Sp-1 zeigte eine deutliche Aktivierung von NF- κ B in der ApoE-defizienten Maus im Vergleich zum Wildtyp (relative NF- κ B-Aktivität: 3,6).

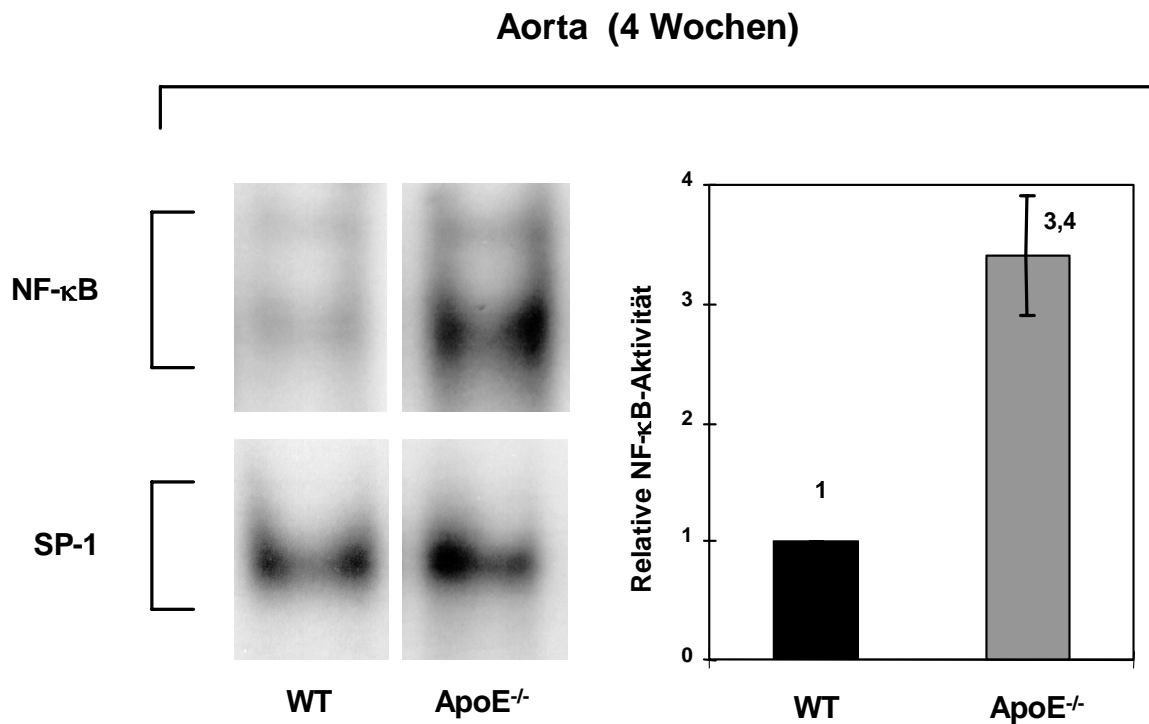


Abbildung 12. NF- κ B-Aktivierung in der *Aorta* der ApoE-defizienten Maus. Nachdem ApoE-defiziente Mäuse und Wildtyp-Mäuse 4 Wochen lang mit einer Cholesterin-reichen Diät gefüttert worden waren, wurden sie geopfert und die *Aorta abdominalis* entnommen. Die nukleären Extrakte dieser Gewebeproben wurden mittels Gelretardierungsassay auf eine Aktivierung von NF- κ B hin untersucht, Sp-1 diente als Ladungskontrolle. Die Auswertung der Assays erfolgte densitometrisch (rechte Seite). Um Ladungsdifferenzen zu berücksichtigen, wurde der Quotient aus NF- κ B-Aktivierung und Sp-1-Aktivierung gebildet. Die relative Aktivierung von NF- κ B in der ApoE-defizienten Mäuse ergab sich, indem das Signal der Wildtyp-Mäuse gleich 1 gesetzt wurde. Das Diagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung (MW \pm SD) 10 unabhängiger Experimente ($p < 0,001$).

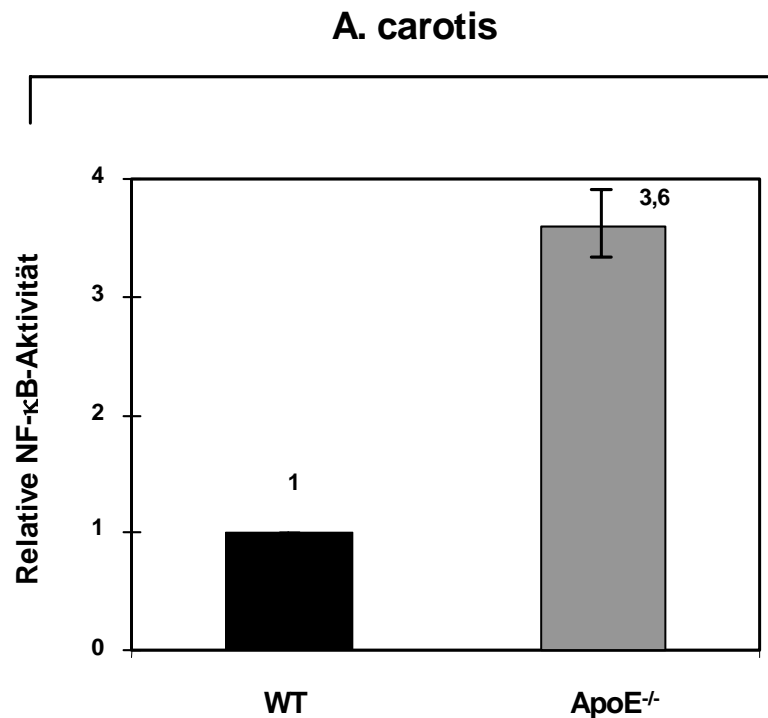


Abbildung 13. NF- κ B-Aktivierung in der *A. carotis* der ApoE-defizienten Maus. ApoE-defiziente Mäuse wurden 4 Wochen lang Cholesterin-reich gefüttert und nach der Opfierung die *A. carotis* präpariert. Auch hier dienten gefütterte Wildtyp-Mäuse als Kontrolle. Mit Hilfe des Gelretardierungsassays wurden die nukleären Gewebeextrakte auf eine Aktivierung von NF- κ B und Sp-1 hin getestet. Die Auswertung erfolgte densitometrisch. Der Quotient aus NF- κ B und Sp-1 der jeweiligen Proben ergab das Aktivierungsniveau. Die relative Aktivierung der ApoE-defizienten Mäuse wurde berechnet, indem die Basalaktivität der Wildtyp-Mäuse gleich 1 gesetzt wurde. Im Diagramm ist der Mittelwert und die Standardabweichung (MW \pm SD) von drei unabhängigen Experimenten gezeigt ($p < 0,001$).

3.3.2 NF- κ B-Aktivierung in der ApoE^{-/-}-Maus im Zeitverlauf

Es wurden nun weitere Experimente über einen längeren Zeitraum durchgeführt, um einen Zeitverlauf der NF- κ B-Aktivierung in der ApoE-defizienten Maus darzustellen.

Um die Aktivierung von NF- κ B im Verlauf der Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen darstellen zu können, wurden ApoE-defiziente Mäuse ab der 5. Lebenswoche über verschieden lange Zeiträume (2, 4, 6, 10, 12 und 14 Wochen) mit einer Cholesterin-reichen Diät gefüttert und anschließend geopfert. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Mäuse, die ebenfalls eine Cholesterin-reiche Diät erhielten und nach 4 Wochen Fütterung geopfert wurden. Nach der Opferung wurde die *Aorta abdominalis* präpariert und aus den gewonnenen Gewebeproben nukleäre Extrakte hergestellt. Die nukleären Gewebeextrakte aus der *Aorta abdominalis* wurden mittels Gelretardierungsassay auf eine mögliche Aktivierung von NF- κ B hin untersucht und die SP-1-Aktivität als Ladungskontrolle verwendet. Die Auswertung der Gelretardierungsassays erfolgte wiederum densitometrisch. Die tatsächliche NF- κ B-Aktivität errechnete sich aus dem Quotienten von NF- κ B und Sp-1 als Korrektur der Ladung. Die relative NF- κ B-Aktivität ergab sich dadurch, dass das Signal der Wildtyp-Kontrolle als Basalaktivität gleich 1 gesetzt wurde. Auf diese Weise konnte ein Zeitverlauf erstellt werden, der frühe (2-6 Wochen) Läsionen wie auch Gefäßveränderungen zu einem späteren Zeitpunkt (10-14 Wochen) erfasst.

Hierbei zeigte sich, dass bereits nach 2 Wochen eine auf das 2,9-fache gesteigerte Aktivierung von NF- κ B in der ApoE-defizienten Maus im Vergleich zum Wildtyp zu sehen war, die sich dann (allerdings mit größeren Schwankungen) weiter steigerte auf bis zu 4,8-fach nach 10 Wochen (Abb. 14). Insgesamt sank die NF- κ B-Aktivität nicht mehr unter ein Niveau von 3,3-fach, so dass man über den gesamten Zeitverlauf von einer deutlich gesteigerten NF- κ B-Aktivität sprechen kann.

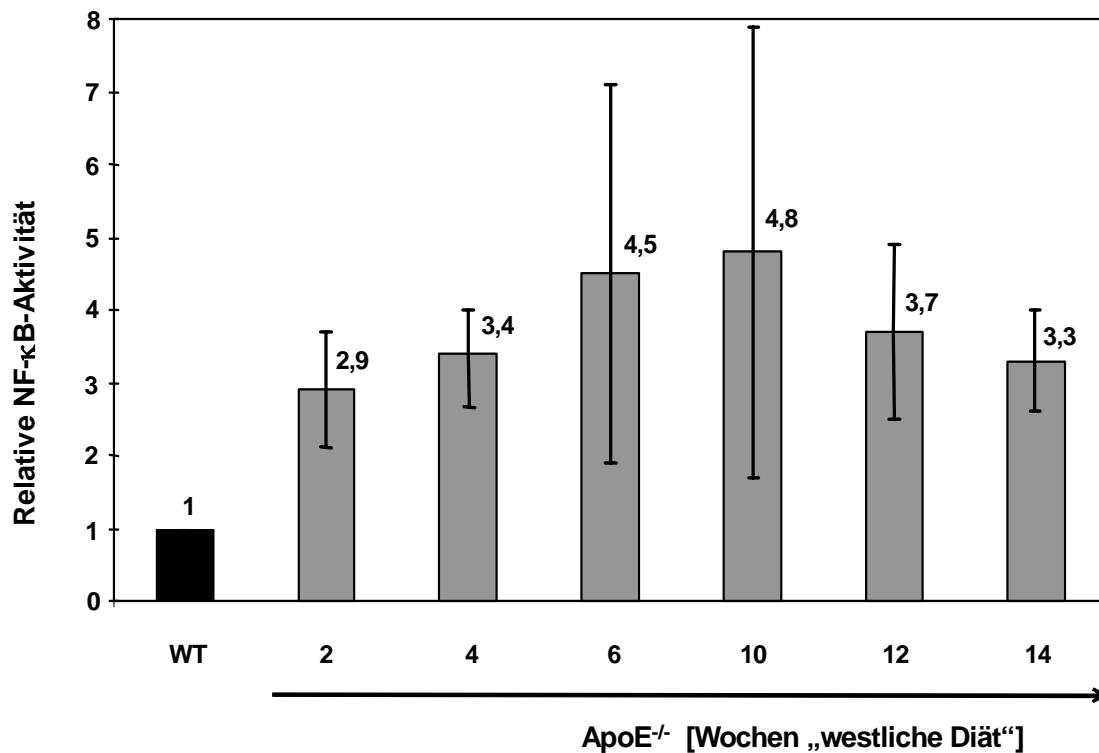


Abbildung 14. Zeitverlauf der NF- κ B-Aktivierung in der *Aorta* der ApoE-defizienten Maus. Gefütterte ApoE-defiziente Mäuse wurden zu den Zeitpunkten 2, 4, 6, 10, 12 und 14 Wochen geopfert und die *Aorta abdominalis* entnommen. Aus den gewonnenen Proben wurden dann nukleäre Gewebeextrakte hergestellt, die anschließend im Gelretardierungsassay bezüglich einer Aktivierung von NF- κ B und Sp-1 hin untersucht wurden. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Mäuse, die nach 4 Wochen Cholesterin-reicher Diät geopfert und wie die ApoE^{-/-}-Gruppe untersucht wurden. Die Auswertung der Assays erfolgte densitometrisch. Das jeweilige Aktivierungsniveau errechnete sich aus dem Quotienten von NF- κ B und Sp-1, die relative NF- κ B-Aktivität aus den Aktivitäten zu jeweils festgelegten Zeitpunkten geteilt durch die Wildtyp-Kontrolle. Zu sehen sind die Mittelwerte und Standardabweichungen folgender Anzahl untersuchter Mäuse: Für den Wildtyp wurden 6 Mäuse verwendet, für ApoE^{-/-}/2 Wochen 4, für ApoE^{-/-}/4 Wochen 10, für ApoE^{-/-}/6 Wochen 5, für ApoE^{-/-}/10 Wochen 2, für ApoE^{-/-}/12 Wochen 2 und für ApoE^{-/-}/14 Wochen 3.

4. Diskussion

4.1 Aktivierung des NF- κ B-Systems durch Thrombozyten

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass aktivierte Thrombozyten das NF- κ B-System in der Endothelzelle aktivieren können (38,39). Dies geschieht möglicherweise durch verschiedene Mediatoren wie z.B. IL-1 β oder CD40-Ligand (38,39,46), die während der Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel freigesetzt werden (38,45,60).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von HUVEC-Endothel-Zellen mit aktivierten Thrombozyten zu einer deutlichen Aktivierung des IKK-Komplexes führte, einer zentralen Schaltstelle des NF- κ B-Systems (57,61). Diese Aktivierung ging zunächst langsam vonstatten, um bei 30 min schließlich einen Höhepunkt zu erreichen und nach 60 min wieder auf das Ausgangsniveau zurück zu kehren. Die Aktivierung des IKK-Komplexes ging mit der Degradierung von I κ B- α und I κ B- ϵ einher. Ein ähnlicher Anstieg der Aktivität des IKK-Komplexes wurde in IL-1 β -stimulierten Endothelzellen gefunden, was die Vermutung untermauert, dass dieses Zytokin ein Bestandteil des von Thrombozyten freigesetzten Cocktails ist, der für die Aktivierung von NF- κ B verantwortlich gemacht wird (38). Die Unterschiede der Thrombozyten- und der IL-1 β -induzierten Aktivierungsmuster (IL-1 β : Höhepunkt bei 45 min; die Aktivierung ist auch nach 90 min noch nicht voll auf den Ausgangswert zurückgekehrt) könnte auf eine unterschiedliche Effizienz des durch Thrombozyten freigesetzten „Cocktails“ (IL-1 β zusammen mit PDGF, VEGF, Thromboxan, CD40-Ligand und MIP-1 α u.a.) im Vergleich zu rekombinantem IL-1 β zurückzuführen sein (117). Ein vollkommen anderes Aktivierungsmuster des IKK-Komplexes wurde bei der Inkubation von HUVEC-Zellen mit TNF gefunden. Hier zeigte sich eine viel stärkere, aber dafür kürzere Aktivierung des IKK-Komplexes. Eine Erklärung für diesen andersartigen Effekt könnte sein, dass TNF, nachdem es an seinen Rezeptor gebunden hat, einen relativ kompakten Weg mit Rekrutierung einer begrenzten Anzahl von Signalproteinen wählt, bei dem der IKK-Komplex auf direktem Weg aktiviert wird (7). Auf der anderen Seite führt IL-1 β , ähnlich wie LPS (35), und vermutlich auch zumindest einige der Thrombozyten-Produkte, zu einer zeitaufwendigeren Schritt-für-Schritt-Aktivierung von Wegen, die zur Aktivierung des IKK-Komplexes führen, an der eine ganze Kaskade von Signal-Molekülen beteiligt ist (61). Man könnte argumentieren, dass der IKK-Weg lediglich einen von vielen parallelen Signalwegen darstellt, der durch Thrombozyten oder IL-1 β zur Aktivierung von

NF- κ B führt. Tatsächlich ist bekannt, dass von den oben genannten Stimuli das Zytokin IL-1 β in der Lage ist, auch andere Kaskaden in Endothelzellen zu aktivieren, z.B. die MAP-Kinase p38 (27,106,108).

Des Weiteren gibt es Strategien, bei denen Zellen mit inhibitorischen Oligonukleotiden transfiziert worden waren und anschließend mit aktivierten Thrombozyten inkubiert wurden, was zu einer signifikanten Inhibition der MCP-1- und auch der ICAM-1-Produktion führte (39). Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Hemmung von IL-1 β oder CD40-Ligand durch blockierende monoklonale Antikörper die Thrombozyten-induzierte Aktivierung des Endothels substantiell reduziert werden konnte (38,46). Die Blockierung IL-1 β -induzierter Signalübertragung, etwa durch den IL-1 β -RA (Rezeptor-Antagonist), inhibiert die Thrombozyten-induzierte NF- κ B-Aktivierung deutlich (38). Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass die Überexpression von dominant-negativem IKK- β_{KA} oder NIK $_{KA}$ die durch Thrombozyten oder IL-1 β aktivierte κ B-, MCP-1- oder VCAM-1-Promoter-abhängige Transkription signifikant reduzieren, während sich IKK- α_{KA} hierbei weniger effizient zeigte. Das impliziert, dass sowohl IKK- β wie auch NIK bei der Aktivierung von NF- κ B durch Thrombozyten eine bedeutende Rolle spielen. Während eine Beteiligung von IKK- β für inflammatorische und apoptotische Prozesse postuliert wird, bleibt die Funktion von IKK- α weniger klar definiert. Es wird jedoch vermutet, dass IKK- α bei Differenzierungs- und Proliferationsprozessen eine Rolle spielt (57,61). NIK könnte eine Komponente von IKK-Subkomplexen darstellen, die spezifisch durch Thrombozyten aktiviert werden und deren Zusammensetzung sich von der klassischen IKK-Variante unterscheidet (35,57).

Es wurde nachgewiesen, dass sowohl eine transiente wie auch eine permanente Interaktion von Thrombozyten mit Endothelzellen eine Expression von NF- κ B-Zielgenen zur Folge hat. Eines dieser Zielgene ist MCP-1, ein C-C-Chemokin, welches ein potenter Faktor für die Chemotaxis von Monozyten ist und reichlich in arteriosklerotisch verändertem Gewebe zu finden ist (81,93). Die Thrombozyten-induzierte Sekretion von MCP-1 durch Endothelzellen, die von der Expression von Adhäsionsmolekülen gefolgt wird, könnte einen initialen Schritt arteriosklerotischer Prozesse darstellen. Auf diese Weise wäre ein Mechanismus vorstellbar, bei dem Monozyten zuerst angezogen und dann an das Endothel adhären würden, um dann durch das Endothel hindurch zu migrieren (110) (Abb. 15).

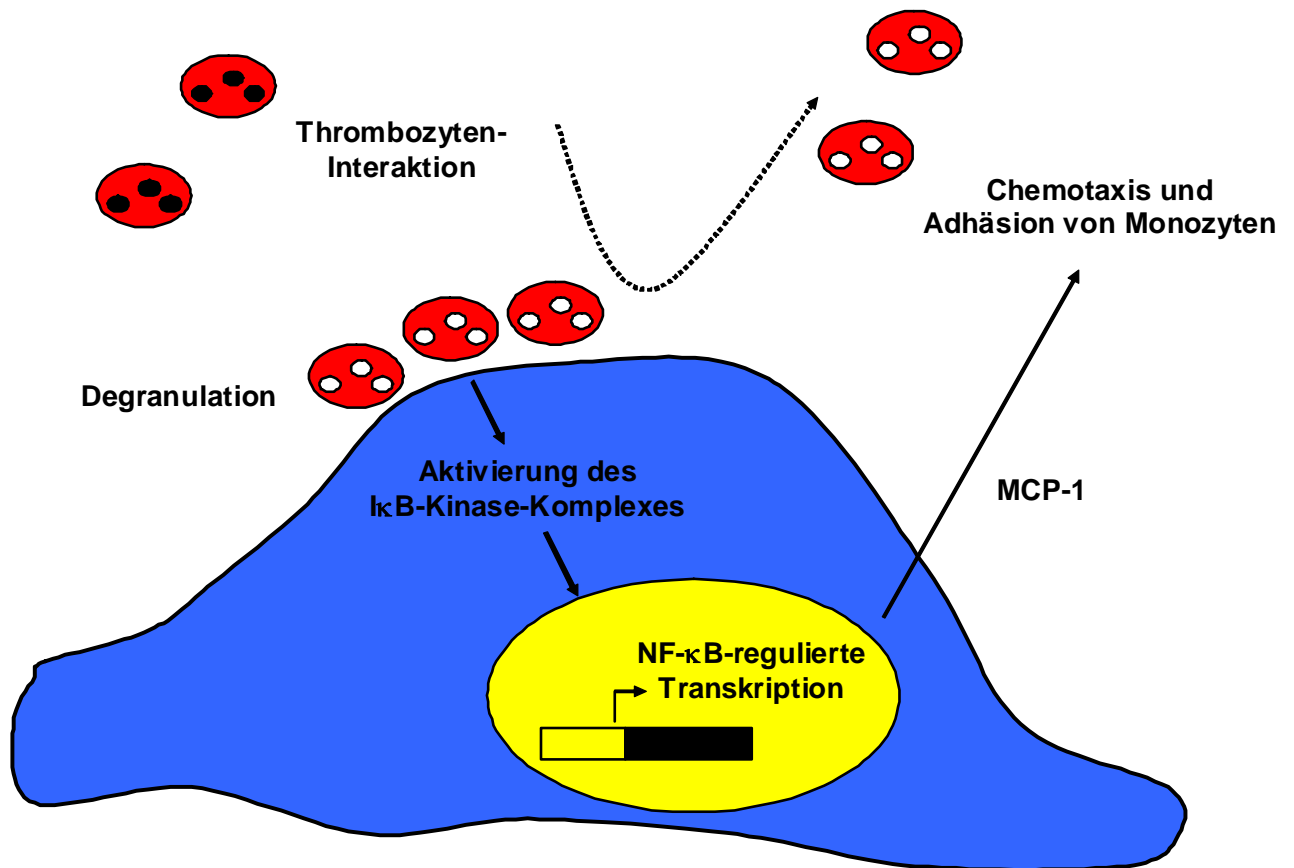


Abbildung 15. NF- κ B-regulierte Genexpression in der Endothelzelle. Durch eine direkte Interaktion von Thrombozyten mit dem aktivierten Endothel kommt es zur Entleerung der thrombozytären Granula. Die Sekretion von u.a. IL-1 β führt zu einer Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes. Es kommt nun zur Aktivierung NF- κ B-vermittelter Transkription, die zu einer Induktion bzw. Modulation bestimmter Zielgene wie MCP-1 führt. Durch die nachfolgende Sekretion von MCP-1 wiederum kommt es zur Chemotaxis von Monozyten, gefolgt von deren Adhäsion an das Endothel. Diese Interaktion führt letztlich dazu, dass die Entzündungsreaktion in der Gefäßwand aufrecht erhalten wird. Die entsprechenden Literaturstellen sind im Text angegeben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die gefundenen Erkenntnisse andeuten, dass IKK- β eine Schlüsselrolle in der Regulation der Thrombozyten-induzierten MCP-1-Sekretion durch das Endothel spielt. Außerdem deuten die Ergebnisse dieser Arbeit an, dass durch die Interaktion aktivierter Thrombozyten mit dem Endothel eine andauernde Entzündungsreaktion, die durch die Aktivierung des NF- κ B-Systems mitbedingt ist, getriggert werden kann. Dies könnte ein bedeutender Mechanismus sein, wobei Thrombozyten die endotheliale Aktivierung *in vivo* modulieren und so zu frühen Prozessen der Arteriosklerose, aber auch zu fortgeschritteneren Ereignissen in diesem Zusammenhang beitragen, darunter die Entstehung von Plaques und deren daraus folgende Komplikationen. Die spezifische Inhibition der Thrombozyten-induzierten Signalwege könnte einen Ansatzpunkt für präventive Strategien im Bereich der Bekämpfung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen.

4.2 Effekt von Nikotin, Nandrolon und Rapamycin auf das NF- κ B-System

Das Zigarettenrauchen gilt als ein gesicherter Risikofaktor für Arteriosklerose und ihre Folgeerkrankungen (24,49,123). In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Zigarettenrauch verschiedene Zelltypen, die am arteriosklerotischen Geschehen beteiligt sind (Endothelzellen, Makrophagen und Thrombozyten), aktivieren kann (63,65,66,76,95,129). Insbesondere durch das Kondensat, also den nicht gasförmigen Anteil des Zigarettenrauchs, kommt es zu einer Aktivierung von NF- κ B in kultivierten Endothelzellen, was zu einer Expression verschiedener Zielgene führt (darunter Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1) (59,63,103). Es konnte außerdem auch *in vivo* bei Versuchstieren und beim Menschen nachgewiesen werden, dass es durch Zigarettenrauch zu einer vermehrten Expression NF- κ B-regulierter Adhäsionsmoleküle kommt (63,69,70,71). Bei Probanden, deren Blutmonozyten direkt nach dem Zigarettenrauchen gewonnen wurden, zeigte sich, dass es aufgrund einer gesteigerten Expression des Adhäsionsmoleküls CD11b zu einer verstärkten Adhäsionsneigung dieser Blutmonozyten kam. Die Expression von CD11b ist NF- κ B-reguliert (98,131). Ferner konnte demonstriert werden, dass Plasma, welches direkt nach dem Zigarettenrauchen gewonnen wurde, in der Lage ist Thrombozyten zu aktivieren (11). Auf diese Weise kann es zu der in dieser Arbeit untersuchten und bereits dargestellten Interaktion von Thrombozyten mit dem Endothel kommen. Da der Zigarettenrauch aus vielen verschiedenen Bestandteilen zusammengesetzt ist, stellt sich natürlich die Frage, welche speziellen Inhaltsstoffe für das arteriosklerotische Potential dieses Genussmittels

verantwortlich zu machen sind. Nikotin als einer der wichtigsten Bestandteile, wurde in dieser Arbeit für besonders interessant erachtet. Es zeigte sich jedoch, dass Nikotin NF- κ B in Endothelzellen zwar aktivieren kann, jedoch in weitaus höheren Konzentrationen als bei einem Raucher direkt nach dem Zigarettenrauchen im Blut gefunden werden: „Physiologisch“ finden sich hier Werte um etwa 4 ng/ml (109), während in den Experimenten dieser Arbeit erst Effekte bei Nikotinwerten auftraten, die mindestens um das 10000-fache höher lagen. Diese Ergebnisse machen die Hypothese, dass Nikotin allein einen direkten NF- κ B-aktivierenden Effekt in Endothelzellen hat, eher unwahrscheinlich. Jedoch liegt die Vermutung nahe, dass es das Zusammenspiel der verschiedenen Inhaltsstoffe ist, welches für die Aktivierung des NF- κ B-Systems verantwortlich zu machen ist (1) und dabei möglicherweise bei der Entstehung und Progression arteriosklerotischer Prozesse eine Rolle spielt.

Nandrolon als ein anaboles Steroid stellt ebenfalls einen Risikofaktor für die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen dar (90). Die Mechanismen, die sich dahinter verbergen, sind jedoch noch teilweise unklar. Ein möglicher Aspekt könnte eine ungünstige Beeinflussung des Lipidstoffwechsels sein, wodurch es zur Schaffung eines pro-arteriosklerotischen Milieus kommt. Es konnte gezeigt werden, dass es bei Probanden, die regelmäßig anabole Steroide konsumierten, bereits nach wenigen Monaten zu einer Senkung des HDL-Spiegels um über 25% kam. Allerdings können sich diese veränderten Spiegel bereits nach wenigen Wochen Abstinenz wieder normalisieren (68). Außerdem kommt es durch den Missbrauch von anabolen Steroiden zu einer Erhöhung des arteriellen Blutdrucks, wobei hier insbesondere der diastolische Wert steigt (68). Es stellte sich für uns auch hier die Frage, ob der arteriosklerotische Effekt anaboler Steroide auch auf direkte Wirkungen auf das Endothel über eine Aktivierung des NF- κ B-System zurückzuführen sein könnte. Es zeigte sich allerdings, dass Nandrolon in unseren Experimenten nicht in der Lage war, das NF- κ B-System in der Endothelzelle *in vitro* zu aktivieren. Weder „physiologische“ Dosen, wie sie bei Sportlern gefunden werden, die einen regelmäßigen Nandrolon-Abusus betreiben, noch Dosen, die diese um mehrere Zehnerpotenzen übersteigen, konnten die NF- κ B-Aktivität signifikant erhöhen. Diese Tatsache legt auch hier wieder den Verdacht nahe, dass es sich um komplexere und vor allem indirekte Mechanismen, wie etwa die Veränderung des Lipidprofils im Blut, handeln muß. Zuletzt sei in Bezug auf anabole Steroide noch darauf hingewiesen, dass diese nicht nur eine Gefährdung der Gesundheit durch ihre arteriosklerotischen Effekte darstellen, sondern noch andere gravierende unerwünschte Wirkungen aufweisen. So kann es durch anabole Steroide zur Entwicklung maligner

Lebertumoren, darunter Cholangiocarcinom und hepatizelluläres Carcinom kommen (128). Insgesamt ist also zu sagen, dass die vermeintlich positiven Effekte anaboler Steroide (Muskelwachstum, gesteigerte Leistungsfähigkeit im Kraftbereich) überschattet sind von den Nebenwirkungen, die sich allerdings meist erst nach längerer Zeit manifestieren.

Rapamycin (Sirolimus) ist ein Makrolid mit anti-proliferativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften (42,64). In der Kardiologie wird es erfolgreich bei Interventionen an den Herzkranzarterien eingesetzt, um das Risiko für das Auftreten von Restenosen zu verhindern (89,119). Bezüglich des Wirkungsmechanismus von Rapamycin ist noch relativ wenig bekannt. Man hat bereits herausgefunden, dass dieses Immunsuppressivum ein spezifischer Inhibitor des mTOR („mammalian target of rapamycin“)/ribosomale p70-S6-Kinase-Wegs ist (29,42). Rapamycin wirkt auf der Ebene der Translation (33) und kann in arteriosklerotischen Läsionen die Chemotaxis und Migration von neutrophilen Granulozyten inhibieren (42). Für uns stellte sich hierbei die Frage, ob die gefäßprotektiven Eigenschaften von Rapamycin möglicherweise auch über eine Modulation des NF- κ B-Systems zustande kommen könnten, da es bereits Hinweise dafür gibt, dass Rapamycin das NF- κ B-System beeinflussen kann: In Experimenten an Hepatozyten der Ratte konnte gezeigt werden, dass die LPS-induzierte Aktivierung des NF- κ B-Systems durch Rapamycin zumindest teilweise gebremst wird (127). Auf diese Weise könnte durch Rapamycin vielleicht nicht nur das Wiederauftreten arteriosklerotischer Komplikationen verhindert werden, sondern auch entzündliche Prozesse bei der Entstehung arteriosklerotischer Gefäßläsionen bereits im Vorfeld verhindert werden. In unseren Experimenten konnte jedoch eine direkte Modulation des NF- κ B-System in der Endothelzelle durch Rapamycin *in vitro* nicht nachgewiesen werden. Warum Rapamycin in frühen Stadien der Arteriosklerose keine entscheidende Rolle zu spielen scheint bleibt unklar, zumal hier bereits die Migration von Entzündungszellen stattfindet, die durch Rapamycin bekanntlich inhibiert werden kann (42). Es sollte noch erwähnt werden, dass Rapamycin nicht nur in der interventionellen Kardiologie zum Einsatz kommt, sondern z.B. auch in der Transplantationsmedizin (21,64,82) angewandt wird und Bestandteil des therapeutischen Regimes in der Behandlung von Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis ist (wie etwa der rheumatoiden Arthritis) (36).

4.3 Aktivierungsstatus von NF- κ B *in vivo* bei Arteriosklerose

Um den Aktivierungsstatus von NF- κ B *in vivo* bei arteriosklerotischen Gefäßveränderungen zu untersuchen, wurden weitere Experimente in der ApoE^{-/-}-Maus durchgeführt.

Mit duplexsonographischen Methoden, welche eine Steigerung des arteriellen Widerstandsindex messen können, konnte gezeigt werden, dass bereits sehr früh nach 2-6 Wochen nach Beginn einer Cholesterin-reichen Diät erste diskrete Veränderungen des arteriellen Gefäßsystems in der ApoE^{-/-}-Maus auftreten (85). Etwa 10 Wochen nach Beginn der Diät kommt es zu signifikanten Verhärtungen der Gefäße, was makroskopisch mittels Ölfärbung und histologisch mittels Hämatoxylin/Eosin-Färbung zu objektivieren war. In der vorliegenden Arbeit konnte man interessanterweise feststellen, dass bereits in einer frühen Phase (nach 4 Wochen) eine erhöhte Aktivität von NF- κ B in Gewebeproben von *Aorta* und *A. carotis* im Gelretardierungsassay zu finden war. Bei der Betrachtung des NF- κ B-Aktivierungsstatus im Zeitverlauf zeigte sich eine erhöhte Aktivität auch zu späteren Zeitpunkten, was im Sinne einer „chronischen Aktivierung“ interpretiert werden könnte. Bei der immunhistologischen Analyse dieser Gewebeproben zeigte sich hierbei ein signifikanter Anstieg der Expression der NF- κ B-regulierten Zielgene MCP-1 und VCAM-1 (85).

Trotz der vielen Vorteile des ApoE^{-/-}-Mausmodells in Bezug auf die Erforschung arteriosklerotischer Veränderungen sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass es auch andere *In vivo*-Modelle gibt, die für die Erforschung dieses Themenkomplexes relevant sein könnten. Beispielsweise existieren transgene Mäuse, die einen Defekt im LDL-Rezeptor aufweisen (31). Hierbei handelt es sich um einen Defekt, der beim Menschen der klassischen familiären Hypercholesterinämie Fredrickson Typ IIa entspricht, einer hereditären Fettstoffwechselstörung, bei der es zu einer massiven Erhöhung des LDL-Cholesterins und zu einer Erniedrigung des HDL-Spiegels im Blut kommt (48). Es konnte gezeigt werden, dass auch bei solchen Mäusen eine erhöhte Aktivität des NF- κ B-Systems in den Gefäßen der Tiere vorliegt (26). Außerdem deuten Experimente mit humanen Monozyten an, dass die Wirksamkeit von „Statinen“ in der Therapie der Hypercholesterinämie nicht nur über eine Senkung der Lipidspiegel im Blut vermittelt wird, sondern dass auch ein entzündungshemmender Effekt über eine Inhibition des NF- κ B-Systems im Hinblick auf die Gefäßintegrität von Bedeutung ist (51). Hierbei sei noch angemerkt, dass nicht alle „Statine“ gleichermaßen in der Lage sind, die Aktivierung von NF- κ B zu hemmen. Das im Jahre 2002 vom Markt genommene Cerivastatin zeigte sich hierbei am potentesten, während mit Fluvastatin die „schlechtesten“ Ergebnisse erzielt wurden. Im mittleren Bereich anzusiedeln

waren Atorvastatin, Simvastatin, Pravastatin und Lovastatin (51). Es wurden in diesem Zusammenhang aber auch andere bekanntermaßen gefäßprotektiven Therapeutika untersucht, darunter Aspirin. Es konnte gezeigt werden, dass Aspirin in niedriger Dosierung nicht nur aggregationshemmend auf Thrombozyten wirkt, sondern in der LDL-Rezeptor-Knockout-Maus eine Herabregulation des NF- κ B-Systems bewirken kann (26). Diese Beeinflussung des Systems findet vermutlich auf der Ebene der Bindung von NF- κ B an die DNA statt (141).

In arteriosklerotischen Läsionen in der *A. femoralis* von Kaninchen konnte eine erhöhte Aktivität von NF- κ B und eine erhöhte Expression von MCP-1 festgestellt werden. Durch den ACE-Hemmer Quinapril wurde ein inhibitorischer Effekt auf das NF- κ B-System und die Expression von MCP-1 *in vivo* nachgewiesen (47,48). Man könnte diese Ergebnisse dergestalt interpretieren, dass ACE-Hemmer nicht nur über eine Regulation des Vasotonus protektiv auf das Gefäßsystem wirken, sondern auch über eine Modulation des NF- κ B-Systems. Bisher war nur bekannt, dass es durch ACE-Hemmer zu einem sog. „remodeling“ kommt, das heißt zu einem günstigeren Umbau in der Gefäßarchitektur (135). Für diesen Effekt wird die Inhibition von TGF- β 1 (transforming growth factor) verantwortlich gemacht, der über Angiotensin (AT) II, dessen Bildung durch ACE-Hemmer inhibiert wird (62), zu einem fibrotischen Umbau der Gefäßwand führt (135).

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse der Experimente mit den ApoE^{-/-}-Mäusen konnten deutlich machen, dass es tatsächlich Anhaltspunkte *in vivo* gibt, dass aktiviertes NF- κ B bei der Entstehung und Progression arteriosklerotischer Läsionen eine wichtige Rolle spielt. Des weiteren liefern die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unter Verwendung von *In vivo*-Modellen ebenfalls Hinweise, dass NF- κ B einen entscheidenden Faktor im Zusammenhang mit arteriosklerotischer Gefäßveränderungen darstellt.

4.4 Dysregulation von NF- κ B bei Arteriosklerose

Arteriosklerose wird als eine chronische Erkrankung angesehen, die als eine entscheidende Komponente ein entzündliches Geschehen aufweist. Eine solche Entzündungsreaktion, sobald sie einmal in Gang gesetzt wurde, hat eine starke Neigung zur Chronifizierung. Es ist bemerkenswert, dass CRP (C-reaktives Protein), ein Indikator für Entzündungsreaktionen, als ein neuer Parameter zur Einschätzung des Risikos, einen Myokardinfarkt zu entwickeln, herangezogen wird (75,76). In diesem Zusammenhang werden Hinweise immer deutlicher, dass NF- κ B, als ein mit Entzündung assoziierter Transkriptionsfaktor, bei der Genese der

Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielt (6,9,75). Aktiviertes NF- κ B wurde in verschiedenen Zelltypen in der arteriosklerotischen Läsion identifiziert, unter anderem in Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen (16). In diesen Läsionen sind zahlreiche Substanzen zu finden, die zumindest *in vitro* in der Lage sind, das NF- κ B-System in diesen Schlüsselzellen der Arteriosklerose zu modulieren (9,14,15,17) (Abb. 16); darunter TNF, IL-1 β , oxidiertes LDL (oxLDL), bakterielle Produkte (z.B. *Chlamydia pneumoniae*), Viren (z.B. CMV), aktivierte Thrombozyten, Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF), Thrombin, Fibronectin, glykosylierte Proteine, Sauerstoffradikale oder Angiotensin-II (AT-II) (3,25,32,35,38,39,67,94,102,104,105,120,121). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression einer ganzen Reihe von Genprodukten, von denen man annimmt, dass sie sowohl in der frühen arteriosklerotischen Läsion als auch bei späteren Prozessen eine Rolle spielen, durch NF- κ B in den Schlüsselzellen der Arteriosklerose reguliert werden (23,75). Zu diesen Genprodukten zählen Zytokine und Chemokine wie etwa TNF und IL-1 β , die für eine anhaltende Aktivierung von NF- κ B sorgen, IL-8 und MCP-1, die chemotaktisch weitere Zellen anlocken können, Adhäsionsmoleküle wie etwa ICAM-1, VCAM-1 und ELAM, Wachstumsfaktoren (M-CSF, GM-CSF), TF (verantwortlich für die Thrombogenese) und Proteasen (z.B. MMP-9) (5,9,12,23,30,39,41,76,77,91,98,124,130,136). Es sollen nun noch einige Zusammenhänge zwischen NF- κ B und bekannten Risikofaktoren der Arteriosklerose exemplarisch diskutiert werden.

Der Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, bei der es zur Glykosylierung von Proteinen durch die hohen Blutzuckerspiegel kommt (115,130). Für diese glykosylierten Proteine (AGE, „advanced glycolation products“) konnte gezeigt werden, dass ihre Bindung an spezifische Zellrezeptoren (RAGE) oxidativen Stress in Endothelzellen auslöst, was zu einer Aktivierung von NF- κ B und damit zu einer gesteigerten Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1, VCAM-1 und ELAM), TF (Tissue factor) und anderen NF- κ B-Zielgenen führt (10,120).

Auch die arterielle Hypertonie ist eine chronische Erkrankung, die mit einem höheren Risiko für die Entwicklung arteriosklerotischer Veränderungen der Gefäße einhergeht (49). Bei vielen Patienten mit Hypertonie konnten erhöhte Werte von Angiotensin-II im Serum nachgewiesen werden (110). Die Bindung von Angiotensin-II an seinen spezifischen Rezeptor führt zu einer direkten Aktivierung von NF- κ B (67). Darüber hinaus steht die Transkription von Angiotensinogen, dem Vorläuferprotein von Angiotensin-II, unter der Kontrolle von NF- κ B (73).

Bei der Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen gibt es besondere Stellen im Gefäß, an denen bevorzugt solche Schäden entstehen. Zu diesen Prädilektionsstellen gehören die Bifurkationen der Arterien und starke Gefäßkrümmungen, an denen besonders turbulente Strömungsverhältnisse herrschen (44,56). Zwar sind die Effekte dieser physikalischen Phänomene auf die Signalübertragung der Endothelzelle noch nicht hinreichend untersucht, aber dennoch zeigen verschiedene Zellkulturstudien, dass solche mechanischen Kräfte verschiedene Transkriptionsfaktoren (u.a. NF- κ B) induzieren und ein Milieu, charakterisiert durch oxidativen Stress, in der Zelle auslösen (78,92).

Zusammengefasst ist festzustellen, dass NF- κ B bei der Regulation zahlreicher funktionell relevanter Gene sowohl in frühen wie auch in fortgeschrittenen Stadien der Arteriosklerose entscheidend beteiligt sein könnte. Das NF- κ B-System ist jedoch nicht nur in Bezug auf arteriosklerotische Geschehnisse von Bedeutung, sondern spielt auch bei anderen akut- oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie etwa Sepsis, entzündliche Magen-Darm- oder Hauterkrankungen und rheumatoide Arthritis eine bedeutende Rolle (4).

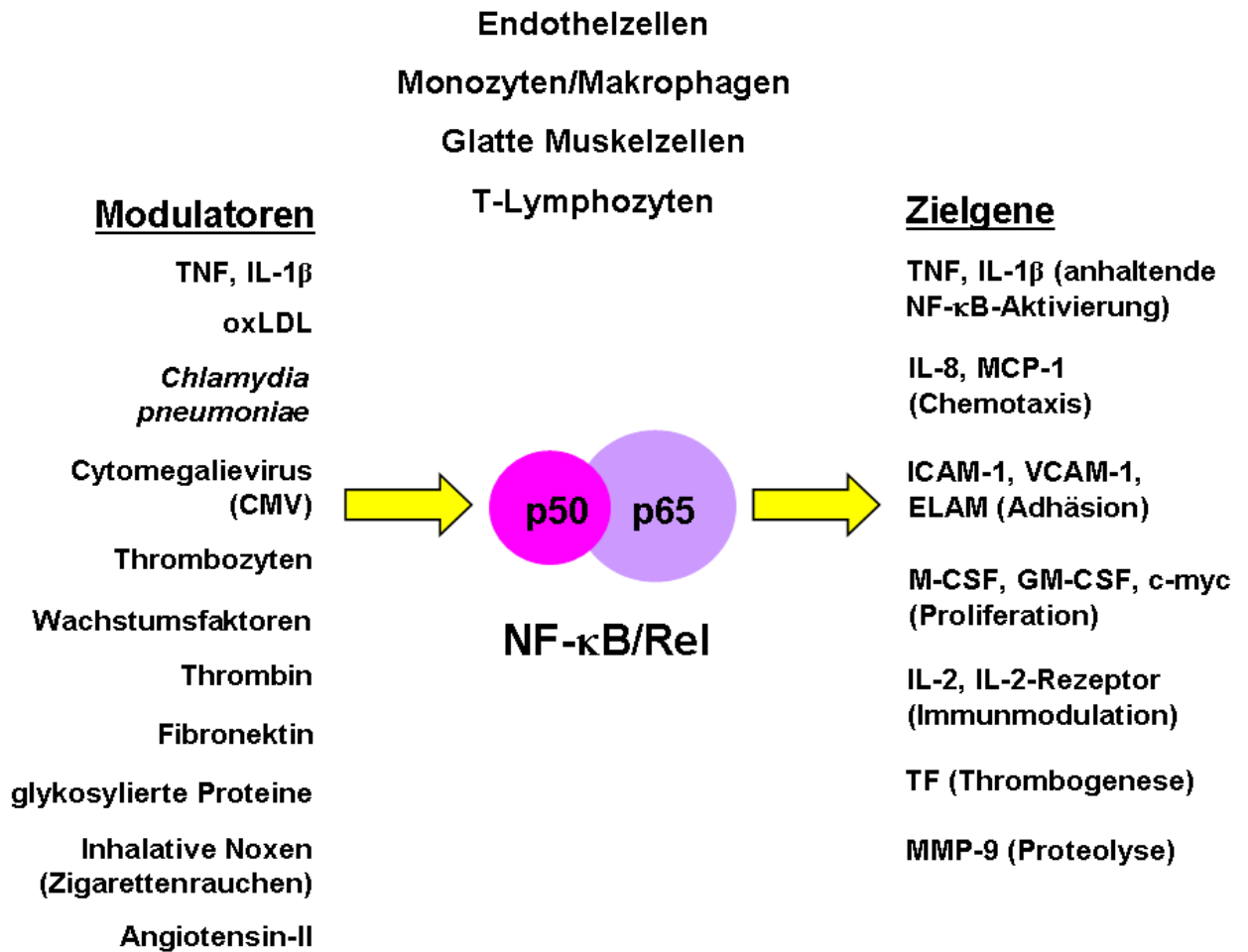


Abbildung 16. Dysregulation von NF- κ B bei Arteriosklerose. Auf der linken Seite sind wichtige Stimuli gezeigt, die in der Lage sind NF- κ B in den bei der Arteriosklerose relevanten Zelltypen (Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen, glatte Muskelzellen und T-Lymphozyten) zu aktivieren. Auf der rechten Seite sind mehrere potentielle Zielgene gezeigt, deren Expression durch NF- κ B/Rel in der arteriosklerotischen Läsion reguliert werden könnte. In Klammern sind darunter jeweils mögliche funktionelle Konsequenzen dargestellt. Die entsprechenden Literaturstellen sind im Text angegeben.

5. Zusammenfassung

NF- κ B/Rel-Transkriptionsfaktoren spielen eine zentrale Rolle bei entzündlichen und immunologischen Prozessen sowie bei Proliferation und Apoptose. Bei der Aktivierung des NF- κ B-Systems ist der IKK-Komplex als wichtige regulatorische Einheit zu betrachten, die über mehrere Zwischenschritte einen Abbau der I κ B-Inhibitorproteine und damit eine nukleäre Translokation des NF- κ B-Dimers ermöglicht. Es wird angenommen, dass sowohl bei entzündlichen wie auch bei malignen Erkrankungen eine Dysregulation von NF- κ B vorliegt. In dieser Arbeit sollten besonders die inflammatorischen Aspekte der Arteriosklerose und die Bedeutung von NF- κ B in diesem Zusammenhang genauer untersucht werden.

Im ersten Teil wurde der Effekt von Thrombozyten auf das NF- κ B-System mit Schwerpunkt auf dem IKK-Komplex untersucht. Aktivierte Thrombozyten waren in der Lage das NF- κ B-System in der Endothelzelle zu aktivieren. Dabei kam es zu einer Proteolyse der Inhibitorproteine I κ B- α und I κ B- ϵ und schließlich zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes. Im Vergleich dazu wurde nach Stimulation mit IL-1 β ein ganz ähnliches Aktivierungsmuster beobachtet, während TNF als Stimulus eine viel schnellere Induktion der IKK-Aktivierung bewirkte. Zuletzt wurde noch die Rolle von IKK- β und NIK bei der Thrombozyten-induzierten NF- κ B-Aktivierung hervorgehoben.

Um auch andere Faktoren für die Entstehung und Progression, aber auch Modulation arteriosklerotischer Läsionen in Betracht zu ziehen wurden noch drei weitere Substanzen in diesem Zusammenhang auf eine mögliche Beeinflussung des NF- κ B-Systems in Endothelzellen hin untersucht. Nikotin als ein klassischer Risikofaktor konnte nur in sehr hohen Dosen eine Aktivierung des NF- κ B-Systems bewirken. Nandrolon als anaboles Steroid zeigte auch in hoher Dosierung keinen Effekt auf den Aktivierungsstatus von NF- κ B. Zuletzt wurde noch Rapamycin, eine immunsuppressiv- und möglicherweise auch gefäßprotektiv-wirkende Substanz untersucht. Auch hier zeigte sich selbst in hohen Dosen kein Effekt auf das NF- κ B-System.

Zuletzt sollte noch der Aktivierungsstatus von NF- κ B *in vivo* in arteriosklerotischen Läsionen gezeigt werden. Das Modell der ApoE^{-/-}-Maus stellte sich für diese Zwecke als geeignet heraus. Es konnte eine erhöhte NF- κ B-Aktivität in arteriosklerotischen Läsionen von *Aorta* und *A. carotis* der ApoE^{-/-}-Maus *in vivo* nachgewiesen werden. Die Aktivierung von NF- κ B wurde in weiteren Experimenten im Zeitverlauf dargestellt. Diese Ergebnisse weisen

auf eine permanente Aktivierung des NF- κ B-Systems unter diesen Bedingungen hin, was auf ein chronisch-entzündliches Geschehen in diesem Modell hindeutet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wichtige Hinweise für eine bedeutende Rolle von NF- κ B bei der Entstehung und Progression arteriosklerotischer Läsionen liefern. Das immer bessere Verständnis der molekularen Mechanismen der Regulation des NF- κ B/Rel-Systems sollten zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien in der Arteriosklerose-Forschung führen.

6. Literaturverzeichnis

1. Anto RJ, Mukhopadhyay A, Shishodia S, Gairola CG, Aggarwal BB. Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor- κ B through phosphorylation and degradation of I κ B- α : correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1511-18.
2. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: Ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20.
3. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-79.
4. Baldwin AS Jr. Series introduction: the transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Invest* 2001; 107: 3-6.
5. Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Tumor necrosis factor gene expression in human vascular smooth muscle cells detected by *in vitro* hybridization. *Am J Pathol* 1990; 137: 503-09.
6. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-71.
7. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 372-77.
8. Bender K, Gottlicher M, Whiteside S, Rahmsdorf HJ, Herrlich P. Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF- κ B by UV. *EMBO J* 1998; 17: 5170-81.
9. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: Basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 1995; 91: 2488-96
10. Bierhaus A, Schiekofler S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, 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 AM, Stern DM, Haring HU, Schleicher E, Nawroth PP. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor- κ B. *Diabetes* 2001; 50: 2792-808.
11. Blache D. Involvement of hydrogen and lipid peroxides in acute tobacco smoking-induced platelet hyperactivity. *Am J Physiol* 1995; 268: 679-85.
12. 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* 1997; 272: 15817-24.

13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
14. Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page S, Hass M, Gerling A, Kaltschmidt C, Neumann FJ, Mackman N, Baeuerle PA, Walli AK, Neumeier D. Dysregulation of monocytic nuclear factor- κ B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1901-9.
15. Brand K, Fischer C, Donath B, Baumgartner B, Neumeier D. Dysregulation des NF-kappaB-Systems bei Arteriosklerose. *Die medizinische Welt* 1999; 50: 316-20.
16. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor- κ B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996; 97: 1715-22.
17. Brand K, Page S, Walli AK, Neumeier D, Baeuerle PA. Role of nuclear factor- κ B in atherogenesis. *Exp Physiol* 1997; 82: 297-304.
18. Burns DM. Epidemiology of smoking-induced cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2003; 46: 11-29.
19. Cao Y, Bonizzi G, Seagroves TN, Greten FR, Johnson R, Schmidt EV, Karin M. IKK α provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* 2001; 107: 763-75.
20. Chen G, Cao P, Goeddel DV. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell* 2002; 9: 401-10.
21. Ciancio G, Burke GW, Gaynor JJ, Mattiazzi A, Roth D, Kupin W, Nicolas M, Ruiz P, Rosen A, Miller J. A randomized long-term trial of tacrolimus/sirolimus versus tacrolimus/mycophenolate mofetil versus cyclosporine (NEORAL)/sirolimus in renal transplantation. II. Survival, function, and protocol compliance at 1 year. *Transplantation* 2004; 77: 252-58.
22. Collins T. Endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 1993; 68: 499-508.
23. Collins T, Cybulsky MI. NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 2001; 107: 255-64.
24. Curch DF, Pryor WA. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64: 111-26.
25. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces

- monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5134-38.
26. Cyrus T, Sung T, Zhao L, Funk CD, Tang S, Pratico D. Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2002; 106: 1282-87.
 27. Dickfeld T, Lengyel E, May AE, Massberg S, Brand K, Page S, Thielen C, Langenbrink K, Gawaz M. Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via a p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 189-99.
 28. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 1997; 388: 548-54.
 29. Edinger AL, Linardic CM, Chiang GG, Thompson CB, Abraham RT. Differential effects of rapamycin on mammalian target of rapamycin signaling functions in mammalian cells. *Cancer Res* 2003; 63: 8451-60.
 30. Edington TS. So what is critically lacking with coronary atherosclerotic plaques? Perhaps the antithrombotic control. *Am J Pathol* 2001; 159: 795-96.
 31. Fazio S, Linton MF. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front Biosci* 2001; 6: D515-D25.
 32. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy M, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 1991; 253: 1129-32.
 33. Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004; 23: 3151-71.
 34. Finking G, Gohar MH, Lenz C, Hanke H. The effect of estrogen in the cardiovascular system. *Z Kardiol* 2000; 89: 442-53.
 35. Fischer C, Page S, Weber M, Eisele T, Neumeier D, Brand K. Differential effects of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor on monocytic I κ B kinase signalsome activation and I κ B proteolysis. *J Biol Chem* 1999; 274: 24625-32.
 36. Forre O, Haugen M, Hassfeld WG. New treatment possibilities in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2000; 29: 73-84.

37. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94: 2493-503.
38. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schömig A, Neumann FJ. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 2000; 148: 75-85.
39. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998; 98: 1164-71.
40. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schömig A. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96: 1809-18.
41. Gawaz M, Page S, Massberg S, Nothdurfter C, Weber M, Fischer C, Ungerer M, Brand K. Transient platelet interaction induces MCP-1 production by endothelial cells via I κ B kinase complex activation. *Thromb Haemost* 2002; 88:307-14.
42. Gomez-Cambronero J. Rapamycin inhibits GM-CSF-induced neutrophil migration. *FEBS Lett* 2003; 550: 94-100.
43. Gosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 2002; 109: S81-S96.
44. Grimbrone MA Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces and atherogenesis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1-5.
45. Hawrylowicz CM, Howells GL, Feldmann M. Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J Exp Med* 1991; 174:785-90.
46. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-94.
47. Hernandez-Presa MA, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Ortega L, Edigo J. ACE inhibitor quinapril reduces the arterial expression of NF- κ B-dependent proinflammatory factors but not of collagen I in a rabbit model of atherosclerosis. *Am J Pathol* 1998; 153: 1825-37.

48. Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Edigo J. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor- κ B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1997; 95: 1532-41.
49. Herold G. Koronare Herzerkrankung (KHK) in: „Innere Medizin“, Herold G. Gerd Herold, Köln, 2001, 187-96.
50. Herold G, Oette K. Lipidstoffwechselstörungen in: „Innere Medizin“, Herold G. Gerd Herold, Köln, 2001, 564-70.
51. Hilgendorff A, Muth H, Parviz B, Staubitz A, Haberbosch W, Tillmanns H, Holschermann H. Statins differ in their ability to block NF- κ B activation in human blood monocytes. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003; 41: 397-401.
52. Hodgins JB, Maeda N. Minireview: estrogen and mouse models of atherosclerosis. *Endocrinology* 2002; 143: 4495-501.
53. Hofker MH, van Vlijmen BJ, Havekes LM. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 137: 1-11.
54. Hu FB, Grodstein F. Postmenopausal hormone therapy and the risk of cardiovascular disease: the epidemiologic evidence. *Am J Cardiol* 2002; 90: 26F-29F.
55. Hu Y, Baud V, Oga T, Kim KI, Yoshida K, Karin M. IKK α controls formation of the epidermis independently of NF- κ B. *Nature* 2001; 410: 710-14.
56. Imparato AM, Lord JW Jr., Texon M, Helpert M. Experimental atherosclerosis produced by alterations of blood vessel configuration. *Surg Forum* 1961; 12: 245-47.
57. Israël A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- κ B? *Trends Cell Biol* 2000; 10: 129-33.
58. Kalin MF, Zumoff B. Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* 1990; 55: 330-52.
59. Kalra VK, Ying K, Deemer K, Natarajan R, Nadler JL, Coates TD. Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 1994; 160: 154-62.
60. Kaplanski G, Porat R, Aiura K, Erban JK, Gelfand JA, Dinarello CA. Activated platelets induce endothelial secretion of interleukin-8 *in vitro* via an interleukin-1-mediated event. *Blood* 1993; 81: 2492-95.
61. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-63.

62. Karow T, Lang R. ACE-Hemmer in: „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, Karow T, Lang R, Thomas Karow, Pulhein, 2002, 83-89.
63. Kilburn KH, McKenzie W. Leukocyte recruitment to airways by cigarette smoke and particle phase in contrast to cytotoxicity of vapor. *Science* 1975; 189: 634-37.
64. Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43: 83-95.
65. 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: 91-98.
66. Klut ME, Doerschuk CM, Van Eeden SF, Burns AR, Hogg JC. Activation of neutrophils within pulmonary microvessels of rabbits exposed to cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9: 82-89.
67. Kranzhöfer R, Browatzki M, Schmidt J, Kubler W. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor- κ B in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 826-28.
68. Kuipers H, Wijnen JA, Hartgens F, Willems SM. Influence of anabolic steroids on body composition, blood pressure, profile and liver function in body builders. *Int J Sports Med* 1991; 12: 413-18.
69. Lehr HA, Frei B, Arfors KE. Vitamin C prevents cigarette smoke-induced leukocyte aggregation and adhesion to endothelium *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7688-92.
70. Lehr HA, Kress E, Menger MD, Friedl HP, Huebner C, Arfors KE, Messmer K. Cigarette smoke elicits leukocyte adhesion to endothelium in hamsters: inhibition by CuZn-SOD. *Free Radical Biol Med* 1993; 14: 573-81.
71. Lehr HA, Sagban TA, Kirkpatrick CJ. Atherosclerosis--progression by nonspecific activation of the immune system. *Med Klein (Munich)* 2002; 97: 229-35.
72. Leonardi A, Chariot A, Claudio E, Cunningham K, Siebenlist U. CIKS, a connection to I κ B kinase and stress-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10494-99.
73. Li J, Brasier AR. Angiotensinogen gene activation by angiotensin II is mediated by the relA (nuclear factor- κ B) transcription factor: one mechanism for the renin angiotensin system positive feedback loop in hepatocytes. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 252-64.
74. Li X, Commane M, Nie H, Hua X, Chatterjee-Kishore M, Wald D, Haag M, Stark GR. Act1, an NF- κ B-activating protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10489-93.

75. Libby P. Atherosclerosis: the new view. *Sci Ann* 2002; 286: 46-55.
76. Libby P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am J Cardiol* 2000; 86: 3J-8J.
77. Libby P, Aikawa M. Vitamin C, collagen, and cracks in the plaque. *Circulation* 2002; 105: 1396-98.
78. Lin MC, Almus-Jacobs F, Chen HH, Parry GC, Mackman N, Shyy JY, Chien S. Shear stress induction of tissue factor gene. *J Clin Invest* 1997; 99: 737-44.
79. Lin X, Mu Y, Cunningham ET Jr, Marcu KB, Geleziunas R, Greene WC. Molecular determinants of NF-kappaB-inducing kinase action. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 5899-907.
80. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin-1 β synthesis. *J Cell Biol* 2001; 154: 485-90.
81. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs LW, Kunkel SI, North R, Gerard C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 1998; 187: 601-08.
82. Machado PG, Felipe CR, Hanzawa NM, Park SI, Garcia R, Alfieri F, Franco M, Silva HT Jr, Medina-Pestana JO. An open-label randomized trial of the safety and efficacy of sirolimus vs. azathioprine in living related renal allograft recipients receiving cyclosporine and prednisone combination. *Clin Transplant* 2004; 18: 28-38.
83. Mackman N, Brand K, Edington TS. 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* 1991; 174: 1517-26.
84. Maniatis T. Catalysis by a multiprotein I κ B kinase complex: *Science* 1997; 278: 818-19.
85. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002; 197: 887-96.
86. Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion *in vivo*. *Blood* 1999; 94: 3829-38.
87. May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, Glöckner J, Pober JS, Ghosh S. Selective inhibition of NF- κ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I κ B kinase complex. *Science* 2000; 289: 1550-54.
88. May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- κ B. *Immunol Today* 1998; 19: 80-88.

89. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 2002; 346: 1773-80.
90. Mottram DR, George AJ. Anabolic steroids. *Baillieres Best Pract Clin Endocrinol Metab* 2000; 14: 55-69.
91. Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 1988; 58: 249-61.
92. Nagel T, Resnik N, Dewey CF Jr, Grimborne MA Jr. Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1825-34.
93. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1991; 88: 1121-27.
94. Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinel C, May A, Schömig A. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 1997; 95: 2387-94.
95. 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* 1993; 686: 29-38.
96. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF- κ B activation by tumor necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999; 401: 82-85.
97. Page S, Fischer C, Baumgartner B, Haas M, Kreusel U, Loidl G, Hayn M, Ziegler-Heitbrock HW, Neumeier D, Brand K. 4-Hydroxynonenal prevents NF- κ B activation and TNF expression by inhibiting I κ B phosphorylation and subsequent proteolysis. *J Biol Chem* 1999; 274: 11611-18.
98. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853-66.
99. Pelzer T, Neumann M, deJager T, Jazbutyte V, Neyses L. Estrogen effects in the myocardium: inhibition of NF- κ B DNA binding by estrogen receptor- α and - β . *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 1153-57.
100. Pelzer T, Schumann M, Neumann M, deJager T, Stimpel M, Serfling E, Neyses L. 17 β -estradiol prevents programmed cell death in cardiac monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268: 192-200.

101. Peters RT, Liao SM, Maniatis T: IKK ϵ is part of a novel PMA-inducible I κ B kinase complex. *Mol Cell* 2000; 5: 513-22.
102. 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* 2001; 167: 3316-23.
103. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 686: 12-28.
104. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor- κ B activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 654-51.
105. Qwarnström EE, Ostberg CO, Turk GL, Richardson CA, Bomsztyk K. Fibronectin attachment activates the NF- κ B p50/p65 heterodimer in fibroblasts and smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 30765-68.
106. Raugeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995; 270: 7420-26.
107. Ribot C, Tremollieres F, Pouilles JM. Estrogen and selective estrogen receptor modulators in the treatment of osteoporosis. *Ann Med Interne (Paris)* 2000; 151: 490-96.
108. Ridley SH, Sarsfield SJ, Lee JC, Bigg HF, Cawston TE, Taylor DJ, DeWitt DL, Saklatvala J. Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J Immunol* 1997; 158: 3165-73.
109. Rose JE, Behm FM, Westman EC, Coleman RE. Arterial nicotine kinetics during cigarette smoking and intravenous nicotine administration: implications for addiction. *Drug Alcohol Depend* 1999; 56: 99-107.
110. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
111. Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M. IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature* 1998; 395: 297-300.
112. Rustmeier K, Stabbert R, Haussmann HJ, Roemer E, Carmines EL. Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 2: chemical composition of mainstream smoke. *Food Chem Toxicol* 2002; 40: 93-104.

113. Sachias BS. Platelet-endothelial interactions in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2001; 3: 412-16.
114. Scheidereit C. Signal transduction. Docking I κ B kinases. *Nature* 1998; 395: 225-26.
115. Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, 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* 1994; 10: 1521-28.
116. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* 2001; 293: 1495-99.
117. Siess W. Molecular mechanism of platelet interaction. *Physiol Rev* 1989; 69: 158-78.
118. Simoncini T, Maffei S, Basta G, Barsacchi G, Genazzani AR, Liao JK, De Caterina R. Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms. *Circ Res* 2000; 87: 19-25.
119. Sousa JE, Sousa AG, Costa MA, Abizaid AC, Feres F. Use of rapamycin-impregnated stents in coronary arteries. *Transplant Proc* 2003; 35: 165S-70S.
120. Sousa MM, Yan SD, Stern D, Saraiva MJ. Interaction of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) with transthyretin triggers nuclear transcription factor κ B (NF- κ B)-activation. *Lab Invest* 2000; 80: 1101-10.
121. Speir E, Shibutani T, Yu ZX, Ferrans V, Epstein SE. Role of oxygen intermediates in cytomegalovirus gene expression and in the response of human smooth muscle cells to viral infection. *Circ Res* 1996; 76: 1143-52.
122. Stancovski I, Baltimore D. NF- κ B activation: the I κ B kinase revealed? *Cell* 1997; 91: 299-302.
123. 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* 1993; 686: 66-71.
124. Terkeltaub R, Boisvert WA, Curtiss LK. Chemokines in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 397-405.
125. Thanos D, Maniatis T. NF- κ B: A lesson in family values. *Cell* 1995; 80:529-32.
126. Tojima Y, Fujimoto A, Delhase M, Chen Y, Hatakeyama S, Nakayama K, Kaneko Y, Nimura Y, Motoyama N, Ikeda K, Karin M, Nakanishi M. NAK is an I κ B kinase-activating kinase. *Nature* 2000; 404: 778-82.
127. Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Gutierrez B, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production

- and nuclear factor κ B activation in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 439-45.
128. Turani H, Levi J, Zevin D, Kessler E. Hepatic lesions in patients on anabolic androgenic therapy. *Isr J Med Sci* 1983; 19: 332-37.
129. Van Antwerpen L, Theron AJ, Myer MS, Richerds GA, Wolmarans L, Booysen U, van der Merwe CA, Sluis-Cremer GK, Anderson R. Cigarette smoke-mediated oxidant stress, phagocytes, vitamin C, vitamin E, and tissue injury. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 686: 53-65.
130. Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, Capron L, Chappey O, Yan SD, 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 Sci USA* 1994; 91: 7742-46.
131. Weber C, Erl W, Weber K, Weber PC. Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers. *Circulation* 1996; 93: 1488-92.
132. White JG. Platelets and atherosclerosis. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 25-29.
133. Whiteside ST, Israël A. I κ B proteins: structure, function and regulation. *Sem Cancer Biol* 1997; 8: 75-82.
134. Willeit J, Kiechl S. Biology of arterial atheroma. *Cerebrovasc Dis* 2000; 10 S5: 1-8.
135. Williams B. Angiotensin II and the pathophysiology of cardiovascular remodeling. *Am J Cardiol* 2001; 87: 10C-17C.
136. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1785-92.
137. Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel DV. I κ B kinase- β : NF- κ B activation and complex formation with I κ B kinase- α and NIK. *Science* 1997; 278: 866-69.
138. Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF- κ B/Rel and I κ B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* 1996; 74: 749-69.
139. Xiao G and Sun SC. Negative regulation of the nuclear factor κ B-inducing kinase by *cis*-acting domain. *J Biol Chem* 2000; 275: 21081-85.
140. Zandi E, Rothwarf DM, 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* 1997; 91: 243-52.
141. Zhu GH, Schwartz EL. Expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase in THP-1 monocytes: induction by autocrine tumor necrosis factor- α and inhibition of aspirin. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 1251-58.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACE	angiotensin converting enzyme
Act	NF- κ B-Aktivator
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
Ag	Antigen
AGE	advanced glycolation products
Ak	Antikörper
Ala	Alanin
AMI	akuter Myokardinfarkt
ARD	ankyrin repeat domain
Arg	Arginin
AT	Angiotensin
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenbpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CD	cluster of differentiation
Cd	Cell division molecule
Ci	Curie
CIKS	connecting to IKK and SAPK/JNK
CMV	Cytomegalievirus
cpm	counts per minute
CRP	C-reaktives Protein
CTP	Cytidintriphosphat
d	Tag
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

ECL	Enhanced chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAM	Endothelial leukocyte adhesion molecule
FKS	fötales Kälberserum
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
Glu	Glutaminsäure
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HDL	high density lipoprotein
HLH	Helix-loop-helix
HSP	Hitzeschockprotein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
IP	Immunpräzipitation
I κ B	Inhibitor-kappa-B
KA	Kinaseassay; Mutante
KD	Kinasedomäne
KHK	koronare Herzkrankheit
Kon	Kontrolle
Komp.	Kompetition
-L	Ligand
LDL	low density lipoprotein
Lp	Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Leucin-Zipper-Struktur
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikromolar

M	Mol
mAk	monoklonaler Antikörper
MAP	Mitogen-activated protein
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MEKK	mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase I
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MIP	macrophage inflammatory protein
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MP	Metalloproteinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NAK	NF- κ B-aktivierende Kinase
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa-B
ng	Nanogramm
NIK	NF- κ B-induzierende Kinase
OD	optische Dichte
oxLDL	oxidiertes LDL
p-	phosphoryliert
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Platelet derived growth factor
pg	Picogramm
PK	Proteinkinase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pNA	p-Nitroanillin
pRLTk	Renilla-Luziferase-Plasmid mit HSV-Thymidinkinase-Promoter
PTCA	perkutane transluminale Coronarangioplastie
p-Wert	Wahrscheinlichkeit
RA	Rezeptor Antagonist
rel.	relativ

RHD	Rel-Homologie-Domäne
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
t	Zeit
TBE	Tris-Borat-EDTA
TF	Tissue factor
TGF	Thrombocyte growth factor
Thr	Thrombozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Units
u.a.	unter anderem
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
Vorinkub.	Vorinkubation
WB	Western Blot
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzoldisulfonat
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

7.2 Publikationen und Kongressbeiträge

Brand K, Heiss P, Quirling M, Nothdurfter C, Weber M. Funktionelle Relevanz einer Aktivierung von NF- κ B *in vivo* bei Arteriosklerose/Restenose. SFB 1940 2001. (Poster)

Gawaz M, Page S, Massberg S, Nothdurfter C, Weber M, Fischer C, Ungerer M, Brand K. Transient platelet interaction induces MCP-1 production by endothelial cells via I κ B kinase complex activation. *Thromb Haemost* 2002; 88:307-14.

Nothdurfter C, Gawaz M, Heiss P, Page S, Massberg S, Weber M, Ungerer M, Neumeier D, Brand K. Platelet-induced activation of endothelial NF- κ B/IKK signalling and functional consequences during atherogenesis. Konferenz: Forschung in Pathobiochemie, Klinischer Chemie und Laboratoriumsmedizin, Hansjürgen Staudinger Symposium, Banz, Deutschland 2002; *Abstract Book*. (Vortrag)

Brand K, Nothdurfter C, Heiss P, Page S, Massberg S, Weber M, Ungerer M, Neumeier D, Gawaz M. Platelet-induced activation of endothelial NF- κ B/IKK signaling and functional consequences during atherogenesis. 13. Lipid Meeting Leipzig, Deutschland 2002; *Abstract Book* 36. (Vortrag)

Weber M, Sydlik C, Quirling M, Nothdurfter C, Zwergal A, Heiss P, Bell S, Neumeier D, Ziegler-Heitbrock HWL, Brand K. Transcriptional inhibition of IL-8 expression in TNF-tolerant cells – evidence for involvement of C/EBP β . *J Biol Chem* 2003; 278: 23586-93.

Brand K, Nothdurfter C, Page S. *Chlamydia pneumoniae* is a strong modulator of the paradigmatic inflammatory NF- κ B response – implications for atherosclerosis. IAS E-Newsletter March 2003; www.athero.org.

Besta F, Müller I, Lorenz M, Nothdurfter C, Massberg S, Bültmann A, Cabezza N, Richter T, Brand K, Gawaz M. Reduced β_3 -endoneurin Expression is Associated with Enhanced Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor Activity in Atherosclerotic Lesions. (In Vorbereitung)

7.3 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde durch das Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München in der molekularbiologischen Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. Korbinian Brand ermöglicht. An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Neumeier, dem Direktor des Instituts, sowie bei Herrn Prof. Dr. Brand für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die freundliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Brand, der es auch in schwierigen Lagen stets verstand die Mitglieder seiner Arbeitsgruppe zu neuem kreativen Schaffen zu inspirieren. Besonders lernte ich seine professionelle und freundschaftliche Arbeitsweise in einem hoch motivierten Team zu schätzen, das einem stets Raum für die Verwirklichung neuer Ideen schuf.

Ganz herzlich möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz von der I. Medizinischen Klinik und dem Deutschen Herzzentrum der Technischen Universität München und Frau Felicitas Besta für die wertvolle und freundliche Kooperation danken, mit deren Hilfe viele gemeinsame Projekte auf dem Gebiet der Erforschung der Arteriosklerose überhaupt erst ermöglicht wurden.

Des weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Brand bedanken. Mein besonderer dank gilt Frau Dr. Sharon Page, die mich geduldig „in die Geheimnisse der Arterioskleroseforschung“ einführte und stets ein offenes Ohr für meine Sorgen und Nöte im Labor hatte. Des weiteren danke ich Frau Martina Quirling für die freundliche Unterstützung bei der vorliegende Arbeit und ihre erfolgreichen Bemühungen um ein herausragend gutes Arbeitsklima. Auch Frau Dr. Marion Wagner möchte ich danken für ihre kompetente Einarbeitung in die verwendeten Labortechniken und die vielen fachlichen und nichtfachlichen Diskussionen. Ebenso Frau Tamara Eisele und Frau Christine Grubmüller verdanke ich einen großen Teil meiner Kenntnisse im Bereich der Labortechniken. Frau Carmen Sydlik und Herrn Nikolaus Jilg danke ich für ihre freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit auch während einiger hektischer Zeiten. Ein herzliches Dankeschön an alle

miteinander für die schönen Stunden und das angenehme Arbeitsklima während unserer gemeinsamen Zeit.

Nicht zuletzt geht ein besonderer Dank an meine Familie, im besonderen an meine Eltern Renate und Konrad Nothdurfter, die mir stets bei all meinen Bestrebungen Unterstützung gegeben haben. Außerdem danke ich Herrn Dr. med. Robert Zanner und Herrn Thomas Mrva für die vielen interessanten und ermutigenden Diskussionen in schwierigen Phasen.