

Aus dem Deutschen Herzzentrum und Klinikum Rechts der Isar
der Technischen Universität München

Inflammation im akuten Myokardinfarkt: Genexpressionsanalyse zirkulierender Leukozyten

Nicola Wisniowski

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. med. I.V. Ott

2. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger

Die Dissertation wurde am 07.01.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 27.05.2009 angenommen.

Gliederung

1. Einleitung	1
1.1. Der akute Myokardinfarkt	1
1.2. Die lokale und systemische Entzündungsreaktion im akuten Myokardinfarkt	2
1.2.1. Die Funktion und Bedeutung des Endothels im Infarkt	3
1.2.2. Die Funktion und Bedeutung der Leukozyten im Infarkt	4
1.2.3. Die Infarktbedingte Freisetzung von Zytokinen	5
1.3. Der Einfluss entzündlicher Mediatoren auf den klinischen Verlauf von Infarktpatienten	7
1.4. Genexpressionsanalysen in der modernen Kardiologie	8
1.5. Fragestellung	9
2. Material und Methoden	11
2.1. Patientenkollektiv	11
2.2. Kultivierung von HUVEC	11
2.3. RNA-Isolation	12
2.3.1. Vollblut-RNA-Isolation	12
2.3.2. RNA-Isolation aus HUVEC	13
2.3.3. Bestimmung der RNA-Konzentration	14
2.4. cDNA-Microarray	14
2.4.1. DNase Treatment der RNA	14
2.4.2. cDNA-Synthese und radioaktive Markierung	14
2.4.3. Prähybridisierung und Hybridisierung	16
2.5. Entwicklung und Auswertung	17
2.5.1. Autoradiographie	17
2.5.2. Atlas Image 2.0	18
2.5.3. Statistische Auswertung	19
2.6. Semiquantitative PCR	19
2.7. Messungen von Plasmakonzentrationen	21
2.7.1. Bestimmung der Plasmakonzentrationen von RANTES- und VEGF	21
2.7.2. Bestimmung der Plasmakonzentrationen von IL-8, IL-6, IL-1, IL-10, IL-12p70 und TNF α	23

2.8.	Korrelation klinischer Daten mit experimentellen Ergebnissen	24
3.	Ergebnisse	26
3.1.	Patientencharakteristika	26
3.2.	Genexpressionsanalyse von zirkulierenden Leukozyten und Wirkung des Plasmas auf endotheliale Zellen	27
3.2.1.	Genexpression zirkulierender Leukozyten	28
3.2.1.1.	Steigerung proinflammatorischer Gene	30
3.2.1.2.	Hochregulierung der Immunologischen Funktion in Leukozyten	31
3.2.1.3.	Hochregulierung prokoagulatorischer Gene	31
3.2.1.4.	Regulation von Genen aus dem Bereich der Zelldifferenzierung, Proliferation, Transkription und Zelladhäsion	32
3.2.2.	Wirkung des Plasmas auf die Genexpression Endothelialer Zellen	32
3.2.2.1.	Wachstum und Proliferation in Endothelialen Zellen	34
3.2.2.2.	Inflammation in Endothelialen Zellen	35
3.2.2.3.	Gene im Bereich des Stoffwechsels	35
3.3.	Validierung der cDNA-Arraydaten mit genspezifischer PCR	36
3.4.	Zytokinplasmakonzentrationen – Messungen mit ELISA und CBA	37
3.5.	Korrelation der experimentellen Daten mit klinischen Patientendaten	39
3.5.1.	Korrelation der Zytokinkonzentrationsänderungen und der Genexpression in zirkulierenden Leukozyten	39
3.5.1.1.	Zusammenhang mit kardialen Parametern	39
3.5.1.2.	Zusammenhang mit Entzündungsparametern	40
3.5.1.3.	Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren	41
3.5.1.4.	Zusammenhang mit Medikation	43
3.5.1.5.	Zusammenhang mit Genexpressionsänderungen	43
3.5.2.	Korrelation der Genexpressionsänderungen von Endothelialen Zellen nach Plasmastimulation	44
3.5.2.1.	Kandidatengene mit Einfluss auf Infarktgrösse und kardiale Parameter	45
3.5.2.2.	Kandidatengene mit Einfluss auf die systemische Entzündungsreaktion	46

4.	Diskussion	47
4.1.	Proinflammatorische Veränderungen	48
4.1.1.	Hochregulierung proinflammatorischer Gene	48
4.1.2.	RANTES-Precursor und zirkulierendes RANTES in Leukozyten	50
4.1.3.	Assoziation von RANTES auf den Myokardschaden	51
4.1.4.	Zirkulierendes IL-6	52
4.1.5.	Assoziation von IL-8 auf den Myokardschaden	53
4.1.6.	VEGF-Verlauf	54
4.2.	Antiinflammatorische Veränderungen	55
4.2.1.	Adenosin A2A Rezeptor auf Endothialen Zellen	55
4.2.2.	Zirkulierendes IL-10	57
4.3.	Klinische Relevanz und therapeutische Ansätze	58
4.4.	Limitierung	60
5.	Zusammenfassung	61
6.	Literaturverzeichnis	63
7.	Danksagung	76

Abkürzungen

ACS	Akutes Koronarsyndrom
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AP	Angina Pectoris
APC-PCI-Komplex	Aktiviertes Protein C – Protein-C Inhibitor Komplex
AQP3	Waterchannel / Aquaporin 3
ARK-1	Aurora related kinase-1
Beta-PPT	Prepotachykinin-Beta
BSAP	Paired Box Protein PAX-5
CBA	Cytometric Bead Array
cDNA	Complementäre DNA
CK	Kreatinkinase
CK-MB	Kreatinkinase MB
cMET	Rezeptor von HGF (Hepatocyte Growth Factor)
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
IAP	Instabile Angina Pectoris
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
ITGAE	Integrin alphaE Precursor
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
IL-7	Interleukin 7
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
ILK	Integrin-linked kinase
IL7-R	Interleukin 7- Rezeptor
GATA 3	Trans-acting T-cell specific transcription factor
1-GE	1-Gefäßerkrankung
2-GE	2-Gefäßerkrankung
3-GE	3-Gefäßerkrankung
GIRK 3	G-protein gated inwardly rectifying K+
GLRA-1	Glycin receptor alpha-1 subunit precursor
GLUT 1	Erythrozyte Glucose Transporter
GMCSF-R	Granulozyte Macrophage Colony Stimulation Factor Receptor
GPX 1	Glutathion Peroxidase 1
GRM-1	Metabotropic glutamate receptor 1 precursor
GTR3	Brain glucosoe transporter
HDGF	Hepatoma derived growth factor

HDL	Cholesterin High density lipoprotein
HGF	Hepatocyte growth factor
HOXA 1	Homebox A1 Protein
HUVEC	Humane umbilicale venöse Endothelzellen
LAT	Linker for activation of T-cells
LDL	Cholesterin Low density lipoprotein
LHX1	Homebox Protein hLim 1
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M-CSF	Macrophage Colony Stimulation Factor
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MI	Myokardinfarkt
MMP	Metalloproteinase
mRNA	Messenger-RNA
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAH	Phenylalanin-4 Hydroxylase
PAK 3	p21-activated kinase 3
PCI	Protein C Inhibitor
PCI	Perkutane koronare Intervention
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PDH-Precursor	Pyruvate dehydrogenase kinase kinase precursor
PKA c-beta	cAMP dependent protein kinase beta-catalytic
PKC / PKCA	Protein Kinase C alpha polypeptide
PTCA	Perkutane transluminale k(c)oronare Angioplastie
RALGEF	GTP/GDP dissociation stimulator for a ras related GTPase
RANGAP1	Ran GTPase activating protein 1
RANTES	Regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted
RAP1Gap	Rap 1 GTPase activating protein 1
RCA	Rechte Koronararterie
RCX	Ramus circumflexus
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	Ribonukleinsäure
RPL 6	60S Ribosomal protein L6
RPL13a	60S Ribosomal Protein 13a
RPS 19	40S Ribosomal Protein S 19
RSKB	Ribosomal protein kinase B
RT	Reverse Transkriptase
SAA	Serum Amyloid A
sIL2-r	Soluble Interleukin 2- Rezeptor
SMC	Smooth muscle cell (Glatte Muskelzelle)
TF	Tissue Factor
TNFalpha	Tumor Nekrose Faktor Alpha
T-RNA	Transfer-RNA

Tyh

Tyrosine 3-hydroxylase

UKATP-1

ATP-sensitive inward rectifier proteasom channel

VCAM-1

Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VEGF

Vascular endothelial growth factor

1. Einleitung

1.1. Der akute Myokardinfarkt

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in den westlichen Industrienationen sehr häufig: fast die Hälfte aller Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland betrifft das Herz-Kreislaufsystem. Jeder 6. Kreislauftote unterliegt einem Herzinfarkt. Trotz Fortschritt in Diagnostik und Therapie sind die infarktbedingten Mortalitätsraten noch sehr hoch.

Der Myokardinfarkt (MI) tritt als eine Komplikation der KHK (Koronare Herzerkrankung) auf. Die klinischen Erscheinungsbilder eines akuten MI reichen von anhaltenden pectanginösen Beschwerden bis hin zum plötzlichen Herztod. Als Ursache des Infarktes ist eine absolute Koronarinsuffizienz anzusehen, die als Folge einer rupturierten arteriosklerotischen Plaque auftritt.

Die zugrunde liegende arteriosklerotische Gefäßwandveränderung besteht aus Schaumzellen, Entzündungszellen, nekrotischem Material und Fetteinlagerungen (Steinberg et al, 1987). Eine fibröse Haube („fibrous cap“) bestehend aus glatten Muskelzellen, extrazellulärer Matrix und Kollagen bedeckt diese Gefäßwandveränderung und dient als Abgrenzung zum Blutstrom (zusammengefasst von Falk, 1992; Kereikas et al, 2003).

Als „stabil“ bezeichnet man eine Plaqueformation, die wandhaftend und nicht rupturgefährdet ist. Das klinische Korrelat entspricht der stabilen AP. Hinter dem Begriff der „vulnerablen Plaque“ verbirgt sich hingegen die Rupturgefährdung und damit die Instabilität bzw. Verletzbarkeit dieser Struktur.

Mögliche Mechanismen, die die Destabilisierung der Plaque fördern sind zum einen der chronische Entzündungsprozeß (zusammengefasst von Ross, 1993; Libby et al, 2002) mit Aktivierung der Leukozyten und zum anderen die leukozytäre Sekretion von hydrolytischen Enzymen, Metalloproteinasen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Die Folge liegt in der Ruptur dieser Plaque und der Ausbildung eines MI.

Bei der Ruptur kommt es zum Freiliegen subendothelialen Gewebes, das thrombogen wirkt. Die gebildeten Thrombozytenaggregate führen zu einer Verlegung des koronaren Gefäßes und ziehen eine anhaltende Ischämie des entsprechenden Myokardgewebes mit anschließender Nekrose nach sich. Klinische Hinweise darauf geben typische EKG-Veränderungen und die Erhöhung der Serumkonzentration spezifischer Herzenzyme.

Trotz grosser Fortschritte in Diagnostik und Therapie ist die Letalität der Infarktpatienten immer noch sehr hoch. Als die Prognose verschlechternde Parameter dienen eine anhaltend schlechte LVEF, weiter bestehende Ischämiezeichen und ventrikuläre Rhythmusstörungen. Neben den klinischen Erscheinungsbildern tragen zugrundeliegende Pathomechanismen - wie die infarktbedingte Inflammation - zu der Prognose eines Infarktpatienten bei.

1.2. Die lokale und systemische Entzündungsreaktion im akuten Myokardinfarkt

In den letzten Jahren wurde immer mehr der Focus auf die inflammatorischen Vorgänge bei der Arteriosklerose und ischämischen Herzerkrankungen gerichtet (Ross et al, 1999). Entzündliche Vorgänge beeinflussen die Progression der Arteriosklerose, die Plaquestabilisierung und die infarktbedingten myokardialen bzw. systemischen Reaktionen mit entsprechenden Plasmakonzentrationsänderungen von inflammatorischen Mediatoren.

Die myokardiale Ischämie und die folgende therapeutische Reperfusion haben eine inflammatorische Reaktion zu Folge, die Leukozyten, Endothelzellen, Thrombozyten und das Myokard miteinschließt.

Endothelzellen beeinflussen zum einen die am Myokard ablaufende Inflammation mittels Rekrutierung immunkompetenter Zellen in das geschädigte Gewebe und halten zum anderen durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine auch die systemische Inflammation aufrecht. Leukozyten - und ihre Subpopulationen wie T-Lymphozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten - sind für die immunologische Komponente im Rahmen eines Myokardinfarktes unabdingbar.

Des weiteren wird durch die Aktivierung von Leukozyten und Endothelien in der Mikrozirkulation (Buffon et al, 2002), im Bereich der rupturierten Plaque und innerhalb der Myokardnekrose (Cusack et al, 2002) die systemische Inflammation aufrechterhalten.

Die Einflussnahme der entzündlichen Vorgänge auf klinische Parameter wie auf allgemeine Entzündungswerte, auf die kardiale Funktion und den klinischen Verlauf von Infarktpatienten wird vielfach diskutiert. Im Mittelpunkt des Interesses stehen die die Reaktion tragenden Zellen mit den entsprechenden von ihnen sezernierten Mediatoren.

1.2.1. Die Funktion und Bedeutung des Endothels im Infarkt

Das Endothel fungiert als wichtiges autokrines und parakrines Organ, das durch Sekretion bestimmter Mediatoren einen Einfluss auf umliegendes Gewebe und Zellen hat. Zu diesen Mediatoren zählen: VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), E-Selectin, Wachstumsfaktoren (Vascular endothelial growth factor (VEGF), Platelet derived growth factor (PDGF), Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF)) und Chemokine (Interleukin-8 (IL-8), Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)).

Das Endothel spielt eine wichtige Rolle in der vaskulären Hämostase – es beeinflusst maßgeblich den Gefäßtonus, die Plättchenaktivität, die Gerinnungsfaktoren, die inflammatorischen Reaktionen an der Gefäßwand, die Zellmigration und die Proliferation (Quyyumi et al, 1998).

Arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen führen bei den endothelialen Zellen zu einer Dysfunktion, in deren Konsequenz es zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen und MCP kommt, die wiederum die Einwanderung von Monozyten und anderen immunkompetenten Zellen in das subendotheliale Gewebe ermöglichen. Auch werden vermehrt Stoffe synthetisiert, die sowohl die Migration glatter Muskelzellen als auch eine Intima-Proliferation bewirken (Libby et al, 1995). Die Folge ist die erhöhte Gefahr einer Plaqueruptur und das mögliche Auftreten eines Myokardinfarktes.

Im Rahmen eines Myokardinfarktes sezernieren endotheliale Zellen vermehrt Adhäsionsmoleküle, wie Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), VCAM-1 oder E-Selectin. Durch diese Aktivierung kommt es zur Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten in das geschädigte Gewebe, zu einer verstärkten Plättchenaggregation, zur Proliferation glatter Muskelzellen und zur Aktivierung Matrix zerstörender Metalloproteinasen. Durch Produktion chemotaktischer Zytokine halten endotheliale Zellen die lokale Inflammation aufrecht und tragen z.B. durch vermehrte Expression von Interleukin-6 (IL-6) (Mantovani et al, 1992) zu einer systemischen Entzündungsreaktion bei.

In den letzten Jahren wurden die von endothelialen Zellen produzierten Mediatoren wie z.B. Interleukin-6 und deren Bedeutung für die Progredienz einer Arteriosklerose bzw. eines Myokardinfarktes näher untersucht. Infarktbedingt resultiert daraus eine vermehrte Freisetzung von IL-6 (Mazzone et al, 1999), wobei auch ein direkter Zusammenhang mit der klinischen Prognose von Patienten mit instabiler Angina Pectoris festgestellt wurde (Biasucci

et al, 1996). Somit nimmt das Endothel durch fortlaufende Sekretion inflammatorischer Mediatoren (Mazzone et al, 1999) einen entscheidenden Einfluss auf die Progredienz der Arteriosklerose, auf den klinischen Verlauf von Patienten mit pectanginösen Beschwerden (Biasucci et al, 1996) und auf Infarktpatienten. Dennoch sind viele Fragen, welche die infarktbedingte Inflammation und die Sekretion möglicher pro- bzw. antiinflammatorischer Mediatoren betreffen, noch nicht eindeutig geklärt und bedürfen weiterer wissenschaftlicher Aufklärung.

1.2.2. Die Funktion und Bedeutung der Leukozyten im Infarkt

Leukozyten und die Subpopulationen haben eine große Bedeutung für die Pathogenese der Arteriosklerose und des MI bzw. des akuten Koronarsyndroms (ACS) (Blum et al, 1994; Blum et al, 1995).

Im Rahmen einer Ischämie kommt es zu einer vermehrten Produktion von Adhäsionsmolekülen und bedingt dadurch zu einer leukozytären Transmigration in das geschädigte Myokard. Durch Sekretion zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren wie z.B. IL-2, IL-6 und RANTES, tragen Leukozyten aber auch zur systemischen Inflammation bei. Diese Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der inflammatorischen Antwort, der Adhäsionsmoleküle, der Bildung von Wachstumsfaktoren und einer Vielzahl anderer vasoaktiver Substanzen.

Steppich et al (2007) beschrieben die Funktionen der T-Zellen und deren Subpopulationen (Th1 und Th2) im akuten Myokardinfarkt. Dabei bleibt zu bemerken, dass eine von Th1-Zellen getragene Immunantwort das inflammatorische Geschehen bei Patienten mit instabiler Angina Pectoris bestimmt und in diesem Patientengut z.B. auch erhöhte RANTES-Werte als Zeichen einer Th1-Antwort gefunden wurden. Im Gegensatz dazu scheinen bei einem akuten Myokardinfarkt vor allem Th2-Zellen beteiligt zu sein – dies sei an der vor allem durch IL-10 und IL-6 getragenen Inflammation erkennbar (Steppich et al, 2007). Die differentielle Aktivierung von zirkulierenden T-Lymphozyten im akuten Myokardinfarkt könnte auch den klinischen Verlauf beeinflussen.

1974 wurde erstmals der Zusammenhang zwischen erhöhten Leukozytenzahlen und dem Risiko für zukünftige, kardiale Ereignisse von Friedman et al beschrieben. Im Blut von ACS-Patienten gemessene und erhöhte Leukozyten-Zahlen (Friedman et al, 1974; Lowe et al, 1985), C-reaktives Protein (Ridker et al, 1998 und 2000; Burke et al, 2002), Serum

Albumin A (Corti et al, 1996) oder auch Interleukin-Konzentrationen - als Zeichen einer systemischen Reaktion - zeigten eine Korrelation mit einem erhöhten (Re-) Infarktisiko sowie einem vermehrten Auftreten von Komplikationen und Mortalität nach einem Infarkt (Furman et al, 1996).

Liuzzo et al dokumentierten 1994 den Zusammenhang von erhöhtem CRP mit dem Auftreten eines Myokardinfarktes bzw. erhöhter Werte für das Akute-Phase-Protein bei Patienten mit Instabiler Angina Pectoris.

All diese Daten belegten eine schlechtere Prognose für ACS-Patienten mit erhöhten Entzündungswerten.

Auch erhöhte Konzentrationen löslichen Interleukin-2 Rezeptors (sIL-2r), der die Aktivierung von T-Zellen bzw. CD4+Zellen und damit eine systemische Entzündungsreaktion widerspiegelt, im Blut von Infarktpatienten korrelieren mit einem erhöhtem Reinfarkt-Risiko (Blum et al, 1994). Desweiteren sind aktivierte Leukozyten mit der kardialen Funktion und der Mortalität (Blum et al, 1994) assoziiert.

Somit haben Leukozyten einen entscheidenden Einfluss auf die Progredienz der Arteriosklerose, auf die infarktbedingte Entzündungsreaktion und auf den klinischen Verlauf nach einem Myokardinfarkt.

1.2.3. Die infarktbedingte Freisetzung von Zytokinen

Unter Zytokinen versteht man eine durch zahlreiche Zellen gebildete und sezernierte Substanzen, die als interzelluläre Mediatoren zur Aktivierung von Zellen beitragen. Bei den Zytokinen unterscheidet man pro- und antiinflammatorisch wirksame Mediatoren. Proinflammatorische Funktionen haben IL-1 β , TNF α und IL-6, antiinflammatorisch wirksam ist z.B. IL-10.

Seit 1992 etablierte sich der Begriff der Chemokine (Abkürzung von „chemoattractant cytokines“) – einer Untergruppe der Zytokine. Es handelt sich dabei um niedrig molekulare Polypeptide (6-14 kDa), die durch ihre chemotaktische Wirkung auf Leukozyten zur Migration in das entzündliche Gewebe eine große Bedeutung erlangt haben (zusammengefasst von Ward, 1998). Chemokine haben aber auch eine Wirkung auf endotheliale Zellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Neuronen und Epitheliale Zellen. Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften (anhand vorhandener Aminosäuren und NH₂-Positionen) werden diese Mediatoren in 4 Subfamilien eingeteilt: CXC-, CC-, C-, CX3C-Klassifikation. Zu den typischen Vertretern der Chemokine zählen RANTES (CC-Chemokin) und IL-8 (CXC-Chemokin).

Einige Studien befassten sich mit den systemischen Entzündungsreaktionen im Myokardinfarkt und untersuchten zum besseren Verständnis der inflammatorischen Vorgänge pro- und antiinflammatorische Zytokine bzw. Chemokine bei Infarktpatienten. Diese Mediatoren spielen eine bedeutende Rolle bei den infarktbedingten Reaktionen – sie führen zur Aktivierung von Leukozyten, Endothelialen Zellen und glatten Muskelzellen, fördern aber auch durch ihre prokoagulatorischen Eigenschaften (Oliver et al, 1993) das Auftreten von Komplikationen nach koronaren Angiographien. Neumann et al (1997) untersuchten den Zusammenhang zwischen proinflammatorischen Vorgängen und einer Aktivierung der Gerinnungskaskade. Dabei zeigte sich, dass IL-6 und IL-8 - durch Induktion der Tissue-Factor Expression auf Monozyten - einen Einfluss auf das Gerinnungssystem haben und möglicherweise mit thrombotischen Ereignissen in Zusammenhang gebracht werden können. Proinflammatorische Zytokine wie TNFalpha (Tumor necrosis factor alpha) und diverse Interleukine wie IL-1, IL-2, IL-6 und IL-8 werden von Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, endothelialen Zellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen freigesetzt (Kato et al, 1999). Erhöhte Serumkonzentrationen proinflammatorischer Zytokine finden sich bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und spielen eine besondere Rolle in der Plaquestabilisierung und Thrombogenese (Maury et al, 1989).

Infarktbedingt kommt es zu einer verstärkten IL-6- und IL-8-Synthese (Ikeda et al, 1992; Kukielka et al, 1995). Die Frage nach dem Syntheseort der Interleukine wie IL-6 oder IL-8 wird vielseitig diskutiert.

Plasma von Infarktpatienten stimuliert die leukozytäre IL-8 Expression (Marx et al, 1997). IL-6 aber auch IL-8 wird in höheren Konzentrationen in der atheromatösen Plaqueformation (Seino et al, 1994; Ishibashi et al, 1999) gefunden, vor allem an Orten mit erhöhter Infiltration von Makrophagen. Auch zeigte sich eine erhöhte Konzentration von IL-6 bei IAP-Patienten (Herity et al, 2000). Dies würde bedeuten, dass IL-6 Spiegel möglicherweise eine Aussage über die Plaquestabilität treffen können.

Ein ursächlicher Zusammenhang mit dem kardialen Enzym Troponin I (Hillis et al, 2003) ließe den Schluss zu, dass eine kardiale Expression des Mediators möglich ist. Messungen von IL-6 Konzentrationen aus dem Koronarsinus von elektiven Herkatheter Patienten mit IAP (vor und nach PTCA) zeigte deutlich erhöhte Konzentrationen an IL-6 und eine Zunahme des Mediators nach Intervention (Neumann et al, 1995). Dies bestärkte die Hypothese, dass lokale, aktivierte Makrophagen, Lymphozyten, Gefäßzellen und atherosklerotische Läsionen den Syntheseort darstellen (Hojo et al, 2000). Ebenfalls wurde die myokardiale Synthese diskutiert (Ikeda et al, 1992; Gwechenberger et al, 1999).

Infarktbedingt kommt es zu einer verstärkten Freisetzung von IL-8. Pannitteri et al (1997) konnten eine Konzentrationszunahme nach Infarkt zeigen – ein Maximum wurde nach 24 Stunden erreicht. Die Synthese des proinflammatorischen Mediators ist nach Ansicht von Kukielka et al (1995) ischämie- und reperfusionsbedingt im Myokard zu sehen, dies bestätigten die tierexperimentellen Daten dieser Arbeitsgruppe. Auch Neumann et al (1995) zeigte die kardiale Synthese von IL-8 und auch IL-6. Demgegenüber steht die Hypothese von Biasucci et al (1996), dass die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine nicht an eine kardiale Ischämie gebunden ist.

Ein ganzheitliches Verständnis der Zytokine und ihrer Wirkungsprofile, insbesondere der Einfluss der entzündlichen Mediatoren auf den klinischen Verlauf von Infarktpatienten, wurde somit bisher noch nicht erreicht.

1.3. Der Einfluss entzündlicher Mediatoren auf den klinischen Verlauf von Infarktpatienten

In den letzten Jahren wurde ein besonderes Augenmerk auf den Zusammenhang zwischen inflammatorischen Parametern - wie CRP, zirkulierenden Zytokinen und der absoluten Leukozytenzahl - und dem klinischen Verlauf von Infarktpatienten gelegt. Chronisch erhöhte CRP-Werte führen bei KHK-Patienten zu einem größeren Risiko für kardiale Ereignisse (zusammengefasst von Bhatt und Topol, 2002), sowie zu anhaltend hohen CRP- (Griselli et al, 1999) und Zytokin-Werten, die mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate nach einem Infarkt bzw. einem erhöhten Reinfarktisiko verbunden sind.

Immer mehr Studien suchen nach sensitiven und spezifischen kardialen „Biomarkern“, die es ermöglichen, ein Risikoprofil von Infarktpatienten zu erstellen und Aussagen über deren klinischen Verlauf zulassen.

Das Vorhandensein inflammatorischer Mediatoren wie TNFalpha, IL-2 und IL-10 zeigt eine Korrelation mit der Progression von atherosklerotischen Vorgängen. Mizia-Stec et al (2003) konnten anhand erhöhter Serumkonzentrationen dieser Mediatoren bei Infarktpatienten und Patienten mit Instabiler AP nachweisen, dass dieser Progression einer KHK eine anhaltende Immunreaktion mit Aktivierung pro- und antiinflammatorischer Stoffe zugrunde liegt. Auf der anderen Seite kommt den antiinflammatorisch wirksamen Mediatoren wie Interleukin-10 (IL-10) eine ebenso hohe Bedeutung zu. Erhöhte IL-10-Serumkonzentrationen von ACS-

Patienten gehen mit einem besseren klinischen Verlauf nach dem kardialen Ereignis einher (Heeschen et al, 2003).

1.4. Genexpressionsanalysen in der modernen Kardiologie

Seit Ende der neunziger Jahre hat sich die Erstellung von Genexpressionsanalysen zum besseren Verständnis kardiovaskulärer Erkrankungen etabliert. Zahlreiche Tiermodelle und Modelle an Zellkulturen sind entstanden, um die pathophysiologischen Verhältnisse der ventrikulären Hypertrophie (Shimkets et al, 1999), der Arteriosklerose (Feng et al, 1999) und der infarktbedingten Reaktionen (Stanton et al, 2000) besser zu verstehen. In einigen Studien konnten relevante Hinweise für Signaltransduktionen eruiert (Pendurthi et al, 2000) und neue unerwartete Erkenntnisse gewonnen werden.

Die an Tiermodellen durchgeführten Genanalysen zeigten aufgrund des heterogenen Myokardgewebes Nachteile bei der Auswertung und Interpretation der erhaltenen Daten (zusammengefasst von Shiffman und Porter, 2000). Die unterschiedlichen Reaktionsweisen der einzelnen Zellarten machten einen einheitlichen Versuchsaufbau nahezu unmöglich.

Zu den Vorteilen der Genanalysen bzw. der Microarrays zählt neben der simultanen Messung zahlreicher expressionsgenetischer Veränderungen - je nach Array-System können bis zu 10 000 Gene (Schena et al, 1995) gleichzeitig beurteilt werden - auch der Gewinn einer großen Anzahl von Daten mit bisher unerwarteten, neuen Erkenntnissen. Ein weiterer Vorteil liegt im Einblick in unterschiedliche pathophysiologische Bereiche, wie Inflammation, Metabolismus etc. sowie in der Möglichkeit, kleinste biologische Mengen einzusetzen. Ein Microarray hält das aktuelle Genexpressionsprofil fest und erlaubt eine Beurteilung in qualitativer und quantitativer Hinsicht.

Die Problematik besteht in der Nichterfassung von posttranslationalen Veränderungen wie Phosphorylierung und Glykosilierungen, die damit die Erstellung eines verfälschten Bildes fördern und die wissenschaftliche Erkenntnis schmälern. Zur besseren Bewertung expressionsgenetischer Profile benötigt man das Korrelat auf Proteinebene (Celis et al, 2000). Heterogene Sequenzen der cDNA können einheitliche Versuchsabläufe und Hybridisierungen negativ beeinflussen und fördern das Auftreten von sogenannten „Cross-Hybridisierungen“. Unbekannte Splice-Varianten erschweren zusätzlich die wahrheitsgemäße Interpretation und Auswertung erhaltener Daten.

Bisherige Versuchsreihen, die sich infarktbedingten Reaktionen widmeten, bezogen sich (1) auf Tiermodelle und beurteilten (2) die expressionsgenetischen, myokardialen Veränderungen (Lyn et al, 2000; Sehl et al, 2000; Stanton et al, 2000; Jin et al, 2001).

Der in der vorliegenden Arbeit gewählte Versuchsaufbau hingegen diene dem besseren Verständnis der lokalen und systemischen infarktbedingten Inflammation und mache die Beurteilung endothelialer und leukozytärer Reaktionsmechanismen möglich. Modelle an Zellkulturen haben sich bis dato etabliert, die Möglichkeit der Profilerstellung an zirkulierenden Leukozyten zur besseren Beurteilung des MI und Erstellung von Entzündungsmarkern hat die wissenschaftliche Kardiologie bis jetzt noch nicht eingesetzt.

1.5. Fragestellung

Nach neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen ist den inflammatorischen Vorgängen im akuten Myokardinfarkt eine große Bedeutung beizumessen. Das Wissen um die progrediente entzündliche Komponente bei der Arteriosklerose und um die zunehmende Gefahr der Plaquevulnerabilität bei anhaltend inflammatorischen Vorgängen mit dem Risiko eines akuten Myokardinfarktes hat die therapeutische Beeinflussung durch antiinflammatorische Strategien in den Mittelpunkt des Interesses gerückt.

Zahlreiche Studien befassten sich mit der Charakterisierung der entzündlichen Vorgänge bei kardialen Ereignissen wie dem Myokardinfarkt. Es wurde herausgefunden, dass es im Rahmen der Ischämie zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren - wie z.B. IL-6 und IL-8 - kommt, dass diese Mediatoren sich auch in den atheromatösen Plaqueformationen befinden und ein Zusammenhang mit inflammatorischen Zellen besteht. Um die hohe Zahl wiederauftretender Infarkte in der modernen Kardiologie zu minimieren, befassten sich einige Autoren mit der Frage nach sogenannten Biomarkern – darunter versteht man proinflammatorische Marker, die möglicherweise mit dem klinischen Verlauf der entsprechenden Patienten assoziiert werden können. Bislang wurden als Biomarker Akute-Phase-Proteine wie CRP (Ridker et al, 1998), IL-6 (Luc et al, 2003), SAA (Katayama et al, 2005) und Fibrinogen (Luc et al, 2003) diskutiert.

Das Ziel der Charakterisierung der inflammatorischen Vorgänge dient dem möglichen, zukünftigen Einsatz von antiinflammatorischen Strategien zur Verbesserung des klinischen Verlaufs der Infarktpatienten. Bislang wurden Studien durchgeführt, in denen man Antikörper entsprechender Zytokinrezeptoren zur Linderung der entzündlichen Reaktionen einsetzte.

Um der Charakterisierung der lokalen und systemischen Entzündungsreaktion im Myokardinfarkt näher auf den Grund zu gehen, sollte sich das Interesse der vorliegenden Arbeit auf die folgenden Ziele konzentrieren:

- (1) Die Betrachtung leukozytärer und endothelialer Reaktionen im akuten Infarktgeschehen sowie im weiteren Krankheitsverlauf und
- (2) die besondere Beobachtung inflammatorischer Reaktionen durch Messung der Zytokinplasmakonzentrationen im Verlauf eines MI.

Wichtig war es, die ersten, infarktbedingten Zellreaktionen zu erfassen. Aus diesem Grund widmete sich die Studie den expressionsgenetischen Profilen beider Zellreihen, d.h. Leukozyten und endothelialen Zellen. Dazu wurde Infarktpatienten zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen. Die erste Blutentnahme fand am Infarkttag statt bzw. maximal 24 Stunden danach. Eine zweite Blutentnahme erfolgte 5-10 Tage später. Zur Erstellung von Genexpressionsanalysen war die Isolierung von RNA der entsprechenden Zellen erforderlich. Aus dem Vollblut der Patienten wurde die leukozytäre RNA isoliert, zur Gegenüberstellung der systemischen Reaktion wurde endotheliale RNA eingesetzt – ein indirekter Mechanismus zur Nachahmung der lokalen, endothelialen und infarktbedingten Entzündungsreaktion. Dazu stimulierte man HUVECs mit Patientenplasma über eine gewisse Zeit, um die Infarktbedingungen „in vitro“ an endothelialen Zellen (Nabelschnurendothelien) nachzuahmen.

Dies ermöglichte die simultane Begutachtung zahlreicher, inflammatorischer Parameter auf Transkriptionsebene im akuten Infarktgeschehen und im Verlauf. Desweiteren stellte sich die Frage nach einer vor allem durch peripher zirkulierende Leukozyten getragenen Inflammation im Rahmen des akuten Infarktgeschehens und dessen Verlauf. Messungen von proinflammatorischen Zytokinkonzentrationen wie IL-6, IL-8 und RANTES sowie IL-10 und VEGF im Serum von Infarktpatienten nach 24h und nach 5-10 Tagen machten die Beurteilung des Verlaufs einer von diesen Zytokinen getragenen inflammatorischen Reaktion möglich.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Das ausgewählte Patientenkollektiv umfasste 2 Patientengruppen (jeweils n= 15) mit einem akuten ST-Hebungsinfarkt. Das Ziel der Versuchsreihe war die Analyse der differentiellen Genexpression sowohl im akuten Infarktgeschehen als auch im Verlauf. Es wurden 2 Gruppen gebildet, die die unterschiedlichen lokalen und systemischen inflammatorischen Vorgänge widerspiegeln sollten. Dazu war im ersten Schritt eine Blutentnahme von Infarktpatienten nötig. Die erste Blutentnahme erfolgte am Infarkttag – innerhalb der ersten 24 Stunden - und eine zweite Blutentnahme 5-10 Tage später. Das Ziel der Entnahmen war eine Genexpressionsanalyse zirkulierender Leukozyten und endothelialer Zellen sowie Plasmakonzentrationsmessungen proinflammatorischer Mediatoren. Zur Darstellung der lokalen Inflammation waren Humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVECs) nötig, diese wurden mit dem Plasma der Infarktpatienten über eine gewisse Zeit stimuliert. Anschliessend konnte die endotheliale RNA extrahiert werden. Zur Analyse der Genexpression zirkulierender Leukozyten folgte der Blutentnahme eine sofortige RNA-Isolation. Danach wurde die RNA bei -70°C eingefroren.

Das Patientenkollektiv wurde gemäß den AHA-Kriterien für Akute Myokardinfarkte ausgewählt: Signifikanter Anstieg der kardialen Parameter (Troponin und CK-MB) als biochemische Marker der kardialen Nekrose in Kombination mit wenigstens einem der folgenden Kriterien: 1) Ischämische Symptome 2) EKG-Veränderungen eines ST-Hebungs-Infarktes (JESC/ACC Communication, 2000).

Bei den ausgewählten Patienten gab es keinen Anhalt für maligne Erkrankungen, Infektionen, andere inflammatorische Prozesse, vorausgehende Operationen oder Verletzungen.

2.2. Kultivierung von HUVEC

Für Stimulationsversuche mit Patientenplasma der Myokardinfarkt- und der Kontrollgruppe wurden Humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVEC) verwendet.

Die Endothelzellen wurden bei 37°C , 5% CO_2 , 99% Luftfeuchte kultiviert und mit Low Serum EBM 2 (Endothelial Cell Basal Medium 2) (Clonetic), das alle 2 –3 Tage gewechselt wurde, versorgt.

Vor Gebrauch wurden dem Medium 10%iges Kälberserum (FCS) und der dazugehörige Supplement-Mix zugesetzt. Wachsen die Zellen konfluent, splittete man die HUVECs im Verhältnis 1:3 mittels Trypsin, TNS (Triisopropyl-naphthalene Sulfonic Acid) und HEPES Buffer (Clonetic).

Um bei der folgenden RNA-Extraktion eine möglichst ähnliche RNA-Menge der mit Patientenplasma stimulierten HUVECs zu gewährleisten, wurden für die Versuche konfluent bewachsene Zellflaschen der Passage 5 bis einschließlich Passage 8 benutzt.

Die Plasmaproben verdünnte man vor der Stimulation mit serumfreier EBM2 (Clonetic) in einem Verhältnis 1:1. Eine dreistündige Inkubation mit serumfreier Customer Formulation garantierte das „Starving“ (= Aushungern) der Zellen, bevor sie mit 50%igem Plasma in EBM über zwei Stunden stimuliert wurden. Anschließend erfolgte die Ablösung der Zellen mit Trypsin und eine zehnmütige Zentrifugation bei 1300 rpm, der Überstand wurde verworfen und das Sediment in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Um die Zellen möglichst puffer- bzw. trypsinfrei einzufrieren, waren weitere Zentrifugationsschritte von 5-7 Minuten bei 2000rpm notwendig. Bis zu RNA-Extraktion der Zellen wurden HUVECs bei -70°C aufbewahrt.

2.3. RNA-Isolation

Die Extraktion der T-RNA (Gesamt-RNA) aus dem Blut oder aus kultivierten Zellen war das Ausgangsmaterial für die Herstellung der cDNA. Sowohl für die Isolation der Nukleinsäuren aus dem Blut als auch für die aus HUVECs fand das RNeasy Protokoll der Firma Qiagen Anwendung (RNeasy Mini Kit).

Möglichst RNase freie Bedingungen waren die Voraussetzungen für ein erfolgreiches Arbeiten mit RNA. Aus diesem Grund wurde bei allen Versuchsabschnitten mit Einweghandschuhen, RNase freien Filterpipettenspitzen und RNase freiem Wasser gearbeitet.

2.3.1. Vollblut-RNA-Isolation

QIAGEN bietet eine kommerziell erhältliche RNA-Isolationmethode an, bei der das Erbgut von einer Größe bis zu 200 Basen an Silica-Gel-Membranen (QIAamp spin column) gebunden wird. Um zusätzliche Zellaktivierung durch Leukozyten zu vermeiden, wurde eine Vollblutmethode gewählt. Nach der Blutentnahme werden zunächst die kernlosen Erythrozyten, die für den RNA-Gewinn unbrauchbar sind, lysiert. Für die Lyse der roten

Blutkörperchen wurden 1ml entnommenes Blut mit 5 ml hypotonem EL-Buffer (Erythrocyte Lysis Buffer) gemischt, 10-15 Minuten auf Eis inkubiert und bei 400x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation konnte der Überstand mit den lysierten Erythrozyten verworfen werden – das Zellpellet bestand aus Leukozyten.

Zur Auflösung des Pellets wurde eine Mischung aus RLT-Puffer (Lysis Buffer) und β -Mercaptoethanol hinzugegeben, gut gemischt, und zur vollständigen Auflösung der Zellstrukturen auf eine QIAshredder Spin Column überführt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei maximaler Umdrehung wurde die Säule verworfen und Ethanol zu dem Lysat hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde auf eine QIAmp Spin Column pipettiert, die aus einer Silica-Gel-Membran bestand und für die Bindung der RNA verantwortlich war. Ethanol unterstützt die Bindung der Nukleinsäuren an diese Membran.

Durch mehrere aufeinanderfolgende Waschschrte (RW1-Buffer und RPE, jeweils 15 Sekunden bei 12 000 rpm zentrifugieren) wurde die Kontamination der Proben unterbunden. Im letzten Schritt benetzte man die QIAmp Säule mit 50 μ l RNase freiem Wasser, zentrifugierte für 1 Minute bei > 8000 x g. Die Säule wurde verworfen und die RNA-Proben bei -70°C eingefroren.

2.3.2. RNA-Isolation aus HUVEC

Für die RNA-Extraktion der bei -70°C eingefrorenen Endothelzellen fand das Protokoll des RNeasy Mini Kit (Quiagen) Anwendung. Das Prinzip dieser Technik besteht in der Lyse der Zellen und der Bindung der RNA an eine Silica-Gel-Membran, die dem Filter der RNeasy Spin Column entspricht.

Ein Gemisch aus RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol, das zu dem Zellpellet gegeben wurde, lysierte die HUVECs. Die Überführung auf eine QIAshredder Spin Column diente der vollständigen Auflösung der Zellstrukturen (Zentrifugation für 2 Minuten bei maximaler Umdrehung). Das Lysat wurde mit Ethanol gemischt und auf eine RNeasy Spin Column überführt. Diese Reinigungssäule besteht aus einer Membran, die bis zu 100 μ g Gesamt-RNA adsorbieren kann. Nach Waschschrten mit RW1- Puffer und RPE-Puffer (Zentrifugation für 15 Sekunden bei > 8000 x g), wurde die Membran mit 50 μ l RNase freiem Wasser benetzt und ein letztes Mal bei maximaler Umdrehung für eine Minute zentrifugiert. Die Säule wird verworfen und die isolierte RNA bei -70°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren.

2.3.3. Bestimmung der RNA-Konzentration

Der RNA-Gehalt der HUVECs bzw. der Leukozyten wurde photometrisch bestimmt.

Das Prinzip der Photometrie ist die Messung der Absorption bzw. Extinktion monochromatischen Lichts beim Durchgang durch die probenhaltige Küvette und die anschließende Berechnung der Konzentration nach dem Lambert-Beer-Gesetz.

Die extrahierte RNA wurde in einem Verhältnis 1: 100 verdünnt und der Proteingehalt bei einer Wellenlänge von 260nm photometrisch ermittelt. Nach folgender Formel wurde die Konzentration c (in $\mu\text{g/ml}$) errechnet:

Gemessener Wert (bei einer Wellenlänge von 260nm) $\times 100 \times 40 = c$ ($\mu\text{g/ml}$).

2.4. cDNA-Microarray

2.4.1. DNase Treatment der RNA

Im Anschluss an die RNA-Isolation wurden die Proben dem sogenannten DNase Treatment unterzogen, das der Bindung genomisch kontaminierter DNA dient.

Dazu wurden den RNA-Proben sogenannte DNase Buffer zugesetzt, die der Verunreinigung durch zusätzliche noch vorhandene DNA mittels enzymatischer Spaltung entgegenwirken.

Es wurde jeweils ein Probevolumen von 425 μl eingesetzt, welches einer RNA – Menge $< 500 \mu\text{g}$ entsprach. Das DNase Treatment begann mit dem Zusatz von 10x DNase I Buffer und DNase I (Clontech), dem folgte die Inkubation des RNA-Enzym-Gemisches bei 37°C für 30 Minuten. Zur Enzyminaktivierung wurden nach Abschluss der Inkubation 50 μl Termination Mix (Clontech) hinzugefügt. Die Mischung der Proben mit Chloroform (Sigma) und Phenol (Sigma) diente der Phasenauftrennung, die oberste Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die in 95%igem Ethanol und NaOAc (Clontech, RNA Labeling System) gelöste RNA wurde 24 Stunden bei -20°C inkubiert. Das nach der Inkubation und einer 15minütigen Zentrifugation bei 13 000 rpm entstandene RNA-Pellet wurde im weiteren Verlauf mit 80%igem Ethanol gemischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet bei Raumtemperatur 10 Minuten getrocknet und anschließend in RNase freiem Wasser (Clontech, RNA Labeling System) aufgenommen. Dabei entsprach ein Probevolumen von 6,5 μl einer RNA-Menge von 8-16 μg .

2.4.2. cDNA-Synthese und radioaktive Markierung

Die Umschreibung der RNA in komplementäre, einzelsträngige DNA (cDNA) erfolgte enzymatisch mit der sogenannten Reversen Transkriptase (RT).

Ursprünglich diente die RT als retrovirales Schlüsselenzym bei der Transkription des viralen Genoms in DNA. Heutzutage erhält man kommerzielle, aus unterschiedlichen Organismen gewonnene RTs. Gängige Enzyme sind MMLV (Moloney murine leukemia virus), AMV (Avian myeloblastosis virus) und die thermostabilen Varianten von *Thermus thermophilus* und *Thermus flavus*.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Superscript II RNase H- Reverse Transkriptase (Invitrogen, Superscript II) ist eine Modifikation der MMLV und zeichnet sich dieser gegenüber durch größere Syntheseleistung und Transkription längerer RNA-Sequenzen aus. Das eingesetzte Probenvolumen umfasste 6,5 µl, in denen sich eine RNA-Menge von ca. 8-16 µg befand.

Folgende Reagenzien wurden für den Ansatz gebraucht:

- 1 µl CDS-Primer (Clontech)
- 1 µl dNTP Mix (Clontech)
- 3,5 µl Phosphor³² (Amersham).

Der CDS-Primer (cDNA-Synthese Primer), ein modifizierter Oligo-dT-Primer, bindet sich an den Poly-A-Schwanz der mRNA und schafft somit die Grundlage für den Beginn der Synthese durch die RT. Der Poly-A-Schwanz besteht aus einer Abfolge von Adenin-Nukleotiden und befindet sich an dem 3'-Ende der RNA-Sequenz.

Nach Hinzufügen des CDS-Primers synthetisierte die RT, beginnend vom 3'-Ende, einen komplementären Strang zu der vorliegenden mRNA. Die eingesetzten Primer hängten sich an die mRNA-Transkripte, die den cDNA-Sequenzen auf den Array-Membranen entsprachen. Die Proben wurden bei 65°C für 5 Minuten im Thermocycler inkubiert.

Anschließend wurde hinzugegeben:

- 4µl 5x Reaction Buffer (Superscript II , Invitrogen)
- 2µl 0,1 M DTT (Superscript II , Invitrogen)
- 1µl RNase Inhibitor (Ambion).

Bei 42°C befanden sich die Proben für 2 Minuten im Thermocycler.

Im letzten Schritt der cDNA-Synthese und des Labelings wurde die Reverse Transcriptase (Superscript II, Invitrogen) zu den Proben gegeben, die für 50 Minuten bei 42°C in den Thermocycler inkubiert wurden. Zur Enzymaktivierung diente eine abschließende Inkubation für 15 Minuten bei 70°C.

Nach Beendigung der Reaktion fand die Säulenreinigung mit Spin Columns (Probe Amplification Kit, Clontech) statt und in aufeinander folgenden Schritten wurden Puffer

zugesetzt, die in einer anschließenden Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 Minute wieder ausgewaschen wurden:

- 180 µl NT2 Puffer
- 400 µl NT3 Puffer (3mal).

Während dieser Reinigungsschritte wurde die Säule immer wieder in ein neues 2 ml-Eppendorgefäß überführt, bis im letzten Schritt die Probenelution mit 100 µl NE-Puffer stattfand. Der Puffer zog 2 Minuten ein, die Säule wurde ein letztes Mal bei 13000 rpm für 1 Minute zentrifugiert und anschließend verworfen. Das Produkt befand sich in dem Eppendorgefäß und konnte nun hybridisiert werden.

2.4.3. Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Hintergrund-Sensitivität der verwendeten Nylonmembranen wird von verbliebenen RNasen und DNA-Kontamination der Probe bzw. der Membran wesentlich beeinflusst.

Die Prähybridisierung diene daher der Reduzierung der Background-Sensitivity durch eine halbstündige Denaturierung verbliebener Proteine auf der Folie bei 68°C.

Folgende Schritte waren notwendig (bezogen auf eine Probe):

- (1) Aufwärmung von 5ml Express Hyb (Clontech) bei 68°C im Hybridisierungssofen
- (2) Inkubation von 53 µl (0,5mg) Salmon Testes (Sigma) bei 95°C im Wärmeblock für 5 Minuten
- (3) Auftragen denaturierter Salmon testes und erwärmter Express Hyb auf die Membranen (Clontech) in den Hybridisierungsröhrchen
- (4) Prähybridisierung über 30 Minuten bei 68°C.

Die gereinigte cDNA wurde mit 5 µl Cot-1 DNA (Clontech) gemischt, 2 Minuten gekocht und 2 Minuten auf Eis inkubiert. Das cDNA-Cot-1-DNA-Gemisch wurde zu der Prähybridisierungslösung gegeben und hybridisiert. Die Hybridisierung lief über 48-72 h, und abhängig von der Hybridisierungszeit konnten Signalverstärkungen bzw. -reduzierungen festgestellt werden.

Im Anschluss an die Hybridisierung mussten die Membranen zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine mit folgenden Puffern gewaschen werden:

- Wash Buffer I bei 68°C im Hybridisierungssofen,
- Wash Buffer II bei 68°C im Hybridisierungssofen,
- 2 x SSC bei 25°C im Hybridisierungssofen.

Wash Buffer I bestand aus 100 ml 20xSSC und 50ml 20% SDS, Wash Buffer 2 aus 5ml 20xSSC und 25 ml 20%SDS. Beide Lösungen wurden mit Aqua bidest. auf 1000ml aufgefüllt.

Nach Abschluss der Waschschritte wurden die Folien aus den Hybridisierungsröhrchen genommen und in Plastik vakuumverschlossen. Es musste besonders auf den luftfreien Verschluss geachtet werden, da eventuelle Luftblasen die Signalwirkung stören.

Ebenso galt es, die Folien unter keinen Umständen austrocknen zu lassen, denn damit war ihr irreversibler Funktionsverlust verbunden. Es folgte eine Inkubationszeit von 7-10 Tagen auf einer Filmkassette.

Für einen erneuten Gebrauch wurden die Folien mit 0,5% SDS 5-10 Minuten gekocht und anschließend in der Lösung 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nach einem kurzen Wenden der Folien in Wash Buffer 1 wurden sie in Plastik vakuumverschlossen bei -20 °C aufbewahrt.

Dabei galt es schnell und sauber zu arbeiten, um ein mögliches Austrocknen der Membranen zu vermeiden. Es zeigte sich, dass der „Strippvorgang“ bis zu 5mal pro Folie erfolgen konnte, ohne dass eine wesentliche Reduzierung der Signalstärke zu erwarten war. Nach dem Strippen wurden die Nylonmembranen (Human 1.2., Clonetech) mit einem Geigerzähler auf eventuelle Restradioaktivität geprüft.

2.5. Entwicklung und Auswertung

2.5.1. Autoradiographie

Zur autoradiographischen Sichtbarmachung der Signale wurden Röntgenfilme oder Phosphorimager-Folien benutzt. Der Vorteil des Phosphorimagers (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) liegt in der quantitativen Darstellung der Signalintensitäten, während der Röntgenfilm hauptsächlich die augenscheinliche Beurteilung der Signale erlaubt. Die Exposition auf den Folien (Kodak, Deutschland) betrug 7-10 Tage, und die Länge der Exposition korrelierte mit der Signalstärke.

Der Phosphorimager tastete mit einem Laser die Folie Zeile für Zeile ab und registrierte die Lichtquanten, die von der Folie abstrahlten. Die Software Scanner Control ermöglichte die Steuerung per Computer - so konnten vor der Entwicklung bestimmte Messparameter wie Auflösung, Scanbereich etc. eingestellt werden. Anschließend wurden die Daten auf entsprechenden Medien gespeichert und mit der Software Image Quant bzw. Atlas Image 2.0 ausgewertet.

2.5.2. Atlas Image 2.0

Das Atlas Image 2.0 Programm (Clontech) ermöglicht die quantitative Analyse der Genexpressionen - es erstellt mit einfachen Handhabungen ein Genprofil, das zum Vergleich mehrerer Proben geeignet ist.

Im Versuch wurde zunächst der Array gemäss einer Schablone ausgerichtet – das sogenannte „Alignment“ (Ausrichtung) ermöglichte eine Zuordnung der Gene auf dem Array zu entsprechenden „Spots“ des auf der Schablone vorgegebenen Arraymusters.

Für den Vergleich von zwei Arrays waren zwei voneinander unabhängige, getrennte Alignements notwendig.

Erwartet man bei dem Vergleich von zwei Arrays und ihren Genaktivitäten sehr viele unterschiedlich exprimierte Proteine, ist es ratsam, die Signalintensitäten zu normalisieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene auf die sogenannten Housekeeping-Gene der Arrays standardisiert. Bei dieser Form der Normalisierung errechnete sich der Normalisierungskoeffizient auf folgende Weise:

$$\text{Normalization Coeffizient} = \frac{(\text{Intensity} - \text{Background}) \text{ gene z array 1}}{(\text{Intensity} - \text{Background}) \text{ gene z array 2}}$$

Nachdem das Alignment und die Einstellung der Background-Intensität abgeschlossen war, konnten die Arrays zur Analyse herangezogen werden. Verglichen wurde jeweils das Genprofil der endothelialen bzw. leukozytären Reaktionen einer Patientenprobe am 1.Tag eines Infarktes mit dem 5-10 Tage später.

Folgende Werte wurden ermittelt und in die Analyse miteinbezogen:

- Die Genaktivität als absoluter Wert gemessen an der Signalstärke des Spots,
- Die Intensität des Hintergrundes einer Folie (= Background-Value),
- Der Normalisierungs-Koeffizient (normalisierte Array 2 auf Array 1),
- Die Adjusted Intensity – errechnet aus der Intensität eines Spots minus dem Hintergrund-Wert, multipliziert mit dem Normalisierungs-Koeffizient,
- Die Ratio - ermittelt aus der Division der zwei unterschiedlichen Signalstärken : Array 2 Adjusted Intensity / Array 1 Adjusted Intensity,
- Die Difference für die Signalstärkeunterschiede zwischen Array 2 und Array 1: Difference = A2 Adjusted Intensity – A1 Adjusted Intensity.

Das Comparison View dieses Programmes ermöglichte die farbliche Darstellung und damit eine vereinfachte augenscheinliche Analyse der errechneten Daten.

Dargestellt wurde ein aus Boxen bestehender Array, jede Box entsprach einem Gen.

Diese Quadrate wurden in 2 Hälften unterteilt: die obere gab die Ratio, die untere die Difference wider. Die Farbe jeder Hälfte reflektierte die kalkulierten Werte für die Ratio und die Difference wie folgt: Die Signalschwelle der Ratio lag bei 1,5, die der Difference zwischen 200 – 300.

2.5.3. Statistische Auswertung

Die entsprechenden Genaktivitäten zum Zeitpunkt des 1. Infarkttagess wurden denen 5-10 Tage später gegenübergestellt. Zur Beschreibung der Änderung der Genaktivitäten wurden sowohl absolute Differenzen als auch die entsprechenden Verhältnisse (Ratios) der individuellen Expressionswerte herangezogen. Der t-Test für gepaarte Stichproben wurde verwendet, um die absoluten Werteänderungen auf statistische Signifikanz zu prüfen. Ferner wurden 95% Konfidenzintervalle für die mittleren Änderungen der Genaktivitäten angegeben. Für die nicht-normalverteilten Ratio-Werte wurde der Median und Interquartilsbereich (25. – 75. Perzentil) angegeben. Um aus der Vielzahl der untersuchten Gene eine Auswahl unabhängiger potentieller Erklärungsgrößen zu extrahieren wurde zunächst eine datengesteuerte Variablenselektion vorgenommen. Hierzu wurden alle Gene zunächst entsprechend ihres statistischen Diskrimierungsgehalts (p-Wert aus dem gepaarten t-Test <0.05) geordnet. Anschließend wurden ausgehend von dem kleinsten p-Wert all jene Faktoren aus der Variablenliste entfernt, welche bivariate Korrelationen (Pearson-Korrelationskoeffizient) von $>0,50$ aufwiesen. Anschließend wurde für die verbleibenden Genvariablen eine p-Wert Adjustierung nach der Methode von Benjamini-Hochberg (Benjamini, Y. and Hochberg, Y., 1995). vorgenommen, um der Problematik des multiplen Testens entgegenzuwirken.

Explorativ wurden des weiteren Korrelationsanalysen zwischen Genänderungen und klinischen Outcome-Parametern vorgenommen. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (R) wurde dabei als Maß zur Quantifizierung der Stärke vorliegender Assoziationen herangezogen. Für diese Analysen wurde ein zweiseitiges Signifikanzniveau von 5% festgesetzt. Eine Adjustierung für multiples Testen wurde in diesen Auswertungen aufgrund des vorwiegend hypothesengenerierenden Charakters nicht vorgenommen.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software SPSS für Windows (Versionen 15.0 und 16.0, SPSS Inc., IL, USA).

2.6. Semiquantitative PCR

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Protokoll sah folgende Arbeitsschritte vor:

- (1) RNA-Extraktion aus dem Gewebe/Vollblut
- (2) cDNA-Synthese, bei der 2 µg Gesamt-RNA (T-RNA) eingesetzt wurden.

Ein Mastermix wurde aus folgenden Reagenzien hergestellt:

- 2 µl 10xBuffer RT
- 2 µl dNTP (5mM)
- 1 µl Random Primer
- 1 µl RNase-Inhibitor (Ambion)
- 1 µl Omniscript RT (Qiagen).

Mit RNase freiem Wasser wurde auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt.

Die Proben wurden bei 37°C für 1 Stunde im Wärmeblock inkubiert, abschließende 5 Minuten bei 95°C sorgten für die Beendigung der Reaktion. Anschließend wurden die Proben bei – 20°C aufbewahrt.

1µl der synthetisierten cDNA wurde in der PCR (Polymerasekettenreaktion) eingesetzt.

Der Mastermix setzte sich hier zusammen aus:

- 2,5µl 10xPCR Buffer
- 0,5µl dNTP 10mM
- 1 µl Primer Mix 5 mM (entsprechende Primer- Sequenzen siehe Tabelle 2.6.1)
- 0,15µl TAQ.

Primer	Spezifische Sequenzen
Ubiquitin conjugating enzyme	For 5´ - CTC GGC GGC GCC TCA TG-3´ Rev 5´ - CTG TAG GTG GTT TAT TTG G- 3´
c-kit proto-oncogene	For 5´ - CTG CTC CTA CTG CTT CGC G- 3´ Rev 5´ - CAT CCA GGA TCT CAA AAG TC- 3´
Interleukin-7 Rezeptor	For 5´ - GGA GAA GTG GCT ATG CTC -3´ Rev 5´ - GTA GTT TCC TGA AAT TCA GGC -3´
Trans-acting T-cell specific transcription factor (GATA 3)	For 5´ - CCT CAG CCA CTC CTA CAT GG- 3´ Rev 5´ - GCC AGG GTA GGG ATC CAT GA-3´
Rap1 GTPase activating protein 1 (RAP1GAP)	For 5´ - GGA AGC AGG ATG GAT GAA C- 3´ Rev 5´ - CTG CAG TGG CTC TGT CTC- 3´

Primer	Spezifische Sequenzen
cMET (HGF Receptor)	For 5'- CAC CTG GCA TCC TCG TG- 3' Rev 5'- CCT TCT GAA GGT CTT CCT - 3'
Protein C Inhibitor	For 5'- GAG CCT CCG TTT CCT C- 3' Rev 5'- CAG GGA GAG CAT GGC CAG -3'
Proteasome Component C5	For 5'- CTC TAC AGC CAT GTA TTC GG- 3' Rev 5'- GTA ACA TTT GGG GCT ATC C- 3'
Hepatocyte Growth Factor	For 5'- GAT CCA ACC GGC AGA AGG- 3' Rev 5'- CTT CTC CTT GGA TTC CTC G- 3'
p21- activated kinase 3 (PAK 3)	For 5'- GCT CCT CCA CTG AGG ATG -3' Rev 5'- GAA TCG TAT GCT CAA AGT CTG -3'
Integrin-linked kinase (ILK)	For 5'- GAC ATT TTC ACT CAG TGC CGG-3' Rev 5'- GGT GTC ATC CCC ACG GTT C-3'
Ras related protein RAB4a	For 5'- GCC ATG TCC GAA ACC TAC G-3' Rev 5'- CGG ACC TGA ATC GTT CTT G-3'
Ran GTPase activating protein-1 (RANGAP 1)	For 5'- GAC ATT GCC AAG CTG GCA GAG -3' Rev 5'- GTG GCA GCG CTT CAA CTC CG-3'
Integrin alpha E precursor (ITGAE)	For 5'- CTC TTC CAC ACT CTG CTC TG-3' Rev 5'- CCT GGA CAA GGG AAC ATC G-3'
Linker for Activation of T-cells	For 5'- GGA GGC CAT CCT GGT CCC G-3' Rev 5'- CTC AGG GGT GGG TAG GAG G-3'
Integrin Alpha 2B	For 5'- CCA CTG CAA GCC CTC TGG C-3' Rev 5'- GAT GGC CAC TCT CCC ATG GC-3'
Integrin beta 4	For 5'- GGG CCA GGC TGC TCC TGG CAG-3' Rev 5'- CCA CGA TGC TCT CCC GCT GGC - 3'
GTP/GDP dissociation stimulator for a ras-related GTPase (RALGEF)	For 5'- GCA GCA AAG ACA AGC CAC- 3' Rev 5'-CCT TCT GTT TCT GGA TGA TGT TG-3'
Protein Kinase C alpha	For 5'-GAT GGT GAA GAT GAA GAC GAG-3' Rev 5'-CGA GAA CCC TTC AAA ATC AG-3'
Protein Kinase C delta	For 5'-GTG ATG ATG AGG ATG AAC TC-3' Rev 5'-GAT GAG GTT CTT GTC GCT G-3'

Tabelle 2.6.1.: Primer und die entsprechenden Sequenzen

Danach wurde 19,85µl Wasser zu den Proben gegeben, damit sich ein Gesamtvolumen von 25µl ergab. Die Proben durchliefen im Thermocycler 25 Zyklen unter folgenden äußeren Bedingungen (siehe Tabelle 2.6.2):

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
94°C	1 Minute	1
94°C	10 Sekunden	25
53°C	30 Sekunden	25
72°C	30 Sekunden	25
72°C	2 Minuten	1
4°C	∞	

Tabelle 2.6.2.: Zyklen des Thermocyclers mit entsprechenden Temperaturen und Zyklusanzahl

Nach Abschluss der PCR wurden die Proben mit jeweils 3µl Loading Buffer versetzt und auf ein 2%-iges Agarose-Gel aufgetragen. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch, ihrer DNA-Fragmentgröße entsprechend in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und durch einen Fluoreszenzfarbstoff im UV-Licht sichtbar gemacht.

2.7. Messungen von Plasmazytokinkonzentrationen

2.7.1. Bestimmung der Plasmakonzentration von RANTES und VEGF

Zur Messung der Konzentration von RANTES (= Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and presumably Secreted) und VEGF auf Proteinebene wurden Plasmaproben von 10 Patienten bzw. 12 Patienten herangezogen.

Das Prinzip des „Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay“ (ELISA) ist die Bindung eines zu bestimmenden Antigens mit dem spezifischen Antikörper, der an einer Trägersubstanz (z.B. Zellulose, Polystyrol) gebunden vorliegt. Zunächst bilden sich Immunkomplexe, an die sich ein weiterer, enzymmarkierter Antikörper anlagert (Sandwichmethode).

Die Kombination mit einer chromogenen Substanz dient der Sichtbarmachung dieser Antigen-Antikörper-Komplexe. Durch die photometrische Bestimmung der Immunkomplexe und der gebundenen enzymmarkierten Antikörper mit den Standards bekannter Enzymaktivitäten kann die Antigen-Konzentration ermittelt werden.

Der Validierung der Daten in der vorliegenden Arbeit diente der kommerziell erhältliche ELISA Quantikine der Firma R&D Systems. Die Vorgehensweise war zunächst wie folgt:

- (1) 100 µl Assay Diluent RD1A (RANTES) bzw. Assay Diluent RD1X (VEGF) auf jedes „Well“ geben
- (2) 100µl (RANTES) bzw. 50µl (VEGF) der Probe hinzufügen
- (3) zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur

- (4) Waschen mit dem Zusatz von 400µl Wash Buffer
- (5) vollständig Wiederentfernung des Washbuffers, um mögliche Verunreinigungen der Proben zu vermeiden
- (6) Hinzugeben von 200µl vom RANTES – bzw. VEGF- Konjugat, ein polyklonaler und an ein Enzym gebundener Antikörper,
- (7) Inkubation für 1 Stunde (RANTES) bzw. 2 Stunden (VEGF) bei Raumtemperatur
- (8) Entfernung ungebundener Teilchen in einem weiteren Waschschrift mit Wash Buffer.

Die farbstoffhaltige Substrate Solution, die im nächsten Schritt zu jedem „Well“ hinzugegeben wurde (200µl Substrate Solution pro „Well“), war ein Gemisch aus zwei Farbreagenzien, die zum einen Hydrogen Peroxid und zum anderen Tetramethylbenzidin enthielten. 200µl dieser Lösung wurden zu den Wells gegeben und im Dunkel 20 Minuten (RANTES) bzw. 30 Minuten (VEGF) bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion reichten 50µl Stop Solution (N Sulfuric Acid) pro „Well“ aus. Die Konzentration der nun an einen Farbstoff gekoppelten Antikörper wurde bei 450nm photometrisch ermittelt. Die Sensitivität dieses RANTES-ELISA begann ungefähr bei 8 pg/ml RANTES-Konzentration, die des VEGF-ELISAs im Mittel bei 11,4 pg/ml.

Zytokin	Sensitivität (pg/ml)
RANTES	8 pg/ml
VEGF	11,4 pg/ml

Tabelle 2.7.1.: Sensitivität von VEGF bzw. RANTES

2.7.2. Bestimmung der Plasmakonzentration von IL-8, IL-6, IL-1, IL-10, IL-12p70 und TNF α

Bei dem sogenannten CBA (Cytometric bead array) handelt es sich um eine kombinierte Methode von durchflusszytometrischen Messungen und fluoreszenzbasierten Messungen kleiner, unterschiedlicher Partikel. Bei dem hier angewandten System zur Zytokinkonzentrationsmessungen von IL-8, IL-6, IL-1, IL-10, IL-12p70 und TNF α im Plasma von Infarktpatienten handelte es sich um einen kommerziell erhältlichen Kit von BD Bioscience. Der zugrundeliegende Mechanismus gleicht dem eines ELISAs.

Beim Versuch wurde in folgenden Schritten vorgegangen:

- (1) Vorbereitung der Proben, der „Human Inflammation Standards“ und der sogenannten „Capture Beads“, die für das Einfangen der entsprechenden Proteine zuständig sind
- (2) Hinzufügen von 50µl der „Capture Beads“
- (3) Hinzufügen von 50µl des „Human Inflammation Standard“
- (4) Inkubation der Proben über 1,5 Stunden unter Lichtschutz und bei Raumtemperatur
- (5) Zusetzen von 1ml Wash Buffer zu den Proben
- (6) 5-minütige Zentrifugation der Proben bei 200xg Umdrehungen
- (7) Verwerfen des Überstandes, wobei ca. 100µl lösliche Substanz verblieben
- (8) Hinzufügen von 50µl Human Inflammation PE Detection Reagent
- (9) Weitere Inkubation der Proben über 1,5 Stunden bei Raumtemperatur
- (10) Erneute 5-minütige Zentrifugation bei 200xg Umdrehungen
- (11) Verwerfen des Überstandes
- (12) Hinzufügen von 300µl Wash Buffer zur Vorbereitung der Analyse mittels FACS

Die Sensitivität der einzelnen CBAs lag bei folgenden Konzentrationen:

Zytokin	Sensitivität (pg/ml)
IL-8	3,6 pg/ml
IL-1β	7,2 pg/ml
IL-6	2,5 pg/ml
IL-10	3,3 pg/ml
TNFα	3,7 pg/ml
IL-12p70	1,9 pg/ml

Tabelle 2.7.2.: Sensitivität von IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNFα, IL-12p70

2.8. Korrelation klinischer Daten mit experimentellen Ergebnissen

Die im Micorarray erhaltenen Daten und die Daten der Zytokinplasmakonzentrationsänderungen wurden mit den klinischen Daten der Infarktpatienten korreliert. Dazu diente das statistische Auswertungsprogramm SPSS (Statistical Product and Service Solutions).

Folgende klinische Parameter der Infarktpatienten wurden für diese Analyse herangezogen:

- (1) Kardiale Parameter wie Infarktgröße bei Aufnahme und nach 14 Tagen (anhand von Myokardszintigraphischen Daten), CK, CK-MB, Troponin T, die angiographisch festgelegte linksventrikuläre Funktion (EF) sowie die Restenoserate

(2) Entzündungswerte wie maximale Leukozytenzahl, maximaler CRP-Wert und maximaler Fibrinogen-Wert

(3) die Medikation der Infarktpatienten

(4) die kardiovaskulären Risikofaktoren.

Diese Daten wurden jeweils mit den entsprechenden Genexpressions- und Konzentrationsänderungen der Zytokine korreliert.

3. Ergebnisse

3.1. Patientencharakteristika

Die klinischen Daten der beiden Patientengruppen zur Darstellung der lokalen und systemischen Inflammation wurden nach Geschlecht, Alter, Risikofaktoren, Laborparameter – insbesondere Entzündungsparameter CRP, Fibrinogen und Herzenzyme (CK und CK-MB) - aktuelle Medikation, und allgemeine Parameter zu Bewertung der kardialen Funktion (Ejektionsfraktion, betroffene Gefäße und deren Anzahl) analysiert.

Fast über die Hälfte der Infarktpatienten der leukozytären Versuchsreihe und über 60% der endothelialen Versuchsreihe wiesen als Risikofaktoren Nikotinabusus, Hyperlipidämie oder arteriellen Hypertonus auf. Bei den Patienten der leukozytären Versuchsreihe zeigte sich eine Zunahme der CRP-Konzentrationen innerhalb der ersten 3-5 Tage nach Infarkteintritt, die Leukozyten wiesen eine deutliche, signifikante Abnahme ($p=0,0047$) innerhalb dieser Zeit auf (s. Tabelle 3.1.1.). Beide Patientengruppen erhielten als Medikation Thrombozytenaggregationshemmer, β -Blocker, ACE-Hemmer und Statine. Weniger als die Hälfte von Ihnen bekamen zusätzlich Diuretika. Die Ejektionsfraktion beider Patientengruppen entsprach einer leicht eingeschränkten kardialen Leistung. Desweiteren litten die Patienten zum Grossteil an einer 1-Gefässerkrankung. Bei 20%-30% waren zwei oder drei koronare Gefäße betroffen. Am häufigsten wurde die rechte Koronararterie (RCA) bzw. der Ramus interventricularis anterior (RIVA) der linken Koronararterie in Mitleidenschaft gezogen (s. Tabelle 3.1.2.).

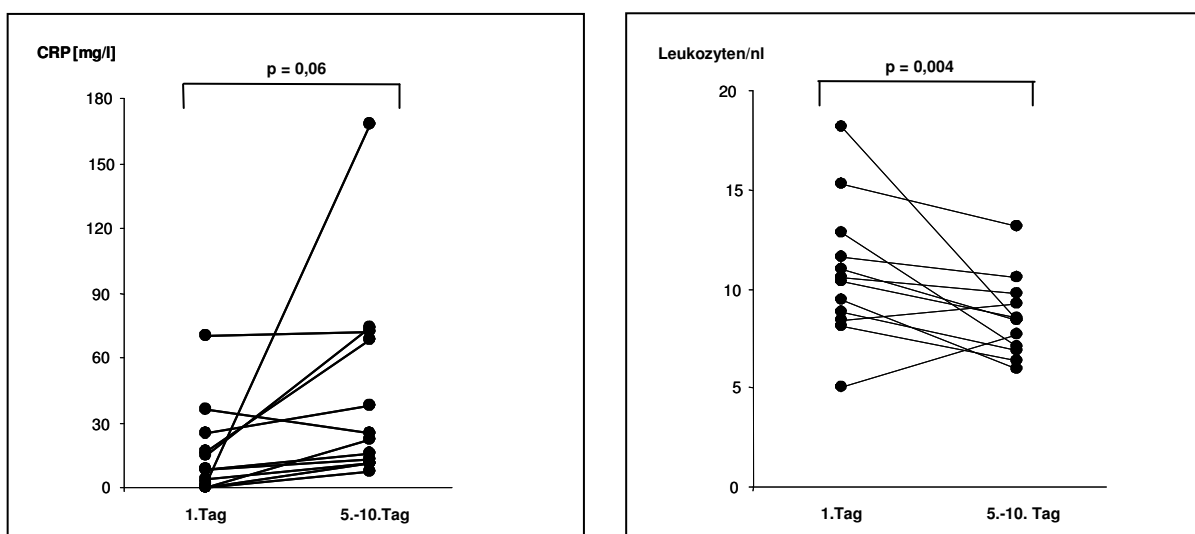


Tabelle 3.1.1.: CRP- und Leukozytenkonzentrationsverläufe

Patientencharakteristika	Leukozytäre Genexpression		Endotheliale Genexpression	
Geschlecht (m/w)	14/1		13/2	
Alter	55,4 (38-73)		55,85 (35-74)	
Risikofaktoren (Häufigkeit)				
Nikotinabusus	7	(46,6%)	9	(60%)
Hyperlipidämie	9	(60%)	11	(73,33%)
Arterieller Hypertonus	8	(53,3%)	10	(66,66%)
Diabetes mellitus	3	(20%)	0	(0%)
Adipositas	4	(26,6%)	2	(13,33%)
Pos. Familienanamnese	5	(33,3%)	4	(26,66%)
Laborparameter				
CK max. (U/l)	1523,6	(305-3670)	965,47	(148-2160)
CK-MB max. (U/l)	139,9	(34-272)	147	(18-673)
Troponin T (ng/ml)	8,63	(2,32- < 25)	4,99	(0,89-13,01)
Fibrinogen max. (mg/dl)	514,3	(345-669)	499,53	(254-1003)
CRP max. (mg/l)	52,9	(9,4-192,2)	32,09	(3,1-165,8)
Leukozyten/nl max.	12,4	(8,2-15,3)	12,48	(8,6-21,2)
Cholesterin (mg/dl)	235	(99,7- 304)	238,36	(172-312)
HDL-Cholesterin (mg/dl)	40,05	(30-52,9)	55,93	(37,2-79,2)
LDL-Cholesterin (mg/dl)	177,8	(110-337)	156,77	(91,8-230)
Triglyzeride (mg/dl)	192,4	(43,9-628)	127,71	(49-331)
Medikation (Häufigkeit)				
β-Blocker	12	(80%)	15	(100%)
Thrombozytenagg.hemmer	14	(93,3%)	15	(100%)
Diuretika	6	(40%)	5	(33,33%)
ACE-Hemmer	11	(73,3%)	13	(86,66%)
Statine	13	(86,6%)	13	(86,66%)
EF (%)	45% (31-69%)		53% (35-63%)	
Betroffene Gefäße (Häufigkeit)				
RIVA	7	(46,6%)	10	(66,66%)
LCX	2	(13,3%)	6	(40%)
RCA	8	(53,3%)	4	(26,66%)
Anzahl der betroffenen Gefäße (Häufigkeit)				
1-GE	8	(53,3%)	6	(40%)
2-GE	3	(20%)	2	(13,33%)
3-GE	4	(26,6%)	7	(46,66%)

Tabelle 3.1.2.: Patientencharakteristika der endothelialen und leukozytären Genexpressionsprofile

3.2. Genexpressionsanalyse von zirkulierenden Leukozyten und Wirkung des Plasmas auf endotheliale Zellen

Durch Genexpressionsanalysen an zirkulierenden Leukozyten und an durch Infarktplasma stimulierten HUVECs konnten wir die infarktbedingten lokalen und systemischen Reaktionen besser beurteilen. Es wurden 1183 Gene in die Bewertung miteinbezogen, deren genetische

Aktivität mit dem kommerziell erhältlichen Atlas Image Programm 2.0 (Clontech) quantitativ analysiert wurde.

Zur genaueren quantitativen Analyse und zur Vermeidung großer, individueller Variationen der einzelnen Proben (bedingt durch Unterschiede im RNA-Gehalt) war eine Standardisierung notwendig. Die einzelnen Proben wurden auf die Housekeeping-Gene der Arrays normalisiert. Die Housekeeping-Gene entsprachen 9 Genen: Ubiquitin, Phospholipase A2, Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase 1, Liver Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase, Tubulin Alpha 1, Major Histocompatibility Complex Class 1 C, Cytoplasmic Beta-Actin, 23-kDa highly basic protein, 40S Ribosomal Protein S9. Die Normalisierung bei der quantitativen Auswertung mittels Atlas Image 2.0 war aufgrund der experimentellen Variabilität der einzelnen Proben notwendig.

Die Auswertung der Patientenproben beider Gruppen bezog sich auf den Vergleich der Genexpressionrate im akuten Infarktgeschehen, d.h. innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Schmerzereignis, mit der Expressionrate 5-10 Tage nach dem Myokardinfarkt.

Dazu waren im ersten Schritt den Infarktpatienten zweimalig Blut entnommen worden: die erste Blutentnahme fand innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Infarkt statt, die zweite erfolgte 5-10 Tage später. Es wurden 2 Patientengruppen gebildet - eine erste Gruppe zur Identifizierung der Genexpressionsanalysen von zirkulierenden Leukozyten mit zusätzlichen Messungen proinflammatorischer Zytokine im Blut der Patienten, eine zweite Gruppe zur näheren Analyse der endothelialen Genexpressionsanalysen. Im zweiten Fall waren dazu allerdings Plasmastimulationen an endothelialen Zellen notwendig.

In beiden Myokardinfarktgruppen wurden die jeweiligen Proteine einer Genklassifikation zugeordnet, die Ratio und die Differenz ermittelt. Die Ratio entsprach dem Verhältnis der Genaktivitäten zum Zeitpunkt der Blutentnahmen. Konnte ein Ratio-Wert $> 1,5$ ermittelt werden, bedeutete dies eine Zunahme der Genexpression im Verlauf, bei einem Ratio-Wert $< 0,5$ handelte es sich um eine Abnahme der genetischen Expression. Signifikante Veränderungen existierten ab einem $p < 0,05$.

3.2.1. Genexpression zirkulierender Leukozyten

In der Gruppe der leukozytären Versuchsreihe ergaben sich im Vergleich der Genexpresionsanalysen zum Zeitpunkt der 1. Blutentnahme mit dem der 2. Blutentnahme 28 signifikant veränderte Expressionsraten mit einer Ratio $< 0,5$ oder $> 1,5$. Diese veränderten

Gene wurden hinsichtlich ihres Wirkungsprofils in 6 große Gruppen klassifiziert und zwar nach folgenden Kriterien: (1) Inflammation, (2) Immunologie, (3) Thrombozytenfunktion, (4) Zelldifferenzierung / -Proliferation, (5) Transkriptionsfaktoren, (6) Zelladhäsion.

Die danach strukturierten Genexpressionswerte sind im Detail in der nachfolgenden Tabelle festgehalten und werden in den folgenden Kapiteln kommentiert. Anschliessend wurden die Genexpressionen nach Benjamini-Hochberg adjustiert. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 3.2.1.2..

Genklassifikation	Gen/Protein	p-Wert	Ratio
Inflammation	Proteasom component C5	0,05	8,73
	Glutathion peroxidase (GPX1)	0,009	1,9
	RANTES-Precursor	0,05	2,4
	Interleukin-7-receptor (IL7R)	0,05	2,53
	Integrin alpha E precursor (ITGAE)	0,04	4,1
Immunologie	Linker for activation of T-cells (LAT)	0,04	1,7
	GATA 3	0,007	3,78
Gerinnung	CD 41 Antigen / Integrin alpha 2 B	0,04	4,3
	Protein C Inhibitor	0,046	10,63
Zelldifferenzierung / -Proliferation			
	Hepatocyte growth factor receptor precursor	0,04	0,47
	Hepatoma derived growth factor	0,04	1,8
	Thymosin- beta 10	0,002	1,9
	40S ribosomal protein S19 (RPS 19)	0,002	2,19
	Paired box protein PAX-5 (BSAP)	0,02	2,76
	UV excision repair protein RAD 23 A	0,047	5,57
	Homeobox protein hLim1 (LHX1)	0,046	19,6
Transkriptionsfaktoren	Nuclease-sensitive element DNA-binding prot.	0,007	2,82
	DNA-binding protein A	0,02	3,74
	Transcriptional repressor protein yin & yang	0,02	4,23
	Zinc-finger DNA-binding protein	0,028	4,3
	Raf-responsive zinc finger protein	0,047	6,8
Zelladhäsion	Bystin	0,03	2,6
	14-3-3n protein eta	0,05	2,88
	60S ribosomal protein 13 a (RPL13A)	0,016	1,98
	Homeobox A1 protein (HOXA1)	0,036	6,15
	MSX-1 homeobox protein	0,04	2,05
	60S ribosomal protein L6 (RPL6)	0,04	2,07
	cAMP-dependent protein kinase beta- catalytic subunit (PKA c-beta)	0,05	2,22

Tabelle 3.2.1.1.: Leukozytäres Genexpressionsprofil

	Signifikanz*	Mittelwert	95% Konfidenzintervall		Median	Interquartilsbereich	
		Differenz	mittlere Differenz		Ratio	Ratio	
			Untere Grenze	Obere Grenze		25. Perzentil.	75. Perzentil.
40S Ribosomal Protein S19	,004	0,2112	0,0920	0,3304	2,00	1,62	2,34
B-cell Lymphoma 6 Protein	,007	-0,1934	-0,3173	-0,0695	0,55	0,33	0,88
Ets-related Protein Tel	,011	-0,0253	-0,0416	-0,0090	0,53	0,27	0,91
Cation independent Mannose-6-Phosphate Receptor Precursor	,014	-0,0826	-0,1369	-0,0284	0,65	0,46	1,01
Nuclease-Sensitive Element DNA Binding Protein	,018	-0,2102	0,0679	0,3525	2,04	1,22	3,72
GATA 3	,021	0,0209	0,0066	0,0352	2,81	1,84	6,69
MCL-1	,025	-0,0192	-0,0343	-0,0042	0,72	0,31	1,11
60S Ribosomal Protein L13A	,029	0,3061	0,0650	0,5471	1,55	1,09	2,38
Granulocyte Colony Stimulating Factor Receptor Precursor	,032	-0,5936	-1,0685	-0,1186	0,56	0,45	0,77
DNA Binding Protein A	,036	0,0268	0,0049	0,0487	1,43	0,88	2,77
Paired Box Protein PAX-5	,039	0,0123	0,0021	0,0225	1,41	0,88	4,65
Homebox A1 Protein	,043	0,0145	0,0010	0,0279	2,88	0,69	8,11
G-Protein coupled Receptor Kinase GRK5	,046	-0,0062	-0,0120	-0,0003	0,00	0,00	1,00
Protein C Inhibitor	<,050	0,0362	0,0006	0,0719	1,32	0,14	7,44

Tabelle 3.2.1.2.: Signifikante Genexpressionen nach Benjamini-Hochberg

3.2.1.1 Steigerung proinflammatorischer Gene

Zu den die Inflammation betreffenden Genen zählten RANTES-Precursor, Interleukin-7-Rezeptor (IL7-R), Integrin alpha E precursor (ITGAE), Glutathion Peroxidase und Proteasom Component C5. Die unterschiedlichen Ratio-Werte erstreckten sich von 1,9 (Glutathion Peroxidase) bis 8,73 (Proteasom component C5) und signalisierten damit eine deutliche Zunahme.

Der Vorläufer von RANTES (RANTES-Precursor) zeigte mit einer Ratio von 2,4 ebenfalls eine deutliche Expressionszunahme im Verlauf. Das CC-Chemokin wird von Monozyten, zytotoxischen T-Lymphozyten, Thrombozyten, epithelialen Zellen und Fibroblasten (Kameyoshi et al, 1992; Holme et al, 1998) sezerniert.

RANTES wird v.a. im Zusammenhang mit der Leukozyten- und Thrombozytenaktivierung (Nomura et al, 2003) und der T-Zell-Differenzierung im Rahmen ischämischer, kardialer Ereignisse gesehen.

Auch IL-7R, der spezifische Rezeptor für IL-7, wies eine Zunahme der genetischen Expression um das 2,5-fache auf. IL-7 fungiert als T-Zell-Aktivator (Fry et al, 2001) bzw. beeinflusst die T-Zell-Hämostase (Fry et al, 2001), dient der Reifung von B- und T-Zellen und wirkt als Wachstums- bzw. Antiapoptosefaktor der heranreifenden Lymphozyten. Desweiteren vermag IL-7 Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen zu aktivieren. Allerdings ist seine Wirkung an das Vorhandensein von IL-7- Rezeptor gebunden, dieser wird auf Knochenmarks-Vorläuferzellen, Vorläuferzellen von B- und T-Lymphozyten und auf reifen T-Zellen exprimiert.

Glutathion-Peroxidase (GPX1) spielt als Fänger der freien Radikale eine bedeutende Rolle bei inflammatorischen und auch ischämischen Ereignissen und wird infarktbedingt ebenfalls hochreguliert (Ratio 1,9). GPX-1 zählt zu den sogenannten Selenoproteinen, darunter fasst man eine Vielzahl antioxidativ wirkender Proteine. Das in dieser Arbeit vermehrt exprimierte GPX-1 ist das sogenannte zytosolische Enzym, dessen Hauptfunktion in der Reduktion von $H_2 O_2$ und Alkyl-Hydroperoxiden liegt.

Integrin Alpha E Precursor (ITGAE) wird von Mastzellen, T-Zellen und dendritischen Zellen vor allem im Bereich der Schleimhäute gebildet, unterstützt die T-Zell-Proliferation und deren Wirkung (zusammengefasst von Kilshaw und Higgins, 2002). ITGAE zeigte in der Versuchsreihe eine deutliche expressionsgenetische Zunahme mit einer Ratio von 4,1.

3.2.1.2. Hochregulierung der Immunologischen Funktion in Leukozyten

Zu den signifikant veränderten Genen dieser Gruppe zählten Linker for activation of T-cells (LAT) und GATA 3. LAT ist ein membranständiger Adaptor, der auf NK-Zellen, T-Zellen, Mastzellen und Thrombozyten exprimiert wird und die Funktion reifer T-Zellen beeinflusst. GATA 3 wird von CD4+ T-Zellen gebildet und spielt eine Rolle bei der Differenzierung der Th1 / Th2- Subpopulationen. Beide Gene zeigten eine deutliche expressionsgenetische Zunahme mit Ratio- Werten von 1,7 (LAT) und 3,78 (GATA 3).

3.2.1.3. Hochregulierung prokoagulatorischer Gene

Protein C Inhibitor spielt als Inhibitor von aktiviertem Protein C eine wichtige Rolle in der Regulation des Gerinnungssystems. Im Fall einer Aktivierung des Gerinnungssystems so z.B. bei einer rupturierten Plaque bildet sich ein Komplex zwischen aktiviertem Protein C und

Protein C Inhibitor. In der Genexpressionsanalyse zeigte sich eine deutliche Zunahme der Expression (Ratio 10,63) im Verlauf von 5-10 Tagen nach dem Infarktereignis. Erhöhte Protein C Inhibitor-Konzentrationen wurden bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (Carroll et al, 1997) und bei Patienten mit Koronarer Herzkrankung (Bhiladvala et al, 2006) festgestellt. Bhiladvala et al (2006) halten einen Zusammenhang mit einer Risikoeinschätzung für kardiale Ereignisse bei KHK-Patienten aufgrund erhöhter Werte des APC-PCI-Komplexes (Aktiviertes Protein C – Protein C Inhibitor – Komplex) für möglich. Ein weiterer wichtiger Regulator der Koagulation CD 41 Antigen / Integrin alpha 2 B wies mit einer Ratio von 4,3 eine deutliche Hochregulierung auf. Integrin alpha 2B ist einer der Plättchen-Kollagen-Rezeptoren und wird in Zusammenhang mit erhöhtem Risiko für einen Myokardinfarkt bzw. koronarer Herzkrankheit gebracht.

3.2.1.4 Regulation von Genen aus dem Bereich der Zelldifferenzierung/ Proliferation, Transkription und Zelladhäsion

Diese Gruppen umfassten 20 der 28 signifikant veränderten Genexpressionen und betrafen die Zelldifferenzierung / -Proliferation, Transkription und Zelladhäsion. Die genetische Aktivität dieser Transkripte wurde in fast allen Fällen (s. Tabelle 3.2.1.1.) hochreguliert. Lediglich HGF-Rec. Precursor zeigte mit einer Ratio von 0,47 eine deutliche Abnahme. HGF spielt eine wesentliche Rolle bei der Reifung von T-Zellen (Tamura et al, 1998), der Angiogenese (Bussolino et al, 1992) und der Regeneration von Endothelzellen nach kardialer Ischämie (Ono et al, 1997).

3.2.2. Wirkung des Plasmas auf die Genexpression Endothelialer Zellen

In der Infarktgruppe der endothelialen Versuchsreihe wurden 26 signifikant veränderte Expressionsraten mit einer Ratio $< 0,5$ bzw. $> 1,5$.

Diese konnten hauptsächlich Gengruppen zugeordnet werden, die (1)Wachstum/Proliferation, (2) Inflammation, (3) Zentralnervensystem und (4) Stoffwechsel betrafen. Die danach strukturierten Genexpressionswerte sind im Detail in der nachfolgenden Tabelle festgehalten (Tabelle 3.2.2.1.). Signifikante Genexpressionen nach Benjamini-Hochberg sind in der Tabelle 3.2.2.2. aufgeführt.

Genklassifikation	Gen/Protein	p-Wert	Ratio
Wachstum / Proliferation			
	GMCSF-R	0,043	0,38
	Ephrin A Receptor 4	0,0015	0,53
	Neuromedin K Receptor	0,02	1,75
	Oligophrenin I	0,025	0,5
	Aurora-related kinase-1 (ARK-1)	0,033	2,33
	Recombination hotspot binding protein (Translin)	0,008	2,24
	ALK (Anaplastic lymphoma kinase)	0,012	0,19
	c-fer proto-oncogene	0,013	0,42
	Melanotransferrin Prec.	0,034	0,47
Inflammation			
	Adenosine A2A Receptor	0,03	2,04
	Beta-neoendorphin-dynorphin-prec.	0,015	1,83
	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17kDA	0,016	1,86
	Ribosomal protein kinase B (RSKB)	0,015	0,5
Zentralnervensystem (Metabolismus, Neurotransmitter)			
	Metabotropic glutamate rec. 1 precursor (GRM-1)	0,044	2,13
	Glycin receptor alpha-1 subunit precursor (GLRA-1)	0,041	2,34
	Parkin	0,017	2,99
	G-protein gated inwardly rectifying K+ / GIRK3	0,024	3,71
	Prepotachykinin- Beta (Beta-PPT)	0,02	4,6
Stoffwechsel			
	Pyruvate dehydrogenase kinase kinase precursor (PDH-Precursor)	0,39	0,25
	Sulfate Transporter	0,011	2,12
	Erythrozyte gluc. Transporter (GLUT1)	0,02	2,13
	Waterchannel / Aquaporin 3 (AQP3)	0,019	2,33
	Brain glucose transporter (GTR3)	0,035	4,88
	Tyrosine 3-hydroxylase (TYH)	0,035	1,77
	Phenylalanin -4-Hydroxylase (PAH)	0,017	2,15
	ATP-sensitive inward rectifier proteasom channel (UKATP-1)	0,032	5,72

Tabelle 3.2.2.1.: Genexpressionsprofil endothelialer Zellen (HUVECs)

	Signifikanz*	Mittelwert	95% Konfidenzintervall		Median	Interquartilsbereich	
		Differenz	mittlere Differenz			Ratio	Ratio
			Untere Grenze	Obere Grenze	Ratio		25. Perzentil
Fibroblast Growth Factor Rec.	,0033	-0,0051	-0,0074	-0,0028	0,69	0,30	1,08
Ephrin A4 Receptor	,0067	-0,0016	-0,0025	-0,0007	0,52	0,28	1,38
cGMP-dependent 3'5'-cyclic phosphodiesterase	,0100	-0,0079	-0,0124	-0,0035	0,67	0,39	0,91
Tyrosine Kinase tk1	,0133	-0,0045	-0,0071	-0,0019	0,56	0,39	0,70
Ran GTPase activating Protein 1	,0167	-0,0099	-0,0166	-0,0032	0,54	0,05	1,22
Translin	,0200	0,0081	0,0025	0,0138	0,68	0,54	2,04
Phenylalanin-4-Hydroxylase	,0233	0,0014	0,0003	0,0025	0,51	0,35	1,10
Neuromedin K Receptor (NKR)	,0267	0,0012	0,0002	0,0022	0,68	0,38	0,85
c-jun N-terminal Kinase 1	,0300	-0,0029	-0,0053	-0,0004	0,49	0,37	0,80
Glutathionreduktase	,0333	-0,0050	-0,0094	-0,0007	0,85	0,61	1,16
Integrin Beta 4	,0367	-0,0078	-0,0145	-0,0011	0,98	0,67	1,26
Hepatoma-derived Growth Factor	,0400	-0,0245	-0,0462	-0,0027	0,71	0,27	1,55
Calpain p94 Large Subunit	,0433	-0,0035	-0,0066	-0,0004	0,94	0,26	1,60
ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 8	,0467	-0,0011	-0,0022	-0,0001	0,85	0,53	1,20
Cytochrome P450 Reductase	<,0500	-0,0038	-0,0074	-0,0001	0,58	0,31	1,30

Tabelle 3.2.2.2.: Signifikante Genexpressionen nach Benjamini-Hochberg

3.2.2.1 Wachstum und Proliferation in Endothelialen Zellen

Die zu Wachstum / Proliferation zugeordneten Gene stellten die größte Gruppe der signifikant veränderten Proteine dar. 3 Gene zeigten eine Zunahme der Genexpression. Die Ratio erstreckte sich von 1,75 (Neuromedin K Rezeptor) bis zu einer Ratio von 2,33 (Aurora related kinase-1). Für GMCSF-R und Ephrin-A Rec. 4 errechnete sich eine Ratio von 0,38 bzw. 0,5 und signalisierte damit eine Abnahme im Verlauf. Ebenso konnte eine verminderte Expression für Oligophrenin 1, Anaplastic lymphoma kinase, c-fcr proto-oncogene und Melanotransferrin Precursor festgestellt werden.

3.2.2.2. Inflammation in Endothelialen Zellen

Die genetische Aktivität der inflammatorische Gengruppen, zu denen Adenosine A2A Receptor, Beta-neoendorphin-dynorphin-precursor, Ubiquitin-conjugating enzyme und

Ribosomal protein kinase B zählten, wiesen bis auf letzteres eine Zunahme der Genexpression auf. Adenosine werden aber auch intra- oder extrazellulär in ischämischen und entzündlichen Geweben freigesetzt. An der endogenen Adenosin-Freisetzung sind hauptsächlich Kardiomyozyten beteiligt (Bardenheuer et al, 1987). Der antiinflammatorische Effekt ist an das Vorhandensein entsprechender Rezeptoren A1, A2A, A2B und A3 gebunden, die auf Neutrophilen, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelialen Zellen exprimiert werden. Die Daten dieser Arbeit belegen eine Hochregulierung des A2A-Rezeptors nur in den endothelialen Zellen nach Plasmakubation. Dies weist darauf hin, dass an der antiinflammatorischen Komponente durch Bildung der Adenosin-Rezeptoren die endothelialen Zellen maßgeblich beteiligt sind.

3.2.2.3. Gene im Bereich des Stoffwechsels

Zu den signifikanten Genen zählten auch jene, die im Allgemeinen das ZNS und den Stoffwechsel beeinflussen.

Zu den ZNS-Spezifischen Genen gehörten Metabotropic Glutamate Receptor 1 Precursor (GRM-1), Glycin Receptor alpha- 1 Subunit precursor (GLRA-1), Parkin, G-Protein gated inwardly rectifying K⁺ (GIRK3) und Preprotachykinin-Beta (Beta-PPT). In allen Fällen konnte eine Hochregulierung festgestellt werden. Die Ratio erstreckte sich von 2,13 (GRM-1) bis zu 4,6 (Beta-PPT).

Die Regulation der dem Stoffwechsel zugehörigen Gene gestaltete sich ähnlich. Zu diesen zählten folgende Transkripte: Pyruvate Dehydrogenase Kinase Kinase Precursor (PDH-Precursor), Sulfate Transporter, Erythrozyte Glucose Transporter (GLUT-1), Waterchannel / Aquaporin 3 (AQP3), Brain Glucose Transporter (GTR3), Tyrosine 3 Hydroxylase (TYH), Phenylalanin-4-Hydroxylase (PAH) und ATP-sensitive inward rectifier potassium channel (UKATP-1). PDH-Precursor, der nach Angaben von Lewandowski et al (1995) die kardialen Funktion nach einer Ischämie beeinflusst, zeigte als einziges Transkript eine Reduzierung der expressionsgenetischen Aktivität (Ratio 0,25). In allen anderen Fällen konnte eine Hochregulierung festgestellt werden. Die Ratio erstreckte sich von 1,77 (TYH) bis 4,88 (GTR3).

3.3. Validierung der cDNA-Arraydaten mit genspezifischer PCR

Zur Validierung der Microarray-Ergebnisse der endothelialen Versuchsreihe wurden das Protokoll und die Technik der Semiquantitativen PCR (Polymerasekettenreaktion) herangezogen. Zu diesen Versuchszwecken führten wir erneut mit Patientenplasma Stimulationsversuche mit HUVECs durch, deren RNA isoliert wurde. Die synthetisierte cDNA diente als Grundlage zur Amplifikation. Es wurden jeweils 4 Patientenproben pro Gen auf Validierung untersucht, in 2 Versuchen erhielten wir ein positives Ergebnis.

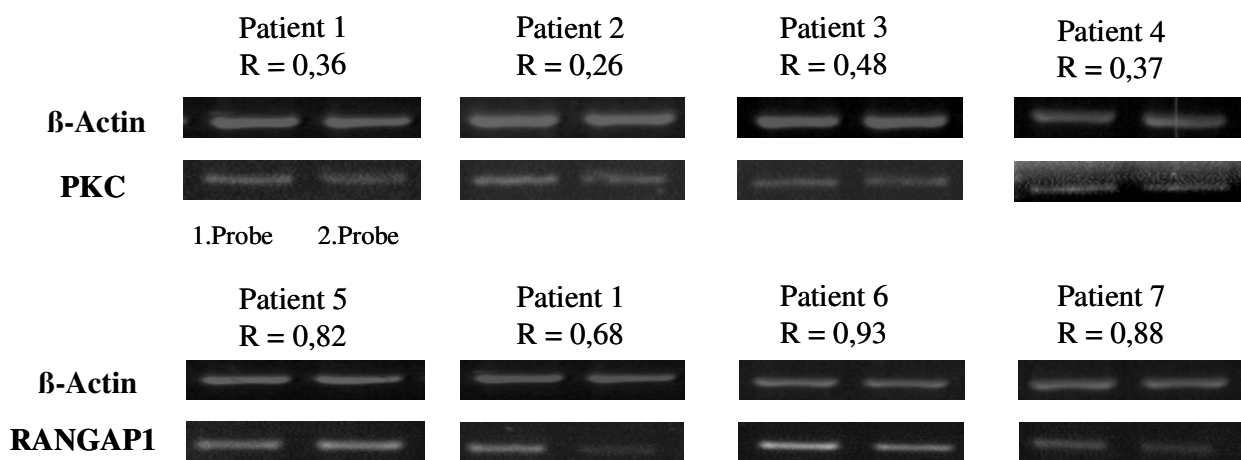


Abbildung 3.3.1.: Semiquantitative PCR mit Nachweis vermehrter Expression von PKC und RANGAP1 im Vergleich zur Kontrolle (β -Actin)

Dargestellt in Abbildung 3.3.1. sind die Gelbilder

(1) der Gene Ran GTPase activating protein 1 (RANGAP1), das zur Familie der G-Proteine zählt und den nukleären Transport beeinflusst (zusammengefasst von Sasaki und Takai, 1998) und

(2) der Protein Kinase C alpha polypeptide (PKC; PKCA), das eine wichtige Rolle bei der Angiogenese einnimmt (Wang et al, 2002) und im Zusammenhang mit Wachstum, Migration, Adhäsion von Endothelialen Zellen steht.

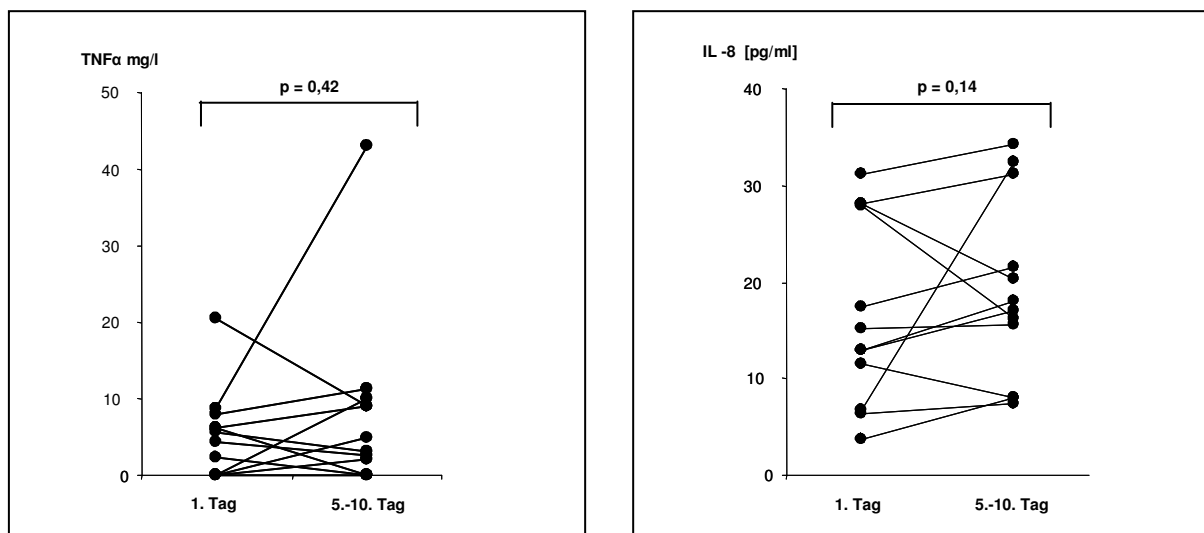
Es konnte in beiden Fällen eine vermindert dargestellte bzw. reduziert angefärbte Bande im Vergleich zur Kontrolle mit β -Actin festgestellt werden. Die mittlere Ratio beider Proteine im Microarray errechnete sich < 1 , d.h. es handelte sich um eine leicht verminderte Expressionsrate. In diesem Fall entsprachen die Daten der Semiquantitativen PCR den cDNA-Array-Daten.

3.4. Zytokinplasmakonzentrationen – Messungen mit ELISA und CBA

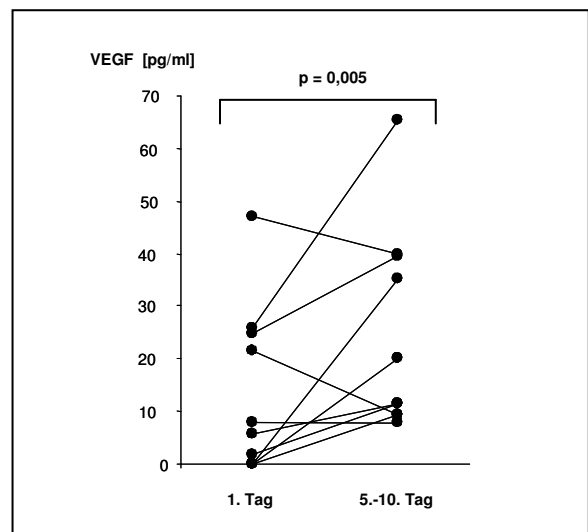
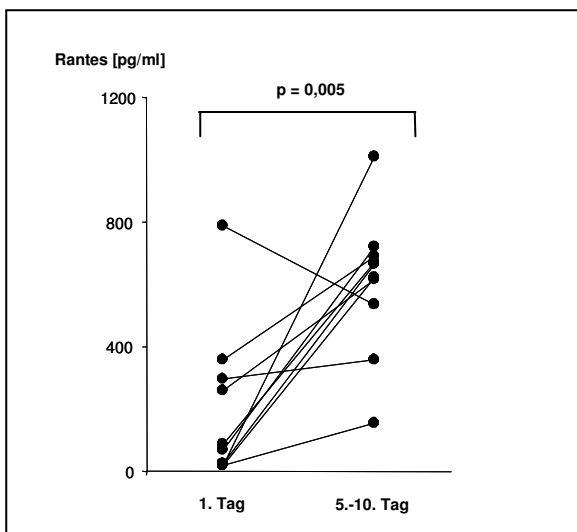
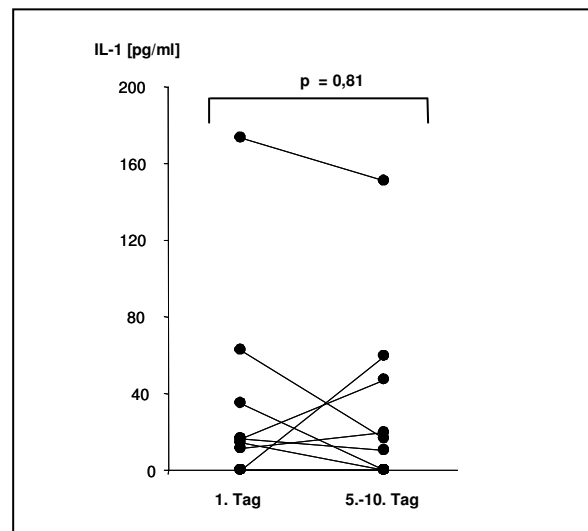
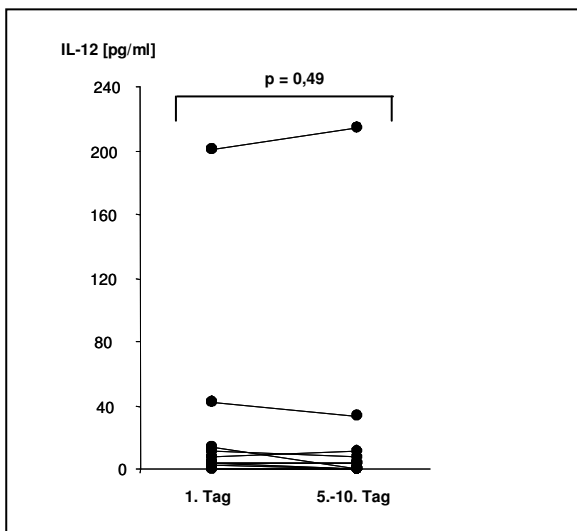
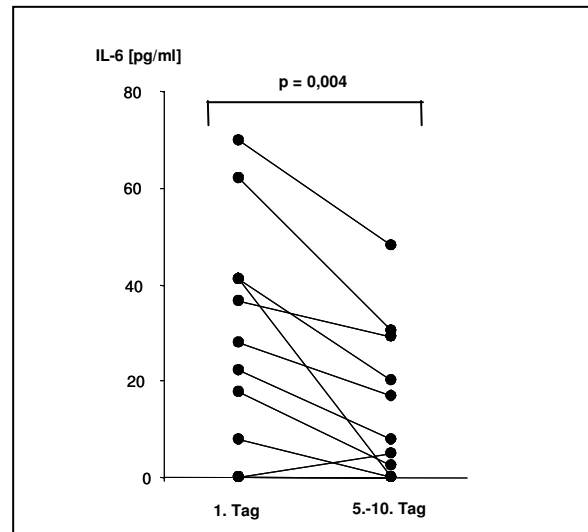
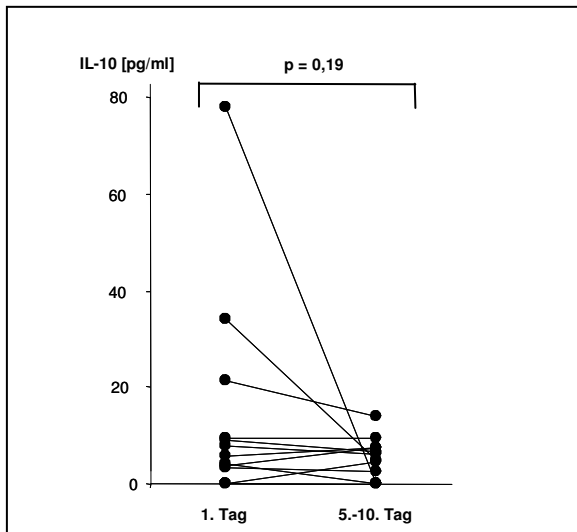
Für die Messung der Plasmakonzentrationen der Zytokine RANTES und VEGF diente ein „Enzym-linked-Immuno-Assay“ (ELISA). Die Konzentrationen von IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und TNF α wurden mit CBA (Cytometric Bead Array) bestimmt. Verglichen wurden die Patientenproben vor der Intervention bzw. innerhalb der ersten 24 Stunden nach Infarktbeginn und 3-5 bzw. 5-10 (RANTES) Tage nach der Intervention.

Die Zahl der untersuchten Patientenproben lag zwischen zehn und zwölf ($n = 12$ für IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF; $n = 10$ für RANTES und VEGF). Eine leichte Abnahme ohne Signifikanz wiesen die Plasmakonzentrationen für IL-1, IL-10, und IL-12 auf. IL-8 hingegen verzeichnete eine leichte Zunahme im Verlauf der ersten Tage nach Infarkteintritt (s. Abbildungen 3.4.1. und 3.4.2.).

Signifikante Konzentrationsveränderungen wurden für IL-6, RANTES und VEGF nachgewiesen. IL-6 ($n = 12$) nahm im Verlauf deutlich ab ($p = 0,004$), RANTES und VEGF hingegen zeigten eine bedeutende Konzentrationszunahme mit einer Signifikanz von 0,005 für beide Mediatoren. (s. Abbildungen 3.4.1. und 3.4.2.).



Abbildungen 3.4.1.: Plasmakonzentrationsverläufe von TNF α und IL-8



Abbildungen 3.4.2.: Plasmakonzentrationsverläufe von IL-10, IL-6, IL-12, IL-1, RANTES und VEGF

3.5. Korrelation der experimentellen Daten mit klinischen Patientendaten

Mittels SPSS wurden die im Array und ELISA gewonnenen Daten der endothelialen und leukozytären Versuchsreihe mit den klinischen Parametern wie Kreatinkinase, CK-MB, Troponin T, den kardialen Funktionswerten, Restenoseraten, Entzündungsparametern, den kardiovaskulären Risikofaktoren und der Medikation korreliert.

3.5.1. Korrelation der Zytokinkonzentrationsänderungen und der Genexpression in zirkulierenden Leukozyten

3.5.1.1. Zusammenhang mit kardialen Parametern

In der Patientengruppe zur Analyse zirkulierender Leukozyten wurde zunächst der Zusammenhang untersucht zwischen den im Experiment festgestellten Änderungen der Zytokinplasmakonzentration (Δ Zytokin) mit den infarktrelevanten klinischen Daten entsprechender Patienten.

Darunter fielen zum einen die herzspezifischen Parameter wie CK, CK-MB und Troponin T, aber auch die myokardszintigraphischen Untersuchungsergebnisse, die am Infarkttag und 14 Tage später ermittelt wurden und damit eine genaue Aussage über das betroffene Infarktareal bzw. die endgültige Infarktgröße ermöglichten. Ebenfalls miteinbezogen wurde die kardiale Ejektionsfraktion am Infarkttag, diese wurde angiographisch im Ventrikulogramm festgelegt. Mit der Größe des Infarktes, d.h. mit den entsprechenden myokardszintigraphisch gewonnenen Daten korrelierten Δ IL-8 und Δ RANTES. In der vorliegenden Arbeit erhielten die Patienten zum Zeitpunkt des Infarktes und 5 Tage später eine szintigraphische Untersuchung, in der mittels Anwendung des Radionuklids Thallium²⁰¹ die Myokarddurchblutung bzw. das Infarktareal dargestellt wurde.

Dabei zeigte sich ein Trend bei Δ IL-8 mit der Infarktgröße bei Aufnahme ($R=0,63$, $P=0,06$) und Δ RANTES mit der nach 5 Tagen ($R=0,68$, $P=0,04$).

Δ RANTES korrelierte mit dem maximalen CK- ($R=0,80$, $P=0,01$), CK-MB- ($R=0,75$, $P=0,01$) und TnT-Wert ($R=0,66$, $P=0,01$), das bedeutet RANTES steht mit der myokardialen Nekrose im Rahmen des Myokardinfarktes in Zusammenhang. Ein Zusammenhang mit dem kardialen Troponin errechnete sich für Δ IL-8 ($R=0,69$, $P=0,01$). Eine Korrelation der

unterschiedlichen Zytokinkonzentration mit der Restenoserate nach 6 Monaten konnte nicht entdeckt werden. (s. Tabelle 3.5.1.1.1).

Zytokine	Infarktgröße bei Aufnahme	Infarktgröße nach 14 Tagen	Maximaler CK-Wert	Maximaler CK-MB-Wert	Maximaler TnT-Wert	Ejektionsfraktion (Infarkttag)	Restenose
Δ RANTES	R = 0,10 P = 0,79	R = 0,68 P = 0,04	R = 0,80 P = 0,004	R = 0,75 P = 0,01	R = 0,66 P = 0,01	R = -0,51 P = 0,12	R = -0,28 P = 0,53
Δ IL-8	R = 0,63 P = 0,06	R = 0,35 P = 0,28	R = 0,51 P = 0,08	R = 0,23 P = 0,47	R = 0,69 P = 0,01	R = 0,38 P = 0,30	R = 0 P = 1

Tabelle 3.5.1.1.1.: Signifikante Korrelation der Δ Zytokinkonzentration mit kardialen Parametern

Mit der Infarktgröße assoziierten Genexpressionen waren RPS19 (R= 0,6, P= 0,04), DNA-binding protein (R= 0,66, P= 0,04) und Bystin (R= 0,7, P= 0,03). Zusammenhänge mit den veränderten CK- und CK-MB-Werten wies GATA 3 mit einer positiven Korrelation von 0,54 (P= 0,03 bzw. P= 0,11) auf, und HGF mit einer negativen Korrelation für CK- (R= -0,53, P= 0,05) und CK-MB-Werte (R= -0,57, P= 0,03). (s. Tabelle 3.5.1.1.2).

Gene	Infarktgröße bei Aufnahme	Infarktgröße nach 14 Tagen	Maximaler CK-Wert	Maximaler CK-MB-Wert	Maximaler TnT-Wert	Ejektionsfraktion (Infarkttag)	Restenose
LAT	R = -0,5 P = 0,11	R = -0,49 P = 0,14	R = 0,47 P = 0,07	R = 0,18 P = 0,50	R = 0,61 P = 0,01	R = 0,02 P = 0,92	R = -0,53 P = 0,08
GATA 3	R = 0,01 P = 0,95	R = 0,11 P = 0,75	R = 0,54 P = 0,03	R = 0,42 P = 0,11	R = 0,5 P = 0,05	R = -0,25 P = 0,35	R = 0,11 P = 0,72
HGF-R Prec.	R = 0,30 P = 0,39	R = 0,09 P = 0,80	R = -0,53 P = 0,05	R = -0,57 P = 0,03	R = -0,3 P = 0,3	R = 0,28 P = 0,34	R = 0,07 P = 0,84
DNA-binding Protein A	R = 0,22 P = 0,53	R = 0,66 P = 0,04	R = 0,33 P = 0,24	R = 0,34 P = 0,23	R = -0,06 P = 0,82	R = -0,20 P = 0,49	R = 0,11 P = 0,72
Bystin	R = 0,53 P = 0,10	R = 0,7 P = 0,03	R = -0,41 P = 0,13	R = -0,35 P = 0,21	R = -0,38 P = 0,17	R = 0,17 P = 0,54	R = 0,11 P = 0,72
60S Ribosomal Protein L6	R = 0,33 P = 0,31	R = 0,23 P = 0,51	R = 0,003 P = 0,98	R = -0,02 P = 0,93	R = -0,10 P = 0,70	R = -0,15 P = 0,58	R = 0,59 P = 0,05

Tabelle 3.5.1.1.2.: Signifikante Korrelation der leukozytären Genexpressionsanalyse mit kardialen Parametern

3.5.1.2. Zusammenhang mit Entzündungsparametern

Bei der Korrelation mit den Entzündungsparametern - Fibrinogen, CRP und der Leukozytenzahl - zeigten sich Zusammenhänge mit IL-6 und IL-10. IL-10 wies eine negative Korrelation mit dem maximalem CRP-Wert auf (R=-0,67, P= 0,015) (s. Tabelle 3.5.1.2.1.).

Je stärker die Konzentrationsabnahme von IL-6 war, desto kleiner war der entsprechende maximale Fibrinogen- (R=-0,72, P= 0,007) und CRP-Wert (R=-0,67, P= 0,0003), was

möglicherweise durch eine schnelle Anflutung des Zytokins und dem folgenden schnellen Konzentrationsabfall erklärt werden könnte.

Zytokine	Maximaler Fibrinogen-Wert	Maximale Leukozytenzahl	Maximaler CRP-Wert
Δ IL-6	R = -0,72 P = 0,007	R = 0,15 P = 0,62	R = -0,85 P = 0,0003
Δ IL-10	R = -0,53 P = 0,07	R = 0,14 P = 0,65	R = -0,67 P = 0,015

Tabelle 3.5.1.2.1.: Signifikante Korrelation der Δ Zytokinkonzentration mit Entzündungsparametern

Zusammenhänge mit dem Ausmaß der Genexpressionsveränderungen konnten bei 6 Genen festgestellt werden. Bezüglich des max. CRP-Anstiegs korrelierten Glutathion Peroxidase (GPX1) (R = 0,63, P = 0,01), RANTES-Precursor (R = 0,46, P = 0,05) und MSX-1 homebox protein (R= 0,59, P= 0,02) positiv. Auch scheint RANTES-Precursor mit der maximalen Leukozytenzahl (R= 0,61, P= 0,01) assoziiert zu sein – beides spricht für eine proinflammatorische Wirkung von RANTES-Precursor innerhalb der ersten 10 Tage eines Myokardinfarktes. (s. Tabelle 3.5.1.2.2.).

Gene	Maximaler Fibrinogen-Wert	Maximale Leukozytenzahl	Maximaler CRP-Wert
Prot.Comp.C5	R = 0,17 P = 0,62	R = -0,11 P = 0,74	R = 0,70 P = 0,02
Glutathion Per.	R = 0,63 P = 0,01	R = 0,13 P = 0,62	R = 0,24 P = 0,38
RANTES-Precursor	R = 0,46 P = 0,05	R = 0,16 P = 0,56	R = 0,61 P = 0,01
PAX-5	R = 0,39 P = 0,18	R = 0,47 P = 0,09	R = 0,71 P = 0,005

Tabelle 3.5.1.2.2.: Signifikante Korrelationen der leukozytären Genexpressionsanalyse mit den Entzündungsparametern

3.5.1.3. Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren

Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Adipositas und positive Familienanamnese wurden mit den unterschiedlichen Zytokinkonzentrationsänderungen korreliert.

IL-1 zeigte dabei eine stark negative Korrelation mit der positiven Familienanamnese. Signifikant positive Korrelation konnte für TNF mit Nikotinabusus (R=0,67, P= 0,01) und VEGF mit arterieller Hypertonie (R=0,69, P= 0,03) nachgewiesen werden. Für die restlichen

Zytokindaten bestanden keine Zusammenhänge mit den gängigen kardiovaskulären Risikofaktoren. (s. Tabelle 3.5.1.3.1.).

Zytokine	Diabetes mellitus	Arterieller Hypertonus	Hypercholesterinämie	Nikotinabusus	Adipositas	Positive Familienanamnese
Δ IL-1	R = 0,08 P = 0,78	R = -0,14 P = 0,64	R = 0,09 P = 0,75	R = 0,02 P = 0,93	R = -0,14 P = 0,66	R = -0,65 P = 0,02
Δ TNF	R = -0,39 P = 0,20	R = -0,31 P = 0,31	R = -0,02 P = 0,93	R = 0,67 P = 0,01	R = -0,36 P = 0,24	R = -0,15 P = 0,63
Δ VEGF	R = 0,51 P = 0,15	R = 0,69 P = 0,03	R = -0,08 P = 0,82	R = 0,43 P = 0,24	R = 0,41 P = 0,27	R = -0,18 P = 0,63

Tabelle 3.5.1.3.1.: Signifikante Korrelation der Δ Zytokinkonzentration mit kardiovaskulären Risikofaktoren

Insgesamt waren Korrelationen für 10 unterschiedliche Gene zu verzeichnen. Ein Zusammenhang mit der Zuckerkrankheit ergab sich für HGF (R= -0,66, P=0,01), Thymosin beta 10 (R=-0,5, P= 0,05) und RPS19 (R= -0,57, P= 0,02), sowie 60S Ribosomal Protein 13a (RPL13a) (R= 0,54, P= 0,03). Für Hypertoniker, Patienten mit HC und Nikotinabusus fand sich eine Korrelation mit Integrin alpha E precursor (R= -0,56, P= 0,05), Protein C Inhibitor (R= 0,78, P= 0,0008) und RPS19 (R= 0,5 bzw. -0,57, P= 0,05 bzw. 0,02).

Einen Einfluss auf die positive Familienanamnese könnte für Gene wie HGF (R= 0,53, P= 0,05), Paired box protein PAX-5 (R= -0,59, P= 0,03), Zinc-finger DNA-binding protein (R= -0,71, P= 0,005) und Raf-responsive zinc finger protein (R= -0,55, P= 0,03) bestehen (s. Tabelle 3.5.1.3.2.)

Gene	Diabetes mellitus	Arterieller Hypertonus	Hypercholesterinämie	Nikotinabusus	Positive Familienanamnese
IL-7-Rec.	R= -0,54 P= 0,03	R= 0,27 P= 0,31	R= 0,25 P= 0,36	R= 0,34 P= 0,21	R= -0,06 P= 0,81
Integrin Alpha E Precursor	R= -0,09 P= 0,76	R= -0,24 P= 0,44	R= -0,25 P= 0,42	R= -0,56 P= 0,05	R= -0,14 P= 0,64
Protein C Inhibitor	R= 0,28 P= 0,33	R= 0,78 P= 0,0008	R= 0,42 P= 0,12	R= 0,33 P= 0,26	R= -0,07 P= 0,78
HGF Rec. Prec.	R= -0,66 P= 0,01	R= -0,43 P= 0,13	R= 0,2 P= 0,49	R= -0,02 P= 0,94	R= 0,53 P= 0,05
HDGF	R= -0,23 P= 0,40	R= 0,24 P= 0,37	R= 0,06 P= 0,82	R= -0,21 P= 0,43	R= -0,49 P= 0,06
Thymosin Beta 10	R= -0,5 P= 0,05	R= -0,15 P= 0,58	R= 0,31 P= 0,25	R= 0,21 P= 0,43	R= 0,26 P= 0,34
Zinc-finger DNA-binding Protein	R= -0,05 P= 0,85	R= 0,24 P= 0,41	R= -0,46 P= 0,10	R= -0,20 P= 0,49	R= -0,71 P= 0,005
Raf-responsive Zinc Finger Protein	R= 0,15 P= 0,58	R= 0,09 P= 0,74	R= -0,25 P= 0,36	R= 0,3 P= 0,26	R= -0,55 P= 0,03

Tabelle 3.5.1.3.2.: Signifikante Korrelationen des leukozytären Genexpressionsprofils mit kardiovaskulären Risikofaktoren

3.5.1.4. Zusammenhang mit Medikation

Lediglich für RANTES konnte mit der Gabe von Diuretika ein Zusammenhang zwischen experimentellen und klinischen Daten nachgewiesen werden ($R=0,71$, $P= 0,02$). Alle anderen Zytokindaten konnten nicht mit der unterschiedlichen Medikation in Bezug gesetzt werden (s. Tabelle 3.5.1.4.1.).

Zytokine	β -Blocker	ACE-Hemmer	Diuretika	Thrombozytenaggregationshemmer
Δ RANTES	R= 0,29 P= 0,41	R= 0,52 P= 0,12	R= 0,71 P= 0,02	R= -0,52 P= 0,12

Tabelle 3.5.1.4.1.: Signifikante Korrelation der Δ Zytokinkonzentration mit Medikation

3.5.1.5. Zusammenhang mit Genexpressionsveränderungen

Die Expressionsänderungen der Gene wurden mit der quantitativen Veränderung der Zytokinkonzentrationen korreliert. Ein möglichen Wirkungszusammenhang mit RANTES zeigte das Gen HGF ($R= -0,66$, $P= 0,05$). Mit den anderen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-8 und TNF wurde eine Korrelation sichtbar bei Genen wie Thymosin beta 10 ($R= -0,65$, $P= 0,01$), UV excision repair protein RAD23a ($R= -0,68$, $P= 0,01$), IL-7 Receptor

(R= 0,66, P= 0,01), Linker for activation of T-Cells (LAT) (R= 0,82, P= 0,009), HGF (R= -0,58, P= 0,05), Raf responsive zinc finger protein (R= 0,66, P= 0,01), Homebox A1 Protein (R= 0,58, P= 0,04) und cAMP dependent protein kinase beta-catalytic subunit (R= 0,70, P= 0,02). Konzentrationsänderungen von VEGF korrelierten mit Proteasom Component C5 positiv (R= 0,81, P= 0,02) (s. Tabelle 3.5.1.5.1.).

Gene	Δ Rantes	Δ IL-8	Δ IL-6	Δ IL-1	Δ IL-12	Δ IL-10	Δ TNF	Δ VEGF
Proteasom Comp. C5	R= 0,48 P= 0,26	R= 0,21 P= 0,60	R= 0,35 P= 0,38	R= -0,37 P= 0,36	R= 0,21 P= 0,60	R= 0,48 P= 0,21	R= 0,31 P= 0,44	R= 0,81 P= 0,02
IL-7-Rec.	R= -0,17 P= 0,62	R= -0,08 P= 0,79	R= 0,30 P= 0,33	R= 0,03 P= 0,92	R= 0,19 P= 0,53	R= 0,46 P= 0,12	R= 0,66 P= 0,01	R= -0,26 P= 0,48
LAT	R= 0,27 P= 0,44	R= 0,82 P= 0,0009	R= -0,04 P= 0,86	R= -0,10 P= 0,74	R= -0,36 P= 0,24	R= -0,21 P= 0,49	R= -0,10 P= 0,74	R= -0,2 P= 0,60
HGF Rec. Prec.	R= -0,66 P= 0,05	R= 0,04 P= 0,90	R= 0,43 P= 0,18	R= -0,53 P= 0,05	R= -0,006 P= 0,98	R= 0,41 P= 0,19	R= 0,09 P= 0,78	R= -0,63 P= 0,09
Thymosin Beta 10	R= -0,34 P= 0,32	R= 0 P= 1	R= 0,52 P= 0,07	R= -0,65 P= 0,01	R= 0,12 P= 0,70	R= 0,55 P= 0,06	R= 0,06 P= 0,84	R= 0,31 P= 0,40
RAD23a	R= 0,39 P= 0,25	R= 0,41 P= 0,17	R= -0,51 P= 0,08	R= 0,23 P= 0,45	R= -0,42 P= 0,17	R= -0,68 P= 0,01	R= -0,18 P= 0,55	R= -0,36 P= 0,33
Raf-responsive Zinc Finger Protein	R= 0,05 P= 0,88	R= -0,07 P= 0,81	R= 0,04 P= 0,89	R= 0,66 P= 0,01	R= 0,48 P= 0,10	R= -0,06 P= 0,82	R= 0,29 P= 0,41	R= 0,29 P= 0,41
Homebox A1 Protein	R= -0,03 P= 0,93	R= 0,02 P= 0,93	R= 0,05 P= 0,85	R= 0,58 P= 0,04	R= 0,34 P= 0,27	R= 0,006 P= 0,98	R= 0,39 P= 0,20	R= 0,23 P= 0,54
PKAC-beta	R= 0,02 P= 0,95	R= 0,16 P= 0,65	R= 0,17 P= 0,62	R= 0,70 P= 0,02	R= 0,37 P= 0,28	R= 0,03 P= 0,93	R= 0,32 P= 0,36	R= 0,57 P= 0,18

Tabelle 3.5.1.5.1.: Signifikante Korrelation der Δ Zytokinkonzentrationen mit leukozytärer Genexpressionsanalyse

3.5.2. Korrelation der Genexpressionsänderungen von Endothelialen Zellen nach Plasmastimulation

Die im Microarray gewonnenen Daten bzw. die als signifikant errechneten veränderten Genexpresionen mit einer Ration < 0,5 bzw. > 1,5 wurden mit kardialen Parametern, der Restenoserate und den Entzündungsparametern korreliert und auf mögliche Zusammenhänge untersucht.

3.5.2.1. Kandidatengene mit Einfluss auf die Infarktgröße und kardiale Parameter

In der endothelialen Versuchsreihe, bei der endotheliale Zellen mit Plasmaproben der Infarktpatienten stimuliert wurden, wurde ein Zusammenhang deutlich zwischen signifikanten Genen aus allen Genklassifikationen und den kardialen Parametern wie Infarktgröße, maximalen CK-, CK-MB und Troponin T Werten. In der Literatur wurde bislang in einigen dieser Fälle keine Korrelation mit myokardialen Ischämien oder dem MI dokumentiert (s. Tabelle 3.5.2.1.1.).

Die Hochregulierung von Parkin, das eine wesentliche Rolle bei der Parkinson-Erkrankung spielt, nimmt sowohl auf die maximalen CK-($R=-0,61$, $P= 0,04$) und CK-MB-Werte ($R= -0,60$, $P= 0,04$) als auch auf die Troponin-T Werte ($R= -0,65$, $P= 0,02$) Einfluss. Damit könnte das bis jetzt nicht mit MI in Zusammenhang gebrachte Gen eine Rolle bei der Myokardnekrose zu spielen. Allerdings konnten keine Zusammenhänge mit der Infarktgröße bei Aufnahme oder nach 14 Tagen festgestellt werden.

Ein Wirkungszusammenhang mit herzspezifischen Enzymen zeigte auch Glycin receptor alpha-1 subunit precursor, dessen Hochregulierung positiv mit dem maximalen CK-Wert ($R= 0,81$, $P= 0,04$) der entsprechenden Patienten korrelierte. Dieses Gen wies allerdings keinen Zusammenhang mit der Infarktgröße bei Aufnahme oder nach 14 Tagen nach.

Die die Infarktgröße beeinflussenden expressionsgenetischen Veränderungen gingen auf Aurora related kinase-1 ($R= -0,72$, $P= 0,01$), Preprotachykinin-b ($R= -0,92$ bzw. $-0,86$, $P= 0,007$ bzw. $0,02$) und Phenylalanin-Hydroxylase ($R= -0,77$, $P= 0,02$) zurück. In allen 3 Fällen konnte eine Hochregulierung der genetischen Aktivität festgestellt werden, die negativ mit den Werten für die Infarktgröße bei Aufnahme und nach 14 Tagen in Zusammenhang stand.

Ein Zusammenhang mit der Restenose nach 6 Monaten konnte für 2 Gene ermittelt werden – Beta-neoendorphin-dynorphin-precursor ($R=0,63$, $P= 0,03$) und Pyruvate Dehydrogenase Kinase Kinase Precursor ($R=0,75$, $P= 0,01$). Die Zunahme der Genaktivität von Beta-neoendorphin-dynorphin-precursor und die Abnahme von Pyruvate Dehydrogenase Kinase Kinase Precursor konnte mit dem Auftreten einer Restenose nach einem halben Jahr in Zusammenhang gebracht werden. (s. Tabelle 3.5.2.1.1.).

Gene	Infarktgröße bei Aufnahme	Infarktgröße nach 14 Tagen	Maximaler CK-Wert	Maximaler CK-MB-Wert	Maximaler TnT-Wert	EF (Infarkttag)	Restenose
Aurora-Rel.Kinase1	R= -0,72 P= 0,01	R= -0,54 P= 0,06	R= -0,15 P= 0,61	R= -0,18 P= 0,54	R= -0,30 P= 0,31	R= 0,17 P= 0,59	R= 0,51 P= 0,10
c-fer proto-oncogen	R= 0,01 P= 0,95	R= 0,33 P= 0,31	R= -0,06 P= 0,84	R= -0,007 P= 0,98	R= -0,08 P= 0,78	R= -0,77 P= 0,005	R= 0,10 P= 0,77
Beta-neoendorphin-Dynorphin Prec.	R= -0,03 P= 0,91	R= -0,18 P= 0,57	R= -0,31 P= 0,29	R= -0,24 P= 0,42	R= 0,07 P= 0,82	R= -0,27 P= 0,36	R= 0,63 P= 0,03
Glycin Rec. Alpha-1 Subunit Prec.	R= 0,33 P= 0,51	R= 0,72 P= 0,10	R= 0,81 P= 0,04	R= 0,55 P= 0,25	R= 0,35 P= 0,55	R= 0,46 P= 0,35	R= -0,71 P= 0,16
Parkin	R= -0,56 P= 0,11	R= -0,44 P= 0,19	R= -0,61 P= 0,04	R= -0,60 P= 0,04	R= 0,62 P= 0,05	R= -0,65 P= 0,02	R= -0,25 P= 0,49
Prepo-tachykinin Beta	R= -0,92 P= 0,007	R= -0,86 P= 0,02	R= -0,55 P= 0,19	R= -0,28 P= 0,53	R= 0,88 P= 0,01	R= -0,59 P= 0,15	R= 0 P= 1
Pyruvate Dhydr. Kinase Kinase Prec.	R= 0,34 P= 0,33	R= 0,53 P= 0,08	R= 0,31 P= 0,34	R= 0,27 P= 0,42	R= -0,51 P= 0,12	R= 0,26 P= 0,42	R= 0,75 P= 0,01

Tabelle 3.5.2.1.1.: Korrelation endotheliales Genexpressionsprofil mit kardialen Parametern

3.5.2.2. Kandidatengene mit Einfluss auf die systemische Entzündungsreaktion

Die expressiongenetischen Veränderungen wurden mit den maximalen Fibrinogen-, CRP- und Leukozyten-Werten in Beziehung gesetzt.

Ein Zusammenhang mit dem maximalen Fibrinogen-Wert konnte für 1 Gen nachgewiesen werden - Erythrozyte glucose Transporter zeigte ein positive Korrelation (R=0,52, P= 0,05). Hingegen korrelierten die maximalen Leukozytenzahlen positiv mit Adenosine A2 Receptor (R=-0,60, P= 0,03), Ubiquitin-conjugating enzyme (R=0,61, P= 0,03) und Brain glucose transporter (R=0,61, P= 0,03). Ein Zusammenhang zwischen den genetischen Veränderungen der Endothelien und dem maximalen CRP-Wert konnte nicht entdeckt werden (s. Tabelle 3.5.2.2.1.).

Gene	Maximaler Fibrinogen-Wert	Maximale Leukozytenzahl	Maximaler CRP-Wert
Adenosine A2 Rec.	R= 0,18 P= 0,49	R= -0,60 P= 0,03	R= 0,19 P= 0,52
Ubiquitin-conj. Enzyme	R= 0,43 P= 0,10	R= 0,61 P= 0,03	R= 0,23 P= 0,44
Erythrozyte Gluc. Transporter	R= 0,52 P= 0,05	R= 0,50 P= 0,09	R= 0,20 P= 0,50
Brain Glucose Trans.	R= 0,42 P= 0,12	R= 0,61 P= 0,03	R= 0,07 P= 0,81

Tabelle 3.5.2.2.1: Korrelation endotheliales Genexpressionsprofil mit Entzündungsparametern

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse der inflammatorischen Vorgänge im Myokardinfarkt. Um die systemischen und die lokalen Reaktionen voneinander abgrenzen zu können, wurde ein Modell entwickelt, in dem eine Genexpressionsanalyse mit über 1182 Genen zu einem an zirkulierenden Leukozyten und zum anderen an kultivierten Endothelien (HUVECs) vorgenommen wurde. Die Plasmakonzentrationsmessungen pro- und antiinflammatorischer Mediatoren wie RANTES, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF lieferten zusätzliche Informationen über infarktbedingte Zellreaktionen auf Proteinebene. Die zu untersuchenden Proben entstammten Myokardinfarktpatienten, die Blutproben wurden zu 2 verschiedenen Zeitpunkten entnommen (1. Blutentnahme vor Intervention bzw. innerhalb 24 Stunden nach Schmerzbeginn und 2. Blutentnahme 5-10 Tage später).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine signifikante Hochregulierung proinflammatorischer Gene sowie proinflammatorischer Zytokine wie RANTES. Insbesondere Mediatoren auf RNA-Ebene - mit der Hauptfunktion der Aktivierung von Leukozyten wie z.B. LAT, IL-7, RANTES, GATA 3 - werden infarktbedingt hochreguliert. Neben dieser anhaltenden Aktivierung der Inflammation auf RNA-Ebene durch eben genannte Mediatoren liessen sich auch Zusammenhänge mit den kardialen Parametern entdecken. So ergab sich für das RANTES-Protein und IL-8 ein Zusammenhang mit den kardialen Enzymen, was erneut die Frage nach dem Synthesort der beiden Mediatoren aufkommen lässt und eine mögliche kardiogene Genese in den Vordergrund des Interesses rückt.

Signifikante Konzentrationsänderungen waren bei VEGF, RANTES und IL-6 festzustellen. Interleukin 6 nahm in der untersuchten Patientengruppe im Verlauf deutlich ab, dagegen zeigte VEGF eine deutliche Zunahme, genauso wie das mit VEGF assoziierte Adenosin-A₂, das den antiinflammatorischen Gegenpart in der vorliegenden Arbeit einnimmt und einen möglichen kardioprotektiven Wert für die Infarktpatienten darstellt. In dem Verlauf der Konzentrationen für IL-6 und RANTES zeigte sich eine Dynamik, die viele Fragen in den Raum stellt.

4.1. Proinflammatorische Veränderungen

4.1.1. Hochregulierung proinflammatorischer Gene

Die Aktivierung von Leukozyten bei Infarktpatienten im Verlauf wurde bereits in verschiedenen Untersuchungen festgestellt und dokumentiert (Pasqui et al, 2003; Zalai et al, 2001). Diese Aktivierung beeinflusst auch die Progredienz der Arteriosklerose und die Plaquevulnerabilität (Liuzzo et al, 2000).

In der vorliegenden Arbeit war eine verstärkte Expression von LAT, IL-7 Receptor, GATA 3 und RANTES-Precursor auszumachen. Diese Mediatoren haben eines gemeinsam: sie fördern die Leukozytenaktivierung und tragen zu einer anhaltenden inflammatorischen Reaktion im Rahmen des Myokardgeschehens bei.

Eine Schlüsselreaktion in der Immunantwort ist die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors, mit dessen Hilfe als fremd erkannte Peptide gebunden werden können. Ein wichtiger Faktor zur Aktivierung dieser Schritte stellt der Linker for activation of T-cells (LAT) dar. Bei LAT handelt es sich um einen membranständigen Adaptor, der von T-Zellen, NK-Zellen, Mastzellen, Megakaryozyten, B-Zellen und Thrombozyten exprimiert wird. LAT steht im Zusammenhang mit der Funktion reifer T-Zellen, der Reifung von T-Zellen und Aktivierung von NK-Zellen (Chuang et al, 2001).

Somit lässt sich die infarktbedingte Zunahme von LAT als eine Verstärkung der immunologischen T-Zell-Antwort auf Ischämie und Nekrose interpretieren. Inwieweit LAT die unterschiedlichen Subpopulationen Th1 bzw. Th2 stützt ist in den aktuellen wissenschaftlichen Studien noch nicht beschrieben worden.

Ein weiterer die Leukozyten-Hämostase betreffender Faktor ist IL-7 und sein spezifischer Rezeptor IL-7-Receptor. IL-7 wird hauptsächlich von Epithelien, Keratinozyten, Hepatozyten, dendritischen Zellen und von Thrombozyten (Damas et al, 2003) gebildet und ist einer der Hauptregulatoren der T-Zell-Hämostase (Fry et al, 2001). Seine Funktion ist an das Vorhandensein des spezifischen Rezeptors IL-7R gebunden, der auf unreifen B-Zellen, Thymozyten und reifen T-Zellen exprimiert wird (Armitage et al, 1991; Sudo et al, 1993).

IL-7 fungiert auch als wichtiger Mediator bei der T-Zell Aktivierung, der T-Zell Proliferation, reguliert die Entwicklung der B- und T-Zell-Linien aus den hämatopoetischen Stammzelllinien (Akashi et al, 1998) und wirkt des weiteren bei der Aktivierung von Monozyten und NK-Zellen mit der Folge vermehrter Zytokinfreisetzung mit (Li et al, 2000; Fry et al, 2001). Darüber hinaus beeinflusst IL-7 die Progression der Arteriosklerose und das Auftreten eines

ACS. Damas et al (2003) belegten den Zusammenhang zwischen IL-7 und der ausgedehnten Inflammation im Rahmen einer KHK bei stabiler und instabiler Angina Pectoris. Diese Arbeitsgruppe untersuchte IL-7-Plasmakonzentrationen bei 3 verschiedenen Patientengruppen. Eine Gruppe mit instabiler und stabiler Angina Pectoris wurde einer gesunden Kontrollgruppe gegenübergestellt. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche IL-7-Zunahme bei den KHK-Patienten vor allem bei IAP. Damas et al (2003) stützen die Hypothese, dass aktivierte Thrombozyten zu einer vermehrten IL-7 Synthese beitragen.

Die in der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Daten belegen zum einen eine signifikante Hochregulierung des IL-7-Rezeptors, zum anderen eine vermehrte Synthese durch zirkulierende Leukozyten.

Lymphozyten und vor allem T-Zellen sind bekannter Maßen wichtige Faktoren bei kardialen Ereignissen. Die Differenzierung in die Subpopulationen Th1 und Th2 ist Gegenstand moderner wissenschaftlicher Forschung. Th1-Zellen aktivieren proinflammatorische Vorgänge, Th2-Zellen wirken als Gegenspieler, inhibieren die Th1-gesteuerten Reaktionen und reduzieren die Inflammation. Bislang wurden Th1-begünstigende Reaktionen dem ACS (Steppich et al, 2007) zugeordnet und scheinen aufgrund dieser Tatsache einen Einfluss auf eine mögliche Plaqueruptur zu haben.

Dem Hauptmediator von RANTES-Precursor (=RANTES) wurde mitunter eine bedeutende Rolle bei der Begünstigung der Th1 induzierten Reaktionen im Rahmen eines ischämischen, kardialen Ereignisses zugeordnet. Obwohl IL-7 keine zentrale Rolle bei der Differenzierung der T-Zellen in die Subpopulationen Th1 bzw. Th2 spielt, konnte eine Begünstigung der Th1-Reaktionen durch IL-7 entdeckt werden (Mehrotra et al, 1995; Borger et al, 1996; Gringhuis et al, 1997).

Auch in der vorliegenden Untersuchung waren Regulationen der Th2-gesteuerten Reaktionen in der Expressionsanalyse zu entdecken. Das hier ebenfalls hochregulierte GATA 3 spielt als Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle bei der Differenzierung der Th1/Th2-Subpopulationen. GATA 3 findet sich in nativen CD4+ T-Zellen und seine vermehrte Expression bedeutet möglicherweise eine Reduzierung der Th1-Differenzierung und eine Zunahme der Bildung von Th2-Zellen (Zhang et al, 1997; Lee et al, 1998).

Allerdings zeigte der HGF-Rezeptor (c-Met) in der aktuellen Analyse eine reduzierte Aktivität im Verlauf. C-Met wird auf endothelialen Zellen, Gefäßzellen und Kardiomyozyten exprimiert und aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit möglicherweise auch auf

zirkulierenden Leukozyten. HGF spielte bisher eine wichtige Rolle bei Myokarditis-Patienten in der Begünstigung der Th2-Antwort (Futamatsu et al, 2005) und nahm Einfluss auf die Reifung von T-Zellen (Tamura et al, 1998).

Die Daten dieser Arbeit belegen also eindeutig eine anhaltende systemische Leukozytenaktivierung innerhalb der ersten Tage nach einem Infarktereignis. Auch zeigt die expressionsgenetische Analyse eine vermehrte Expression proinflammatorischer Mediatoren durch zirkulierende Leukozyten mit einer signifikant ansteigenden Expression in den ersten Tagen nach dem kardialen Ereignis.

4.1.2. RANTES-Precursor und zirkulierendes RANTES in Leukozyten

RANTES gehört zu den C-C Chemokinen und wird von T-Lymphozyten – hauptsächlich von CD8+ T-Zellen, epithelialen Zellen, Fibroblasten und Thrombozyten (Kameyoshi et al, 1992; Holme et al, 1998) sezerniert. Durch Bindung an Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3, CCR4 und CCR 5 induziert RANTES die Leukozytenmigration in das entzündliche Gewebe (Meurer et al, 1993) und wirkt chemotaktisch auf Monozyten und T-Gedächtnis-Zellen (zusammengefasst von Schall, 1991). Durch Aktivierung von Leukozyten und Thrombozyten (Nomura et al, 2003) hat RANTES in der Kardiologie zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Die RANTES-induzierte T-Zell-Aktivierung hat sowohl T-Zell-Proliferation und Apoptose als auch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-2, IL-5, Interferon-gamma und MIP-1beta zur Folge (Bacon et al, 1996; Appay et al, 1999 & 2000).

Doch beeinflusst dieses Chemokin nicht nur oben genannte Zellen und Gewebe, es hat auch eine Wirkung auf Eosinophile und Basophile Granulozyten, Dendritische Zellen, Mastzellen und NK-Zellen (Schall et al, 1991). Bislang konnte eine Vielzahl von Erkrankungen mit RANTES in Verbindung gebracht werden, so z.B. HIV-Infektion, atopische Dermatitis, Arthritis, Asthma bronchiale, Glomerulonephritis, Endometriose, Neoplasien und die Arteriosklerose (zusammengefasst von Appay und Rowland-Jones, 2001).

Darüber hinaus hat RANTES eine Bedeutung bei der Differenzierung der T-Zellen in die Subpopulationen Th1 und Th2 erlangt. Dabei steht es vor allem im Zusammenhang mit der Begünstigung von Th1-getragenen Reaktionen im Rahmen ischämischer, kardialer Ereignisse.

Im Verlauf des akuten Myokardinfarktes kommt es in der vorliegenden Arbeit sowohl zu einer Hochregulierung von RANTES-Precursor auf Transkriptionsebene in zirkulierenden Leukozyten als auch zu einer erhöhten Konzentration von RANTES im Plasma von

Infarktpatienten mit einer signifikante Zunahme über die ersten 5-10 Tage. Eine interventionsbedingte Abnahme des inflammatorischen Mediators - wie von Nomura et al (2003) beschrieben - konnte nicht bestätigt werden.

4.1.3. Assoziation von RANTES auf den Myokardschaden

Die Assoziation der RANTES-Konzentrationsänderungen mit der Infarktgröße nach 14 Tagen könnte mit der Funktion der Leukozytenaktivierung erklärt werden.

Die Erkenntnis, dass ein Zusammenhang zwischen Leukozyten- und Thrombozytenaktivierung nach einem MI bzw. postinterventionell (Nomura et al, 2003) besteht, macht den möglichen Einfluss auf postinterventionelle Komplikationen deutlich. RANTES kann die MCP-1 Freisetzung induzieren (Weyrich et al, 1996) und MCP-1 beeinflusst die Restenoserate nach elektiver PTCA (Hokimoto et al, 2000). Allerdings konnte die vorliegende Untersuchung keine Korrelation belegen zwischen den RANTES-Konzentrationsänderungen und den Restenoseraten nach einem halben Jahr.

Parissis et al (2002) kamen zu der Erkenntnis, dass ein Zusammenhang zwischen RANTES und einer schlechten kardialen Funktion bzw. Herzversagen nach 30 Tagen eintritt. Zumindest einen Einfluss auf die kardiale Funktion am Infarkttag belegen unsere Daten nicht. Allerdings scheint der Einfluss auf die Infarktgröße schon nach 14 Tagen zu bestehen und mit der Konzentrationsänderung des proinflammatorischen Zytokins einherzugehen. Cavioglu et al (2007) erbrachten den Zusammenhang zwischen erniedrigten RANTES-Konzentrationen im Plasma von Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung und dem erhöhten Auftreten eines Myokardinfarktes bzw. einer kardialen Mortalität. Somit ist die Frage nach einer möglichen protektiven Wirkung dieses Chemokins aufgekommen.

Angesichts dieser Erkenntnisse könnte RANTES einen Einfluss auf das Ausmaß des myokardialen Schadens haben. Auch belegen die vorliegenden Daten den Zusammenhang einer fortwährenden Leukozytenaktivierung mit einer erhöhten Konzentration von RANTES auf Transkriptionsebene und Proteinebene im Rahmen eines MI und stützen weiterhin die Hypothese einer kardialen Genese dieses proinflammatorischen Mediators. Die enge Korrelation mit den kardialen Enzymen (Troponin T, CK und CK-MB) in der vorliegenden Arbeit deutet darauf hin.

In der Literatur wurden bislang Thrombozyten, epitheliale Zellen, Fibroblasten und zytotoxische T-Lymphozyten für die RANTES-Sekretion verantwortlich gemacht.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der vorliegenden Untersuchungen die Aussage machen, dass zirkulierende Leukozyten und auch möglicherweise kardiale Zellen als Quelle für die RANTES-Sekretion im Infarkt anzusehen sind. Als möglichen Mechanismus könnte man die kardiale Nekrose ansehen, in deren Folge es zur vermehrten RANTES-Sekretion lokal und systemisch durch Leukozyten kommt.

4.1.4. Zirkulierendes IL-6

IL-6 zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen mit prokoagulatorischen Fähigkeiten durch Induktion von TF-Expression in Monozyten (Marx et al, 1997). Ob IL-6 aus arteriosklerotischen Plaques im MI freigesetzt wird, kardial (Neumann et al, 1995) oder systemisch (Funayama et al, 2004) synthetisiert wird, ist nach wie vor Gegenstand wissenschaftlicher Studien.

Neumann et al (1995) beschrieben eine reperfusionsbedingte, kardiale Genese des proinflammatorischen Mediators bei Infarktpatienten. Im Rahmen einer kardialen Ischämie kommt es zu einem signifikanten IL-6 Anstieg im Serum der Infarktpatienten (Manten et al, 1998; Buratti et al, 2001), der Maximalwert wird nach 3 Tagen, 1 Woche bzw. schon nach 48 Stunden (Ott et al, 1998) erreicht.

Einige Autoren beschreiben IL-6 als prediktiven Marker (Marciniak et al, 2003) für spätere erneute kardiale Ereignisse bzw. den plötzlichen Herztod. Auch beeinflussen erhöhte IL-6-Konzentrationen den klinischen Verlauf innerhalb der ersten 30 Tage nach ACS (Passoni et al, 2002). Bisher wurden Zusammenhänge von IL-6 mit Entzündungsparametern wie CRP (Marciniak et al, 2003; Gabriel et al, 2004), mit kardialen Parametern wie CK-MB (Marciniak et al, 2003) und mit dem Remodeling nach dem Infarkt beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei der signifikanten IL-6-Abnahme im Plasma der Infarktpatienten innerhalb der ersten Tage nach einem MI eine inverse Korrelation mit Entzündungsparametern wie dem maximalen Fibrinogen- und CRP-Wert der Infarktpatienten. Möglicherweise könnte dies mit der schnellen Anflutung des Zytokins und dem anschließendem raschen Konzentrationsabfall erklärt werden. Je schneller die möglicherweise kardiale Freisetzung erfolgt, desto schneller ist der Konzentrationsabfall in den ersten Tagen und desto schneller ist auch die Anflutung von CRP und Fibrinogen als Akute-Phase-Proteine. Schon Neumann et al (1995) beschrieben eine schnelle, kardial bedingte Anflutung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-8 im Rahmen der Reperfusion.

Allerdings sah man in der hier vorliegenden Arbeit keine Korrelation mit kardialen Parametern wie Infarktgröße und den herzspezifischen Enzymen. Auch liess sich auf RNA-Ebene - sowohl in kultivierten Endothelzellen als auch in zirkulierenden Leukozyten - kein Nachweis einer signifikanten Regulierung von IL-6 nachweisen.

Eine mögliche medikamentöse Beeinflussung durch Thrombozytenaggregationshemmer wie z.B. durch Clopidogrel auf die Serumkonzentration von IL-6 konnte von Quinn et al (2004) widerlegt werden. Dagegen wurde ein Einfluss der Statine auf die inflammatorischen Mediatoren nachgewiesen, denn nach 3-wöchiger Behandlung mit Simvastatin zeigte sich eine Reduktion des systemischen IL-6-Wertes (Luo et al, 2004).

Aus diesen Gründen kann auch in der vorliegenden Arbeit eine medikamentös bedingte Abnahme der systemischen IL-6-Konzentration nicht ausgeschlossen werden.

4.1.5. Assoziation von IL-8 auf den Myokardschaden

IL-8 zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen und wird infarktbedingt vermehrt freigesetzt. Die mögliche kardiale IL-8-Synthese (Neumann et al, 1995) ist immer noch Gegenstand modernster Forschung, auch Makrophagen sind an der IL-8-Bildung beteiligt (Kaski et al, 2000). Dieses Chemokin fungiert als potenter Aktivator von Neutrophilen, beeinflusst die Rekrutierung inflammatorischer Zellen in das geschädigte Myokard und nimmt dadurch Einfluss auf die Größe des Myokardschadens (Abe et al, 1993). Aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen zu Folge, hat IL-8 eine große Bedeutung bei der möglichen Stammzellmobilisation im Rahmen des Myokardinfarktes (Schömig et al, 2006) und könnte auf diese Weise eine wichtige, therapeutische Bedeutung bei der Verbesserung der myokardialen Funktion erlangen (Schömig et al, 2006). Somit hat IL-8 im Infarktgeschehen duale Wirkmechanismen: inflammatorische Reaktion durch Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie möglicherweise Anregung der Vaskulogenese durch Mobilisierung von Stammzellen.

Nach dem heutigen wissenschaftlichen Erkenntnisstand kommt es infarktbedingt zu einer schnellen, transienten Anflutung von IL-8 (de Winter et al, 1997) im Serum der Patienten. Innerhalb der ersten 22 Stunden wird IL-8 vermehrt freigesetzt (Abe et al, 1993) und ein Maximalwert schon nach 24 Stunden (Pannitteri et al, 1997) erreicht. Die Daten der vorliegenden Untersuchung belegen nur eine leichte, nicht signifikante Zunahme der IL-8-Konzentration im Serum innerhalb der ersten 5-6 Tage nach dem Infarkt.

Wie bei de Winter et al (1997) konnten auch bei dieser Arbeit keine Zusammenhänge mit der Kreatinkinase und der herzspezifischen CK-MB festgestellt werden, allerdings ergab sich eine Korrelation der IL-8 Konzentrationszunahme mit der myokardszintigraphisch festgelegten Infarktgröße bei Aufnahme und der Myokardnekrose.

Der Einfluss von IL-8 auf den Myokardschaden scheint angesichts der IL-8 bedingten Neutrophilen-Rekrutierung sehr plausibel. Zumindest im Tiermodell konnten Antikörper gegen Neutrophile zeigen, dass eine verminderte IL-8- und IL-6-Synthese eine geringere Infarktgröße mit geringerer Infiltration von Neutrophilen ins Myokard bedingt (Kohtani et al, 2002). Jedoch zeigten auch neueste wissenschaftliche Erkenntnisse die mögliche Stammzellmobilisierung durch IL-8 bei Infarktpatienten. Schömig et al (2006) wiesen einen Zusammenhang mit zirkulierenden Vorläuferzellen und der erhöhten Serumkonzentration des proinflammatorischen Zytokins nach.

Bezüglich des prediktiven Wertes von IL-8 herrschen unterschiedliche Meinungen – Dominguez-Rodriguez (2005) erachten IL-8 als Prediktor für Herzversagen bei Infarktpatienten und konnten höhere Werte bei Patienten mit kompliziertem Verlauf nach einem Infarkt feststellen. Auch Qi et al (2003) und Marciniak et al (2003) sprechen IL-8 einen prediktiven Wert zu. Allerdings konnten wir keine Assoziation der IL-8-Konzentration mit der Restenoserate nach einem halben Jahr entdecken.

Somit untermauern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass IL-8 einen wichtigen Faktor bei der Größe des Myokardschadens (Abe et al, 1993) darstellt.

4.1.6. VEGF- Verlauf

Nach den heutigen wissenschaftlichen Erkenntnissen führen Hypoxie und MI zu einer vermehrten VEGF-Expression in SMC, Kardiomyozyten und endothelialen Zellen. Des Weiteren können Megakaryozyten (Möhle et al, 1997), Lymphozyten, Makrophagen (Berse et al, 1992) und Neutrophile (Taichman et al, 1997) VEGF sezernieren.

In ischämischen Geweben fördert VEGF die Angiogenese und die Neovaskularisation. In experimentellen Studien konnte ischämiebedingt eine vermehrte VEGF-mRNA-Expression sowohl in Endothelialen Zellen (in vitro) (Namiki et al, 1995) als auch im Infarktareal bei Ratten (Li et al, 1996) nachgewiesen werden. In der endothelialen Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit konnte keine verstärkte VEGF-Expression nachgewiesen werden.

Auch Li et al (1996) zeigten auf, dass die vermehrte VEGF-Expression die ersten 7 Tage anhielt und ein Rückgang erst nach 6 Wochen zu verzeichnen war. Seko et al (1997)

vermerkten, dass es im Infarktgeschehen auch zu einer erhöhten Serumkonzentration von VEGF kommt, und beschrieben VEGF als Marker für myokardiale Ischämien.

Die zirkulierenden VEGF-Konzentrationen werden als Folge der lokalen Expressionssteigerung erachtet (Tamura et al, 1999). Bislang gemessene Serumkonzentrationen bei Infarktpatienten zeigten eine Zunahme innerhalb der ersten 7 -14 Tage (Tamura et al, 1999; Soeki et al, 2000) mit einem Maximalwert nach 14 Tagen (Hojo et al, 2000) und einen Rückgang dieser Werte nach 14-21 Tagen (Soeki et al, 2000) bzw. nach 28 Tagen (Tamura et al, 1999). Dies spricht für eine anhaltende, kontinuierliche Sekretion von VEGF. In der Versuchsreihe dieser Arbeit zeigte sich eine signifikante Zunahme der VEGF-Konzentration schon innerhalb der ersten 5 Tage nach dem Infarkt, und nicht erst nach 7 Tagen (Tamura et al, 1999).

Ein Zusammenhang zwischen VEGF und den herzspezifischen Enzymen CK bzw. CK-MB (Kawamoto et al, 1998; Hojo et al, 2000) konnte bis dato nachgewiesen werden, auch eine Korrelation mit dem CRP-Wert wurde beschrieben (Soeki et al, 2000, Wojakowski et al, 2004). Ebenso weist der Anstieg der zirkulierenden VEGF-Konzentrationen einen Zusammenhang mit dem Auftreten einer Restenose nach erfolgreicher PTCA auf (Soeki et al, 2000). Die Daten dieser Arbeit können keinen Beweis für diese Hypothesen erbringen, somit entsprechen sie den Daten von Tamura et al (1999), die ebenfalls keinen Zusammenhang mit Infarktgröße oder herzspezifischen Enzymen sahen.

4.2. Antiinflammatorische Veränderungen

4.2.1. Adenosin A2A Rezeptor auf Endothelialen Zellen

Die Gabe von Adenosinen zeigte in experimentellen und klinischen Studien eine Reduzierung der Infarktgröße und eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion, wenn diese zum Zeitpunkt der wiedereinsetzenden koronaren Reperfusion appliziert wurden (Olafsson et al, 1987; Mahaffey et al, 1999; Marzilli et al, 2000). Adenosine werden aber auch intra- oder extrazellulär in ischämischen und entzündlichen Geweben freigesetzt. An der endogenen Adenosin-Freisetzung sind hauptsächlich Kardiomyozyten beteiligt (Bardenheuer et al, 1987). Ihr antiinflammatorischer Effekt ist an das Vorhandensein entsprechender Rezeptoren A1, A2A, A2B und A3 gebunden, die auf Neutrophilen, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelialen Zellen exprimiert werden.

Der Einsatz von selektiven A_{2A} Rezeptor-Agonisten zeigte einen Schutz vor dem Reperfusionsschaden am Myokard und reduziert zum anderen die postischämisch einsetzende Inflammation. Dieser antiinflammatorische Prozeß wird durch die Gs-Protein-gekoppelten A_{2A}-Rezeptoren auf Neutrophilen, Mastzellen, T-Zellen, Thrombozyten, Gefäßzellen und Endothelialen Zellen ermöglicht. Die weitere Kaskade setzt eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in Gang mit Aktivierung von Protein Kinase A. Die Folge ist die Inhibierung multipler Schritte inflammatorische Reaktionsmuster (Jordan et al, 1997; Visser et al, 2000; Ohta et al, 2001; Sullivan et al, 2001; Okusa et al, 2002). Es zeigte sich auch im Tiermodell, dass Adenosine-Agonisten eine verstärkte Vaskulogenese und Angiogenese in der Wundheilung zur Folge haben (Montesinos et al, 2004).

Auch Glover et al (2005) zeigten im Tiermodell, dass die Gabe von Adenosin-Agonisten in Kombination mit Phosphodiesterasehemmern eine deutliche Reduktion der Infarktgröße um 58% nach sich ziehen. Dieser Effekt hielt über die ersten 72 Stunden an.

Zhao et al (1993) berichteten über eine endogene myokardiale Adenosin-Freisetzung innerhalb der frühen Reperfusionphase und einen Rezeptor-gesteuerten, kardioprotektiven Mechanismus.

Die Daten dieser Arbeit belegen eine Hochregulierung des A_{2A}-Rezeptors nur in den endothelialen Zellen nach Plasmakubation, denn das leukozytäre Genexpressionsprofil erbrachte kein Nachweis einer veränderten Adenosine A_{2A}- Rezeptorregulierung. Dies weist darauf hin, dass an der antiinflammatorischen Komponente durch Bildung der Adenosin-Rezeptoren die endothelialen Zellen maßgeblich beteiligt sind und eine leukozytäre Beeinflussung zumindest nach den Ergebnissen dieser Arbeit keine bedeutende Rolle spielt.

Nach dem heutigen wissenschaftlichen Erkenntnisstand geht eine Aktivierung von A_{2A}-Rezeptoren mit einer verstärkten VEGF-Expression in Endothelialen Zellen, glatten Muskelzellen (Fischer et al, 1995; Takagi et al, 1996; Gu et al, 1999) und Makrophagen (Leibovich et al, 2002) einher. VEGF wird ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Initiierung von Angiogenese und Neovaskularisation zugeschrieben (Conway et al, 2001). Durch die verstärkte VEGF-Expression wird die lokale VEGF-Produktion gesteigert und es finden sich erhöhte VEGF-Serumkonzentrationen.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten einer erhöhten VEGF-Serumkonzentration bei Infarktpatienten stützen diese Annahme, allerdings fanden sich diesbezüglich keine veränderten Genexpressionsmuster - weder in Leukozyten noch in Endothelialen Zellen.

Ein antiinflammatorischer Effekt des Adenosin-Rezeptors zeigte sich im Zusammenhang mit den maximalen Leukozytenzahlen nach einem MI. Möglicherweise könnte eine verstärkte

Zunahme der Adenosin A2A Rezeptor-Konzentration eine verminderte systemische Inflammation nach sich ziehen.

Den von einigen Autoren beschriebenen protektiven, kardialen Effekt und die Wirkung auf die Infarktgröße ließ sich mit den Untersuchungsergebnissen dagegen nicht nachweisen. Dennoch scheint Adenosin A2A Rezeptor eine wichtige und regulatorische Wirkung im Rahmen eines Infarktgeschehens einzunehmen.

4.2.2. Zirkulierendes IL-10

IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin spielt eine wichtige Rolle als Inhibitor und Gegenspieler der entzündlichen Reaktionen im Infarkt und wird im Rahmen der Reperfusion in die Zirkulation freigesetzt. Erhöhte Plasmakonzentrationen konnten im Rahmen der kardialen Ischämie bereits nachgewiesen werden (Steppich et al, 2006).

Die Sekretion erfolgt durch aktivierte Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten (Mallat et al, 1999). Durch die Inhibierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NFκB wird die Zytokinproduktion gedrosselt und die entzündliche Reaktion unterdrückt (Wang et al, 1995).

IL-10 fungiert auch als Inhibitor der Matrix zerstörenden MMPs (Lacraz et al, 1995), beeinflusst die Gerinnung durch Unterdrückung der TF-Produktion (Lindmark et al, 1998) und fördert die Differenzierung der T-Zellen zugunsten der Th2-Subpopulation (Pinderski et al, 2002). Des weiteren vermag IL-10 die Freisetzung von IL-6, IL-1 und TNFalpha zu unterbinden.

Die im MI ablaufenden entzündlichen Vorgänge mit erhöhten proinflammatorischen Mediatoren haben eine Induktion der IL-10-Expression zur Folge. IL-6 kann die vermehrte IL-10-Expression durch aktivierte T-Zellen induzieren, und TNFalpha stimuliert die monozytäre IL-10-Synthese (Daftarian et al, 1996). Reperfusionsbedingt kommt es zu einer verstärkten IL10-mRNA-Expression im Infarktareal (Frangogiannis et al, 2000).

Bei MI-Patienten zeigten erhöhte IL-10 Plasmakonzentrationen einen Zusammenhang mit komplizierten Infarktverläufen entsprechend Killip Klasse III-IV (Shibata et al, 1997). In einigen Studien erwies sich IL-10 dennoch als kardioprotektiv und prediktiv hinsichtlich kardialer Ereignisse bei ACS-Patienten (Heeschen et al, 2003), und der inhibierende Einfluss auf eine mögliche Plaqueruptur steht im Zusammenhang mit einem besseren Langzeitergebnis (Heeschen et al, 2003).

Anhand der Daten in der vorliegenden Arbeit kann man davon ausgehen, dass IL-10 und die Konzentrationsabnahme innerhalb der ersten Tage keinen Einfluss auf die Restenoserate (nach 6 Monaten) oder die Infarktgröße hat. Es zeigte sich allerdings ein Zusammenhang mit systemischem CRP. Eine mögliche Erklärung wären die oben angeführten Hypothesen zu den reperfusionsbedingten, proinflammatorischen Vorgängen mit induzierter IL-10-Expression. Möglicherweise kommt es nach einer schnellen Anflutung proinflammatorischer Mediatoren im akuten Infarktgeschehen zu einer sekundären Gegenregulation mit einer rapiden und transienten IL-10-Freisetzung. Anhand der Daten ist davon auszugehen, dass die Konzentrationsänderung von IL-10 die systemische Inflammation günstig beeinflusst wie auch Wojakowski et al (2004) an einer klinischen Studie mit 50 Infarktpatienten nachgewiesen haben.

4.3. Klinische Relevanz und therapeutische Ansätze

Bei der Optimierung der therapeutischen Möglichkeiten von Infarktpatienten spielt der nun seit Jahren untersuchte Entzündungsprozess im MI als möglicher Therapieansatz eine bedeutende Rolle. Nach den heutigen wissenschaftlichen Erkenntnissen kommt es infarktbedingt, im Rahmen der Reperfusion zu einer vermehrten, lokalen Anflutung und Bildung proinflammatorischer Mediatoren. Diese lokale Reaktion führt eine anhaltende Inflammation nach sich. Doch nicht nur lokale Reaktionsmechanismen treten im akutem Infarktgeschehen auf, auch systemische Konzentrationsänderungen von Mediatoren wie IL-6, IL-8 oder RANTES zeigen einen Wirkungszusammenhang mit dem klinischen Verlauf der Infarktpatienten, beeinflussen vermeindlich die myokardiale Funktion und die Mortalitätsrate. So versuchte man in der Vergangenheit diese Effekte der inflammatorischen Stoffe durch Einsatz entsprechender monoklonaler Antikörper, wie z.B. gegen IL-8 oder VCAM-1 sowie der Selectine und des Mac-1 Rezeptors, positiv zu beeinflussen. Antiinflammatorische Behandlungsmethoden und der Einsatz gentherapeutischer Strategien zeigten bislang eine Reduzierung der inflammatorischen Reaktionen (Mullane et al, 1984) und eine Reduktion der Infarktgröße (Nigam et al, 2002).

Dennoch schlug der Versuch fehl, mit einer nicht spezifischen, antiinflammatorischen Therapie - wie z.B. mittels Glukokortikoiden (Roberts et al, 1976; Hammerman et al, 1983) - klinische Parameter wie die Infarktgröße und die kardiale Funktion nach einem MI verbessern zu können. Der Versuch einer Therapie unter Einsatz von Glukokortikoiden zeigte im

Tiermodell heterogene Ergebnisse, es konnte sogar eine Verschlechterung der kardialen Funktion nachgewiesen werden.

Die Daten der vorliegenden Arbeit ermöglichten es, weitere Gene und Proteine bzw. Zytokine zu identifizieren, die als potenzielle Ziele einer Therapie bei Infarktpatienten dienen könnten. Ein therapeutisches Zielprotein oder Zielgen könnte der RANTES-Precursor bzw. sein Hauptmediator RANTES sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Hypothese zu, dass es im Infarktfall zu einer anhaltenden Leukozytenaktivierung mit Hochregulierung des RANTES-Precursor und verstärkter Anreicherung von RANTES im Serum kommt. Diese Konzentrationsänderungen sind assoziiert mit der Infarktgröße, der kardialen Funktion und dem Myokardschaden. Daten von Cavioglu et al (2007) belegen eine mögliche protektive Wirkung von RANTES. Diese Arbeitsgruppe untersuchte Patienten mit einer koronaren Herzrkrankung und konnte bei denjenigen mit erniedrigten zirkulierenden RANTES-Konzentrationen eine erhöhte kardiale Mortalität feststellen bzw. ein erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt belegen. Somit besteht die Möglichkeit, dass RANTES neben der proinflammatorischen Wirkung eine zusätzliche protektive, kardiale Wirkung hat.

Das Ziel therapeutischer Maßnahmen auf Basis dieser hypothetischen Erkenntnisse wäre die Reduktion der systemischen Inflammation und der fortschreitenden Leukozytenaktivierung durch eine spezifische RANTES-Inhibierung.

Möglichkeiten RANTES in seiner Wirkung zu beeinflussen wären:

- (1) Einsatz von Transkriptionsfaktoren zur Inhibition auf Transkriptionsebene
- (2) Einsatz von Antagonisten der spezifischen RANTES-Rezeptoren CCR1 und CCR5
- (3) Blockade der RANTES-produzierenden Zellen.

RANTES-spezifische Behandlungsmethoden wurden bis dato bei Myokarditis am Mausmodell (Marino et al, 2004) angewandt. Der Einsatz eines CCR1- und CCR5-Antagonisten zeigte Erfolge in der Linderung der inflammatorischen Antwort. Für die antithrombozytäre Medikamente wie GP IIb/IIIa Inhibitoren Eptifibatide konnten RANTES-reduzierenden Wirkung bei Patienten nach PCI nachgewiesen werden (Welt et al, 2004). Weitere beschriebene Behandlungsmethoden betreffen die transkriptionale Aktivierung von RANTES durch NFkB (Thomas et al, 1998; Tabary et al, 2003). So können Statine und Acetylsalicylsäuren die NFkB-Aktivität reduzieren. Eine Inhibierung dieses

Transkriptionsfaktors könnte auch z.B. durch Sulfasalazine (Egan und Sandborn, 1998) oder Glukokortikoide (Auphan et al., 1995) erreicht werden.

Angesichts der in der Literatur beschriebenen und aus der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Zusammenhänge resultiert die Erkenntnis, dass in der modernen Kardiologie neben etablierten Behandlungsmethoden Raum bleiben sollte für neue therapeutische Möglichkeiten, die die systemische Leukozytenaktivierung beeinflussen.

4.4. Limitierung

Aufgrund der geringen Fallzahl der Probanden und der entsprechend grossen Anzahl an untersuchten Genexpressionen konnte das Problem des multiplen Testens nicht adäquat miteinbezogen werden, somit sind die signifikanten Resultate als hypothesengenerierend zu erachten. P-Werte sollten fälschlicherweise nicht als Entscheidungsinstrument in der ursprünglichen Form gewertet werden – vielmehr als statistisches Abstandsmass. Nach Saville (1990) bedeutet dies ein Kompromiss zwischen statistisch methodischer Notwendigkeit und klinisch bedeutsamer Entropie – er bezeichnet dies als praktikable Lösung des multiplen Testens. Allerdings bleibt die Verpflichtung auf die Problematik des multiplen Testens hinzuweisen und eben diese in die Interpretation der Daten miteinzubeziehen.

Eine mögliche Etablierung der hier gewonnenen Daten wäre durch Validierung der Ergebnisse in einem ähnlichen Patientenkollektiv möglich.

V. Zusammenfassung

Im Rahmen der kardialen Ischämie kommt es reperfusionsbedingt zu entzündlichen Reaktionen am Myokard und in der Folge auch zu einer vermehrten Anreicherung entzündlicher Mediatoren in der Peripherie bzw. im Serum der Patienten. Um diesen Reaktionsmechanismen näher auf den Grund zu gehen, widmete sich diese Arbeit Genexpressionsanalysen an kultivierten Endothelialen Zellen (HUVECs) und zirkulierenden Leukozyten sowie Messungen von Zytokinplasmakonzentrationen bei Infarktpatienten. Die Endothelzellen wurden mit Plasma der Infarktpatienten stimuliert, anschliessend eine RNA-Isolation vorgenommen - die Leukozyten unterliefen einer Vollblut-RNA-Isolation. Zur Beurteilung einer möglichen progredienten Inflammation wurden die Versuche zu 2 verschiedenen Zeitpunkten angesetzt: Direkt am Infarkttag und 5-10 Tage später.

Die Genexpressionsanalyse zirkulierender Leukozyten zeigte eine deutliche Hochregulierung proinflammatorischer Rezeptoren und Mediatoren wie IL-7R, RANTES, GATA 3, LAT und HGF, die auch die Differenzierung der Subpopulationen Th1/Th2 beeinflussen.

Das endotheliale Genexpressionsmuster erbrachte viele, bis dato nicht mit dem MI in Zusammenhang gebrachte Gene und deren Hochregulierung. 26 Transskripte wurden signifikant hoch- bzw. herunterreguliert. Neben Genklassifikationen, die das ZNS, Stoffwechsel und Proliferation betrafen, konnten verschiedene der Inflammation zugehörige Transskripte wie der Adenosine A2A-Rezeptor entdeckt werden. Eine expressionsgenetische Zunahme dieses Rezeptors bedeutet möglicherweise eine antiinflammatorische Komponente im Verlauf des MI.

Die Leukozyten zeigten kein verstärktes Expressionsmuster hinsichtlich des Adenosin-Rezeptors. Durch den Einfluss auf Entzündungsparameter wie Leukozytenzahlen, könnte der Adenosin A2A Rezeptor auch als Zielgen in der Regulierung postischämischer Inflammation angesehen werden. In der Literatur wird auch der Zusammenhang mit VEGF-Expressionen erläutert, dies konnte in der vorliegenden Versuchsreihe nicht bestätigt werden.

Passend zu der Hochregulierung leukozytenaktivierender Gene fand sich eine signifikante Zunahme der RANTES-Serumkonzentrationen bei den Infarktpatienten. Zusammenhänge mit der Myokardnekrose, der Infarktgröße und den herzspezifischen Enzymen konnten nachgewiesen werden. Anhand dieser Daten wäre eine kardiale Genese durchaus denkbar und

der Einfluss auf die kardialen Parameter im Rahmen eines Infarktgeschehens macht einen neuen therapeutischen Ansatz möglich.

Weiterhin wurden Plasmakonzentrationsmessungen von IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , VEGF, IL-12 vorgenommen. Dabei wurden für IL-6 und VEGF signifikante Konzentrationsänderungen innerhalb der ersten Tage festgestellt. IL-6 nahm innerhalb der ersten Tage nach einem MI deutlich ab, die Konzentrationsänderungen korrelierten invers mit Entzündungsparametern Fibrinogen und CRP. Möglicherweise erklärt sich dieser Zusammenhang mit (1) einer möglichen kardialen Genese und schnellen, infarktbedingten Freisetzung des Mediators und (2) in der Folge einer Aktivierung der Akute-Phase-Proteine Fibrinogen und CRP. VEGF zeigte eine deutliche Konzentrationszunahme innerhalb der ersten Tage nach einem MI.

Neben den signifikanten Konzentrationsänderungen stellte diese Arbeit bei IL-8 im Rahmen des MI lediglich eine geringe Abnahme innerhalb der ersten Tage fest. Allerdings zeigten sich Zusammenhänge mit kardialen Parametern (myokardszintigraphisch festgelegte Infarktgröße bei Aufnahme und maximaler Troponin-T-Wert). Diese Daten belegen auch eine Einflussnahme auf die Größe des Myokardschadens und die initiale Myokardnekrose.

Für IL-10 ergaben sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Konzentrationsänderungen, auch wenn sich eine inverse Korrelation mit systemischen Entzündungsparametern zeigte. Eine Hypothese ist die schnelle, inflammationsbedingte Anflutung von proinflammatorischen Mediatoren mit der Folge der CRP-Konzentrationserhöhung und geringem Abfall von IL-10.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und der Serumkonzentrationsänderungen von Mediatoren eine anhaltende Leukozytenaktivierung bestätigen, die in der Folge einen bedeutenden Einfluss auf kardiale Parameter und auf fortwährende inflammatorische Vorgänge haben. Aus dieser Erkenntnis resultieren möglicherweise neue therapeutische Wege zur Unterdrückung der entzündlichen, infarktbedingten Reaktionen.

6. Literaturverzeichnis

Abe, Y., Kawakami, M., Kuroki, M., Yamamoto, T., Fujii, M., Kobayashi, H., Yaginuma, T., Kahii, A., Saito, M., Matsushima, K. Transient rise in serum interleukin-8 concentrations during acute myocardial infarction. *Br Heart J.* 70 (1993) 132-134.

Akashi, K., Kondo, M., Weissman, I.L. Role of interleukin-7 in T-cell development from hematopoietic stem cells. *Immunol Rev.* 165 (1998) 13-28.

Appay, V., Brown, A., Cribbes, S., Randle, E., Czaplewski, L.G. Aggregation of RANTES is responsible for its inflammatory properties. *J Biol Chem* 274 (1999) 27505-27512.

Appay, V., Dunbar, P.R., Cerundolo, V., McMichael, A., Czaplewski, L., Rowland-Jones, S. RANTES activates antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in a mitogen-like manner through cell surface aggregation. *Int Immunol.* 12 (2000)1173-1182.

Appay, V., Rowland-Jones, S.L. RANTES: A versatile and controversial chemokine. *Trends in Immunology* 22 (2001) 83-87.

Armitage, R.J., Ziegler, S.F., Beckmann, M.P., Idzerda, R.L., Park, L.S., Fanslow, W.C. Expression of receptors for interleukin 4 and interleukin 7 on human T cells. *Adv Exp Med Biol.* 292 (1991) 121-130.

Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A., Karin, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270 (1995) 286-90.

Bacon, K.B., Szabo, M.C., Yssel, H., Bolen, J.B., Schall, T.J. RANTES induces tyrosine kinase activity of stably complexed p125FKAK and ZAP-70 in human T-cells. *J Exp Med.* 184 (1996) 873-882.

Bardenheuer, H., Whelton, B., Sparks, H.V. Adenosine release by the isolated guinea pig heart in response to isoproterenol, acetylcholine, and acidosis: the minimal role of vascular endothelium. *Circ Res* 61 (1987) 594-600.

Benjamini, Y. and Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B* 57 (1995) 289–300.

Berse, B., Brown, L.F., Water, L.V.D., Dvorak, H.F., Senger, D.R. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 3 (1992) 211-20.

Bhatt, D.L., Topol, E.J. Need to test the arterial inflammation hypothesis. *Circulation* 106 (2002) 136-140.

Bhiladvala, P., Strandberg, K., Stenflo, J., Holm, J. Early identification of acute myocardial infarction by activated protein C- protein C inhibitor complex. *Thromb Res* 118 (2006) 213-219.

Biasucci, L.M., Vitelli, A., Liuzzo, G. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 94 (1996) 874-877.

Blum, A., Sclarovsky, S., Rehaviah, E., Shohat, B. Levels of T-lymphocyte subpopulations, interleukin-1beta, and soluble interleukin-2 receptor in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 127 (1994) 1226-30.

Blum, A., Sclarovsky, S., Shohat, B. T lymphocyte activation in stable angina pectoris and after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation* 91 (1995) 20-22.

Borger, P., Kauffman, H.F., Postma, D.S., Vellenga, E. IL-7 differentially modulates the expression of IFN-gamma and IL-4 in activated human T lymphocytes by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Immunol.* 156 (1996) 1333-1338.

Buffon, A., Biasucci, L., Liuzzo, G., Onofrio, G., Crea, F., Maseri, A. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med* 347 (2002) 5-12.

Bussolino, F., Di Renzo, M.F., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffer, A., Comoglio, P.M. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 119 (1992) 629-641.

Buratti, T., Ricevuti, G., Pechlaner, C., Joannidis, M., Wiedermann, F.J., Gritti, D., Herold, M., Wiedermann, C.J. Plasma levels of procalcitonin and interleukin-6 in acute myocardial infarction. *Inflammation* 25 (2001) 97-100.

Burke, A.P., Tracy, R.P., Kolodgie, F., Malcolm, G.T., Zieske, A., Kutys, R., Pestaner, J., Smialek, J., Virmani, R. Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death. *Circulation* 105 (2002) 2019-2023.

Carroll, V.A., Griffiths, M.R., Geiger, M., Merlo, C., Furlan, M., Lämmle, B., Binder, B.R. Plasma protein C inhibitor is elevated in survivors of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (1997) 114-118.

Cavioglu, E., Eng, C., Chopra, V., Clark, L.T., Pinsky, D.J., Marmur, J.D. Low plasma RANTES levels are an independent predictor of cardiac mortality in patients referred for coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (2007) 929-935.

Celis, J.E. Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett.* 480 (2000) 2-16.

Chuang, S.S., Kumaresan, P.R., Mathew, P.A. 2B4 (CD244)-mediated activation of cytotoxicity and IFN-gamma release in human NK cells involves distinct pathways. *J Immunol.* 167 (2001) 6210-6216.

Cipollone, F., Marini, M., Fazio, M., Pini, B., Iezzi, A., Reale, M., Paloscia, L., Materazzo, G., D'Annunzio, E., Conti, P., Chiarelli, F., Cuccurullo, F., Mezzetti, A. Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21 (2000) 327-334.

- Conway, E.M., Collen, D., Carmeliet, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49 (2001) 507-521.
- Corti, M.C., Sative, M.E., Guralmik, J.M. Serum albumin and physical function as predictors of coronary heart disease mortality and incidence in older persons. *J Clin Epidemiol* 49 (1996) 519-526.
- Cusack, M., Marber, M., Lambiase, P., Bucknall, C., Redwood, S. Systemic inflammation in unstable angina is the result of myocardial necrosis. *J Am Col Cardiol* 39 (2002) 1917-1923.
- Daftarian, P.M., Kumar, A., Kryworuchko, M., Diaz-Mitoma, F. IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 157 (1996) 12-20.
- Damas, J.K., Waehre, T., Yndestad, A., Otterdal, K., Hognestad, A., Solum, NO., Gullestad, L., Froland, S.S., Aukrust, P. Interleukin-7 – Mediated inflammation in unstable angina. Possible role of chemokines and platelets. *Circulation*. 107 (2003) 2670-2676.
- De Winter, R.J., Manten, A., de Jong, Y.P., Adams, R., van Deventer, S.J.H., Lie, K.I. Interleukin 8 released after acute myocardial infarction is mainly bound to erythrocytes. *Heart* 78 (1997) 598-602.
- Dominguez-Rodriguez, A., Abreu-Gonzalez, P., Garcia-Gonzalez, M., Ferrer, J. Prognostic value of interleukin-8 as a predictor of heart failure in patients with myocardial infarction and percutaneous intervention. *Int J Cardiol* 111 (2005) 158-160.
- Egan, L.J., Sandborn, W.J. Inhibition of nuclear factor kappaB by sulfasalazine: a new target for inflammatory bowel disease therapy? *Gastroenterology* 115 (1998) 1295-1296.
- Falk, E. Why do plaques rupture? *Circulation* 86 (1992) III30-42.
- Feng, Y., Yang, J., Huang, H., Kennedy, S., Turi, T., Thompson, J., Libby, P., Lee, R. Transcriptional profile of mechanically induced genes in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 85 (1999) 1118- 1123.
- Fischer, S., Sharma, H.S., Karliczek, G.F., Schaper, W. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in pig cerebral microvascular endothelial cells and its upregulation by adenosine. *Mol Brain Res* 28 (1995) 141-148.
- Frangogiannis, N.G., Mendoza, L.H., Lindsey, M.L., Ballantyne, C.M., Michael, L.H., Smith, C.W., Entman, M.L. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *The Journal of Immunology* 165 (2000) 2798-2808.
- Friedman, G.D., Klatsky, A.L., Siegelau, A.B. The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction. *N Engl J Med* 290 (1974) 1275-1278.
- Fry, T.J., Mackall, C.L. Interleukin 7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol.* 22 (2001) 564-571.

Funayama, H., Ishikawa, S., Kubo, N., Katayama, T., Yasu, T., Saito, M., Kawakami, M. Increases in Interleukin-6 and Matrix Metalloproteinase-9 in the infarct-related coronary artery of acute myocardial infarction. *Circ J* 68 (2004) 451-454.

Furman, M.I., Becker, R.C., Yarzebski, J., Savegeau, J., Gore, J.M., Goldberg, R.J. Effect of elevated leukocyte count on in-hospital mortality following acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology* 78 (1996) 945-948.

Futamatsu, H., Suzuki, J., Mizuno, S., Koga, N., Adachi, S., Kosuge, H., Maejima, Y., Hirao, K., Nakamura, T., Isobe, M. Hepatocyte growth factor ameliorate the progression of experimental autoimmune myocarditis: a potential role for induction of T helper 2 cytokines. *Circ Res.* 96 (2005) 823-30.

Gabriel, A.S., Martinsson, A., Wretling, B., Ahnve, S. IL-6 levels in acute and post myocardial infarction: their relation to CRP levels, infarction size, left ventricular systolic function, and heart failure. *Eur J Intern Med.* 15 (2004) 523-528.

Glover, D.M., Riou, L.M., Ruiz, M., Sullivan, G.W., Linden, J., Rieger, J.M., Macdonald, T.L., Watson, D.D., Beller G.A. Reduction of infarct size and postischemic inflammation from ATL-146e, a highly selective adenosine A2A receptor agonist, in reperfused canine myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288 (2005) H1851-H1858.

Gringhuis, S.I., de Leij, L.F., Verschuren, E.W., Borger, P., Vellenga, E. Interleukin 7 upregulates the interleukin-2-gene expression in activated human T lymphocytes at the transcriptional level by enhancing the DNA binding activities of both nuclear factor of activated T cells and activator protein-1. *Blood.* 90 (1997) 2690-2700.

Griselli, M., Herbert, J., Hutchinson, W.L., Taylor, K.M., Sohail, M., Krausz, T., Pepy, M.B. C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med.* 190 (1999) 1733-40.

Gu, J.W., Brady, A.L., Anand, V., Moore, M.C., Kelly, W.C., Adair, T.H. Adenosine upregulates VEGF expression in cultured myocardial vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 277 (1999) H595-602.

Gwechenberger, M., Mendoza, L.H., Youker, K.A., Frangogiannis, N.G., Smith, C.W., Michael, L.H., Entman, M.L. *Circulation* 99 (1999) 546-551.

Hammerman, H., Kloner, R.A., Hale, S., Shoen, F.J., Braunwald, E. Dose-dependent effects of short-term methylprednisolone on myocardial infarct extent, scar formation, and ventricular function. *Circulation* 68 (1983) 446-452.

Heeschen, C., Dimmeler, S., Hamm, C.W., Fichtlscherer, S., Boersma, E., Simoons, M.L., Zeiher, A.M. Serum level of the anti-inflammatory cytokine Interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 107 (2003) 2109-2114.

Herity, N.A. Interleukin 6: a message from the heart. *Heart* 84 (2000) 9-10.

Hillis, G.S., Taggart, P., Hillis, L., Zhao, N., Dalsey, W.C., Mangione, A. Biochemical and clinical predictors of long-term outcome in patients with nonspecific chest pain and nondiagnostic electrocardiograms. *Am Heart J* 145 (2003) 88-94.

Hojo, Y., Ikeda, U., Zhu, Y., Okada, M., Ueno, S., Arakawa, H., Fujikawa, H., Katsuki, T.-A., Shimada, K. Expression of vascular endothelial growth factor in patients with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 35 (2000) 968-73.

Hokimoto, S., Ogawa, H., Saito, T., Oshima, S., Noda, K., Soejima, H., Takazoe, K., Date, H., Ishibashi, F., Nakamura, S., Yasue, H. Increased plasma antigen levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Jpn Circ J* 64 (2000) 831-834.

Holme, P.A., Muller, F., Solum, N.O., Brosstad, F., Froland, S.S., Aukrust, P. Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in HIV-1 infection. *FASEB J* 12 (1998) 79-89.

Ikeda, U., Ohkawa, F., Seino, Y., Yamamoto, K., Hidaka, Y., Kasahara, T., Kawai, T., Shimada, K. Serum interleukin 6 levels become elevated in acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 24 (1992) 579-584.

Ishibashi, T., Kijima, M., Yokoyama, K., Shindo, J., Nagata, K., Hirotsuka, A., Techigawara, M., Abe, Y., Sato, E., Yamaguchi, N., Watanabe, N., Saito, T., Maehara, K., Ohmoto, Y., Maruyama, Y. Expression of cytokine and adhesion molecule mRNA in atherectomy specimens from patients with coronary artery disease. *Jpn Circ J* 63 (1999) 249-254.

JESC/ACC Committee. Myocardial infarction redefined – a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *European Heart Journal* 21 (2000) 1502-1513.

Jin, H., Yang, R., Awad, T.A., Wang, F., Li, W., Williams, S.P., Ogasawara, A., Shimada, B., Williams, M., de Feo, G., Paoni, N.F. Effects of early angiotensin-converting enzyme inhibition on cardiac gene expression after acute myocardial infarction. *Circulation* 103 (2001) 738-742.

Jordan, J.E., Zhao, Z.Q., Sato, H., Taft, S., Vinten-Johanson, J. Adenosine A2-Receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophils accumulation, superoxide generation, and coronary endothelial adherence. *J Pharmacol Exp Ther* 280 (1997) 301-309.

Kameyoshi, Y., Dorschner, A., Mallet, A.I., Christophers, E., Schroder, J.M. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 176 (1992) 587-592.

Kaski, J.C. Local cytokine production and acute coronary events. *Int J Cardiol* 73 (2000) 79-81.

Katayama, T., Nakamina, T., Takagi, C., Honda, Y., Suzuki, S., Iwasaki, Y., Yano, K. Prognostic value of serum amyloid A protein in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 10 (2005) 1186-1191.

Kato, K., Matsubara, T., Iida, K. Elevated levels of pro-inflammatory cytokines in coronary artery thrombi. *Int J Cardiol* 70 (1999) 267-273.

Kawamoto, A., Kawata, H., Akai, Y., Katsuyama, Y., Takase, E., Sasaki, Y., Tsujimura, S., Sakaguchi, Y., Iwano, M., Fujimoto, S., Hashimoto, T., Doni, K. Serum levels of VEGF and basic FGF in the subacute phase of myocardial infarction. *Int J Cardiol* 67 (1998) 47-54.

Kereiakes, D.J. The emperor's clothes. In search of the vulnerable plaque. *Circulation* 107 (2003) 2076-2077.

Kilshaw, P.J., Higgins, J.M. Alpha E: no more rejection? *J Exp Med.* 196 (2002) 877-886.

Kohtani, T., Abe, Y., Sato, M., Miyauchi, K., Kawachi, K. Protective effects of anti-neutrophil antibody against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur Surg Res.* 34(4) (2002) 313-320.

Kukielka, G.L., Smith, C.W., LaRosa, G.J., Manning, A.M., Mendoza, L.H., Daly, T.J., Hughes, B.J., Youker, K.A., Hawkins, H.K., Michael, L.H., Rot, A., Entman, M.L. Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest* 95 (1995) 89-103.

Kukielka, G.L., Smith, C.W., LaRosa, G.J., Manning, A.M., Youker, K.A., Michael, L.H., Entman, M.L. Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. *Circulation* 92 (1995) 1866-1875.

Lacraz, S., Nicod, L.P., Chicheportiche, R. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 96 (1995) 2304-2310.

Lee, H.J., O'Garra, A., Arai, K., Arai, N. Characterization of cis-regulatory elements and nuclear factors conferring Th2-specific expression of the interleukin-5 gene: a role for a GATA-binding protein. *J Immunol* 160 (1998) 2343-2352.

Leibovich, S.J., Chen, J.F., Pinhal-Enfield, G., Belem, P.C., Elson, G., Rosania, A., Ramanathan, M., Montesinos, C., Jacobson, M., Schwarzschild, M.A., Fink, J.S., Cronstein, B. Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine A(2A) receptor agonists and endotoxin. *Am J Pathol* 160 (2002) 2231-2244.

Lewandowski, E.D., White, L.T. Pyruvate dehydrogenase influences postischemic heart function. *Circulation* 91 (1995) 2071-2079.

Li, J., Brown, L.F., Hibberd, M.G., Grossman, J.D., Morgan, J.P., Simons, M. VEGF, flk-1, andflt-1 expression in rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol.* 270 (1996) H1803-1811.

Li, L., Masucci, M.G., Levitsky, V. Effect of interleukin 7 on the in vitro development and maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Scand J Immunol.* 51 (2000) 361-371.

Libby, P., Sukhova, G., Kee, R.T., Galis, Z.S. Cytokines regulate vascular functions regulated to stability of the atherosclerotic plaque. *J Cardiovasc Pharmacol.* 25 (1995) Suppl 2: S9-S12.

- Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420 (2002) 868-874.
- Libby, P., Ridker, P.M., Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105 (2002) 1135-1143.
- Lindmark, E., Tenno, T., Chen, J. Interleukin-10 inhibits LPS-induced human monocyte tissue factor expression in whole blood. *Br J Haematol* 102 (1998) 597-604.
- Liuzzo, G., Biasucci, L.M., Gallimore, J.R., Grillo, R.L., Rebuffi, A.G., Pepys, M.B. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 331 (1994) 417-424.
- Liuzzo, G., Goronzy, J.J., Yang, H., Kopecky, S.L., Holmes, D.R., Frye, R.L., Weyand, C.M. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation* 101 (2000) 2883-2888.
- Lowe, G.D.O., Machado, S.G., Krol, W.F., Barton, B.A., Forbes, C.D. White blood cell count and haematocrit as predictors of coronary recurrence after myocardial infarction. *Thromb Haemost* 54 (1985) 700-703.
- Luc, G., Bard, J.M., Juhan-Vague, I., Ferrieres, J., Evans, A., Amouyel, P., Arveiler, D., Fruchart, J.C., Ducimetiere, P. C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen as predictors of coronary heart disease. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 23 (2003) 1255-1261.
- Luo, Y., Jiang, D., Wen, D., Yang, J., Li, L. Changes in serum interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein levels in patients with acute coronary syndrome and their responses to simvastatin. *Heart Vessels* 19 (2004) 257-262.
- Lyn, D., Liu, X., Bennet, N.A., Emmet, N.L. Gene expression profile in mouse myocardium after ischemia. *Physiol Genomics* 2 (2000) 93-100.
- Mahaffey, K.W., Puma, J.A., Barbagekata, N.A., DiCarli, M.F., Leeser, M.A., Browne, K.F., Eisenberg, P.R., Bolli, R., Casas, A.C., Molina-Viamonte, V., Orlandi, C., Blevins, R., Gibbons, R.J., Califf, R.M., Granger, C.B. Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for myocardial infarction. Results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) trial. *J Am Coll Cardiol* 34 (1999) 1711-1720.
- Mallat, Z., Besnard, S., Duriez, M. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circulation Res* 85 (1999) e17-e24.
- Manten, A., de Winter, R.J., Minnema, M.C., ten Cate, H., Lijmer, J.G., Adams, R., Peters, R.J., van Deventer, S.J. Procoagulant and proinflammatory activity in acute coronary syndromes. *Cardiovasc Res* 40 (1998) 389-395.
- Mantovani, A., Bussolino, F., Dejana, E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J* 6 (1992) 2591-2599.
- Marciniak, A., Gierblinski, I., Stefanski, R., Lapinski, M., Gaciong, Z., Bartlomieczyk, I., Zegarska, J. Predictive value of plasma interleukin 1, interleukin 6, interleukin 8 and C-

reactive protein (CRP) in patients with myocardial infarction. *Pol Arch Med Wewn.* 109 (2003) 15-22.

Marino, A.P., da Silva, A., dos Santos, P.V., Pinto, L.M., Gazzinelli, R.T., Teixeira, M.M., Lannes-Vieira, J. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation.* 110 (2004) 1443-1449.

Marx, N., Neumann, F.J., Ott, I., Gawaz, M., Koch, W., Pinkau, T., Schoemig, A. Induction of cytokine expression in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 30 (1997) 165-170.

Marzilli, M., Orsini, E., Marraccini, P., Testa, R. Beneficial effects of intracoronary adenosine as an adjunct to primary angioplasty in acute myocardial infarction. *Circulation* 101 (2000) 2154-2159.

Maury, C.P.J., Teppo, A-M. Circulating tumor necrosis factor alpha (cachectin) in myocardial infarction. *J Int Med* 225 (1989) 333-336.

Mazzone, A., De Servi, S., Vezzoli, M., Fossati, G., Mazzucchelli, I., Gritti, D., Ottini, E., Mussini, A., Specchia, G. Plasma levels of interleukin 2,6,10 and phenotypic characterization of circulating T lymphocytes in ischemic heart disease. *Atherosclerosis* 145 (1999) 369-374.

Mehrotra, P.T., Grant, A.J., Siegel, J.P. Synergistic effects of IL-7 and IL-12 on human T cell activation. *J Immunol.* 154 (1995) 5093-5102.

Meurer, R., van Riper, G., Feeney, W., Cunningham, P., Hora D. Jr., Springer, M.S., MacIntyre, D.E., Rosen, H. Formation of eosinophilic and monocytic intradermal inflammatory sites in the dog by injection of human RANTES but not human monocyte chemoattractant protein 1, human macrophage inflammatory protein 1 alpha, or human interleukin 8. *J Exp Med.* 178 (1993) 1913-1921.

Mizia-Sstec, K., Gasior, Z., Zahorska-Markiewicz, B., Janowska, J., Szulc, A., Jastrzebska-Maj, E., Kobielski-Gembala, I. Serum tumor necrosis factor alpha. Interleukin-2 and interleukin-10 activation in stable angina and acute coronary syndromes. *Coron Artery Dis.* 14 (2003) 431-438.

Möhle, R., Green, D., Moore, M.A.S., Nachman, R.L., Rafi, S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 663-668.

Montesinos, M.C., Shaw, J.P., Yee, H., Shamamian, P., Cronstein, B. Adenosine A2A Receptor Activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis. *American Journal of Pathology.* 6 (2004) 1887-1892.

Mullane, K.M., Read, N., Salmon, J.A., Moncada, S. Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 228 (1984) 510-522.

Namiki, A., Brogi, E., Kearney, M., Kim, E.A., Wu, T., Couffinhal, T., Varticovski, L., Isner, J.M. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 270 (1995) 31189-31195.

- Neumann, F.J., Ott, I., Gawaz, M., Richardt, G., Holzapfel, H., Jochum, M., Schoemig, A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation* 92 (1995) 748-755.
- Neumann, F.J., 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 thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 95 (1997) 2387-2394.
- Nigam, A., Kopecky, S.L. Therapeutic potential of monoclonal antibodies in myocardial reperfusion injury. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2 (2002) 367-376.
- Nomura, S., Uehata, S., Saito, S., Osumi, K., Ozeki, Y., Kimura, Y. Enzyme immunoassay detection of platelet-derived microparticles and RANTES in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost.* 89 (2003) 506-512.
- Ohta, A., Sitkovsky, M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 414 (2001) 916-920.
- Okusa, M.D. A2A adenosine receptor: a novel therapeutic target in renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 282 (2002) F10-F18.
- Olafsson, B., Forman, M.B., Puett, D.W., Pou, A., Cates, C.U., Friesinger, G.C., Virmani, R. Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation* 76 (1987) 1135-1145.
- Oliver, J.C., Bland, L.A., Oettinger, C.W. Cytokine kinetics in an in vitro whole blood model following an endotoxin challenge. *Lymphokine Cytokine Res.* 12 (1993) 115-120.
- Ono, K., Matsumori, A., Shios, T., Furukawa, U., Sasayama, S. Enhanced expression of hepatocyte growth factor/c-Met by myocardial ischemia and reperfusion in a rat model. *Circulation* 95 (1997) 2552-2558.
- Ott, I., Neumann, F.J., Kenngott, S., Gawaz, M., Schömig, A. Procoagulant inflammatory responses of monocytes after direct balloon angioplasty in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 82 (1998) 938-942.
- Pannitteri, G., Marino, B., Campo, P.P., Martucci, R., Testa, U., Peschle, C. Interleukins 6 and 8 as mediators of acute phase response in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 80 (1997) 622-625.
- Parissis, J.T., Adamopoulos, S., Venetsanou, K.F., Mentziko, D.G., Karas, S.M., Kremastinos, D.T. Serum profiles of C-C chemokines in acute myocardial infarction: possible implication in postinfarction left ventricular remodelling. *J Interferon Cytokine Res.* 22 (2002) 223-229.
- Pasqui, A.L., Di Renzo, M., Bova, G., Puccetti, L., Bruni, F., Saletti, M., Pastorelli, M., Verzuri, M.S., Auteri, A. Lymphocyte apoptosis in non-ST segment elevation acute myocardial infarction. *Ann Ital Med Int.* 18 (2003) 154-161.

- Pasqui, A.L., Di Renzo, M., Bova, G., Bruni, F., Puccetti, L., Pompella, G., Auteri, A. T cell activation and enhanced apoptosis in non-ST elevation myocardial infarction. *Clin Exp Med.* 3 (2003) 37-44.
- Passoni, F., Morelli, B., Seveso, G., Lazzati, L., Beria, G., Del Rosso, G., D'Urbano, M., Cafiero, F., Mariani, G., De Servi, S. Comparative short-term prognostic value of hemostatic and inflammatory markers in patients with non-ST elevation acute coronary syndromes. *Ital Heart J.* 3 (2002) 28-33.
- Pendurthi, U., Allen, K., Ezban, M., Rao, L. Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signalling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. *J Biol Chem* 275 (2000) 14632-14641.
- Pinderski, L.J., Fischbein, M.P., Subbanagounder, G. Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes. *Circ Res* 90 (2002) 1064-1071.
- Qi, X., Li, S., Li, J. The prognostic value of IL-8 for cardiac events and restenosis in patients with coronary heart diseases after percutaneous coronary intervention. *Jpn Heart J.* 44 (2003) 623-632.
- Quinn, M.J., Bhatt, D.L., Zidar, F., Vivekananthan, D., Chew, D.P., Ellis, S.G., Plow, E., Topol, E.J. Effect of clopidogrel pretreatment on inflammatory marker expression in patients undergoing percutaneous coronars intervention. *Am J Cardiol* 93 (2004) 679-684.
- Quyyumi, A.A. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med* 105 (1998) 32S-39S.
- Ridker, P.M., Hennekens, C.H., Roitman-Johnson, B., Stamofor, M.J., Allen, J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risk of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 351 (1998) 88-92.
- Ridker, P.M., Hennekens, C.H., Buring, J.E., Rifai, N.D. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 342 (2000) 836-843.
- Roberts, R., de Mello, V., Sobel, B.E. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation* 53 (1976) I204-I206.
- Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362 (1993) 801-809.
- Ross, R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340 (1999) 115-126.
- Sasaki, T., Takai, Y. The rho small G protein family-rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochemical and biophysical research communications* 245 (1998) 641-645.
- Saville. Multiple Comparison Procedures: The Practical Solution. *The American Statistician*, 44 (1990) 174-180.

- Schall, T.J. Biology of RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine*. 3 (1991) 165-183.
- Schena, M. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 270 (1995) 467-470.
- Schömig, K., Busch, G., Steppich, B., Sepp, D., Kaufmann, J., Stein, A., Schömig, A., Ott, I. Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 9 (2006) 1032-1037.
- Sehl, P.D., Tai, J.T.N., Hillan, K.J., Brown, L.A., Goddard, A., Yang, R., Jin, H., Lowe, G.D. Application of cDNA microarrays in determining molecular phenotype in cardiac growth, development, and response to injury. *Circulation* 101 (2000) 1990-1999.
- Seino, Y., Ikeda, I., Ikeda, M., Yamamoto, K., Misawa, Y., Hasegawa, T., Kano, S., Shimada, K. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine* 6 (1994) 87-91.
- Seko, Y., Imai, Y., Kamijukkoku, S., Hayasaki, K., Sakomura, Y., Tobe, K., Kadowaki, T., Maekawa, H., Takahashi, N., Yazaki, Y. Serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction undergoing reperfusion therapy. *Clin Sci* 92 (1997) 453-454.
- Shibata, M., Endo, S., Inada, K., Kuriki, S., Harada, M., Takino, T., Sato, N., Arakawa, N., Suzuki, T., Aoki, H., Suzuki, T., Hiramori, K. Elevated plasma levels of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10 in patients with acute myocardial infarction. *J Interferon Cytokine Res* 17 (1997) 145-150.
- Shiffman, D., Porter, J.G. Gene expression profiling of cardiovascular disease models. *Curr Opin Biotechnol*. 11 (2000) 598-601.
- Shinkets, R., Lowe, D., Thai, J., Sehl, P., Jin, H., Yang, R., Predki, P., Rothberg, B., Murtha, M., Roth, M. Gene expression analysis by transcript profiling coupled to gene database query. *Nat Biotechnol* 17 (1999) 798-803.
- Soeki, T., Tamura, Y., Shinohara, H., Tanaka, H., Bando, K., Fukuda, N. Serial changes in serum VEGF and HGF in patients with acute myocardial infarction. *Cardiology* 93 (2000) 168-174.
- Stanton, L.W., Garrard, L.J., Damm, D., Garrick, B.L., Lam, A., Kapoun, A.M., Zheng, Q., Protter, A.A., Schreiner, G.F. White RT. Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction. *Circulation Research* 86 (2000) 939-945.
- Steinberg, D. Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation* 76 (1987) 508-512.
- Steppich, B., Moog, P., Matissek, C., Wisniowski, N., Kühle, J., Joghetaei, N., Neumann, F.J., Schömig, A., Ott, I. Cytokine profiles and T cell function in acute coronary syndromes. *Atherosclerosis* 190 (2007) 443-451.

- Sudo, T., Nishikawa, S., Ohno, N., Akiyama, N., Tamakoshi, M., Yoshida, H. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90 (1993) 9125-9129.
- Sullivan, G.W., Rieger, J.M., Scheld, W.M., MacDonald, T.L., Linden, J. Cyclic AMP-dependent inhibition of human neutrophil oxidative activity by substituted 2-propynylcyclohexal adenosine A2A receptor agonists. *Br J Pharmacol* 132 (2001)1017-1026.
- Tabary, O., Muselet, C., Escotte, S., Antonicelli, F., Hubert, D., Dusser, D., Jaquot, J. Interleukin-10 inhibits elevated chemokine interleukin-8 and regulated on activation normal T cell expressed and secreted production in cystic fibrosis bronchial epithelial cells by targeting the I(k)B kinase alpha/beta complex. *Am J Pathol*. 162 (2003) 293-302.
- Taichman, N.S., Young, S., Cruchley, A.T., Tayler, P., Paleolog, E. Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J Leukoc Biol* 62 (1997) 397-400.
- Takagi, H., King, G.L., Ferrara, N., Aiello, L.P. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk gene expression through adenosine A2 receptors in retinal capillary endothelial cells. *Invest Opth Vis Sci* 37 (1996) 1311-1321.
- Takagi, H., King, G.L., Robinson, G.S., Ferrara, N., Aiello, L.P. Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells. *Invest Opth Vis Sci* 37 (1996) 2165-2176.
- Tamura, K., Nakajima, H., Rakue, H., Sasame, A., Naito, Y., Nagai, Y., Ibukiyama, C. Elevated circulating levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction. *Jpn Circ J* 63 (1999) 357-361.
- Tamura, S., Sugawara, T., Tokoro, Y., Taniguchi, H., Fukao, K., Nakauchi, H., Takahama, Y. Expression and function of c-Met, a receptor for hepatocyte growth factor, during T-cell development. *Scand J Immunol*. 47 (1998) 296-301.
- Thomas, L.H., Friedland, J.S., Sharland, M., Becker, S. Respiratory syncytial virus-induced RANTES production from human bronchial epithelial cells is dependent on nuclear factor-kappa B nuclear binding and is inhibited by adenovirus-mediated expression of inhibitor of kappa B alpha. *J Immunol*. 161 (1998) 1007-1016.
- Visser, S.S., Theron, A.J., Ramafi, G., Ker, J.A., Anderson, R. Apparent involvement of the A2A subtype adenosine receptor in the antiinflammatory interactions of CGS-21680, cyclopentyladenosine, and IB-MECA with human neutrophils. *Biochem Pharmacol* 60 (2000) 993-999.
- Wang, A., Nomura, M., Patan, S., Ware, A. Inhibition of protein kinase C α prevents endothelial cell migration and vascular tube formation in vitro and myocardial neovascularization in vivo. *Circ Res* 90 (2002) 609-616.
- Wang, P., Wu, P., Siegel, M.I. Interleukin-10 inhibits nuclear factor kappa B activation in human monocytes: IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem*. 270 (1995) 9558-9563.
- Ward, S.G., Bacon, K., Westwick, J. Chemokines and T lymphocytes: More than an attraction. *Immunity* 9 (1998) 1-11.

Ward, S.G., Westwick, J. Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *Biochem. J.* 333 (1998) 457-470.

Welt, F.G.P., Rogers, S.D., Zhang, X., Ehlers, R., Chen, Z., Nannizzi-Alaimo, L., Phillips, D.R., Simon, D.I. GP IIb/IIIa Inhibition with Eptifibatide lowers level of soluble CD40L and RANTES after percutaneous coronary intervention. *Catheter Cardiovasc Interv* 61 (2004) 185-189.

Weyrich, A.S., Elstad, M.R., McEver, R.P., McIntyre, T.M., Moore, K.L., Morrissey, J.H., Prescott, S.M., Zimmermann, G.A. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* 97 (1996) 1525-1534.

Wojakowski, W., Maslankiewicz, K., Ochala, A., Wyderka, R., Zuk-Popiolek, I., Flak, Z., Mroz, I., Tendera, M. The pro- and anti-inflammatory markers in patients with acute myocardial infarction and chronic stable angina. *Int J Mol Med.* 14 (2004) 317-322.

Zalai, C.V., Kolodziejczyk, M.D., Pilarski, L., Christov, A., Nation, P.N., Lundstrom-Hobman, M., Tymchak, W., Dzavik, V., Humen, D.P., Kostuk, W.J., Jablonsky, G., Pflugfelder, P.W., Brown, J.E., Lucas, A. Increased circulating monocyte activation in patients with unstable coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 38 (2001) 1340-1347.

Zhang, D.H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K., Ray, A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 272 (1997) 21597-21603.

Zhao, Z.Q., Mcgee, S., Nakanishi, K., Toombs, C.F., Johnston, W.E., Ashar, M.S., Vinten-Johansen, J. Receptor-mediated cardioprotective effects of endogenous adenosine are exerted primarily during reperfusion after coronary occlusion in the rabbit. *Circulation* 88 (1993) 709-719.

7. Danksagung

Die Danksagung der vorliegenden Dissertation richtet sich an all diejenigen, die mir mit Tatkraft und Unterstützung zur Seite standen, sowohl in technischen Fragen zur Gestaltung meiner Experimente, als auch in menschlicher Hinsicht.

Zunächst möchte ich meiner Betreuerin, Frau Prof. Dr.med. Ott, für die Ausgestaltung und Ideen zu meiner Dissertation danken. Ihre experimentellen Vorarbeiten legten den Grundstein der vorliegenden Promotionsarbeit. Durch Anregung zur Diskussion und Geduld bei den experimentellen Höhen und Tiefen war Sie für mich stets Vorbild und für diese Arbeit eine große Hilfe.

Weiterhin richtet sich mein aufrichtiger Dank an das Laborteam des Deutschen Herzzentrums München, insbesondere an die medizinisch technischen Angestellten, die mir mit Rat und Tat bezüglich experimenteller Vorgehensweisen zur Seite standen und dadurch unabdingbar für die Vollendung dieser Arbeit waren. Vielen Dank Birgit Campbell und Annette Stobbe. Tibor Schuster möchte ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung danken.

Für die seelische Unterstützung in der Zeit der Fertigstellung danke ich von Herzen meinen Eltern, Erika und Dr. Michael Wisniowski, ohne deren liebevolle Unterstützung dies alles nicht möglich gewesen wäre.

Ein großes Dankeschön richtet sich an meine Studienfreundin Stefanie Jellinghaus, die mir vor allem mit Ihrer moralischen Unterstützung eine sehr große Hilfe war.