

Deutsches Herzzentrum München  
Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen  
Der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Genexpressionsanalyse von humaner koronarer  
atherosklerotischer Plaque:  
Dysregulation von NFκB in der rupturierten Plaque.**

Stefanie Jellinghaus

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

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

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.- Doz. Dr. D. Zohlhöfer
2. Univ.- Prof. Dr. Th. A. Meitinger
3. Univ.- Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 18.10.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 19.07.2006 angenommen.

# Gliederung

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b>	1
I.1.	Zwei klinische Manifestationsformen der koronaren Herzerkrankung: Angina pectoris und Myokardinfarkt	1
I.2.	Pathogenese der Atherosklerose	2
I.2.1.	Geschichtlicher Überblick	2
I.2.2.	Pathogenese der stabilen Plaque	2
I.2.3.	Pathogenese der Plaqueruptur	4
I.3.	Der Transkriptionsfaktor NFκB spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Atherosklerose	6
I.3.1.	Historische und molekularbiologische Aspekte	6
I.3.2.	Regulation der Aktivität von NFκB	6
I.3.3.	Die Rolle von NFκB in der Pathogenese der Atherosklerose	7
I.4.	Anwendung des FilterWire-Protektionssystems	8
I.5.	Fragestellung	9
<b>II.</b>	<b>Material und Methoden</b>	10
II.1.	Patienten und Probengewinnung	10
II.2.	RNA-Isolation und cDNA-Synthese durch RT-PCR	10
II.3.	Markierung der cDNA mit Dig-dUTP	11
II.4.	Hybridisierung der cDNA-Arrays und Filmentwicklung	12
II.5.	Auswertung der Ergebnisse und Analyse der Daten der cDNA-Arrays	13
II.6.	Validierung der Daten mittels genspezifischer PCR	13
II.7.	Histologie und Immunhistochemie	14
II.8.	Statistik	14
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse</b>	15
III.1.	Patienten und Probengewinnung	15
III.2.	Die Zusammensetzung des Probenmaterials	15
III.3.	Vergleichende Genexpressionsanalyse zwischen rupturierter Plaque und stabiler Plaque	17
III.3.1.	Regulation von Transkriptionsfaktoren in der rupturierten Plaque	18

III.3.2. Regulation von apoptoseassoziierten Genen in der rupturierten Plaque	19
III.3.3. Regulation von proliferationsassoziierten Genen in der rupturierten Plaque	20
III.3.4. Regulation von Genen aus dem Bereich des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix und der Adhäsionsmoleküle in der rupturierten Plaque	21
III.3.5. Regulation von proinflammatorischen Genen in der rupturierten Plaque	22
III.3.6. Regulation von Genen aus dem Bereich DNA-Reparatur, -Replikation, -Transkription und -Translation	23
IV.3.7. Regulation von Genen mit Funktionen im Bereich von Stoffwechselreaktionen und Andere	24
III.3.8. Regulation von NFκB assoziiertem Genexpressionsmuster	25
III.3.9. Dysregulation von Mitgliedern der IκB-Genfamilie in der rupturierten Plaque	27
III.4. Validierung der Daten der cDNA-Arrays mit genspezifischer PCR	27
III.5. Immunhistochemischer Nachweis von aktiviertem NF-kappa B durch Färbung der NFκB-Untereinheit p65	28
IV. Diskussion	30
IV.1. Das FilterWire-System fängt in vivo Plaquematerial auf	30
IV.2. Das Plaquematerial der Infarkt-Patienten kann als ruptierte vulnerable Plaque bezeichnet werden	31
IV.3. Kandidaten-Gene, die zu Neovaskularisation und zu verminderten Zell-Zell-Kontakten führen	32
IV.4. Kandidaten-Gene, die zu Proliferation und Apoptose beitragen	33
IV.5. Die Aktivierung von NFκB in der Plaque führt zu einem NFκB assoziierten Genexpressionsmuster	34
IV.6. Dysregulation von NFκB als möglicher Mechanismus, der zur Vulnerabilität und Ruptur der Plaque führt	36
IV.7. Der TNF-Signaltransduktionsweg und die Aktivierung von NFκB	37
IV.8. Klinische Relevanz und therapeutische Ansätze	38

<b>V. Zusammenfassung</b>	41
<b>VI. Literaturverzeichnis</b>	43
<b>VII. Danksagung</b>	55

# **I. Einleitung**

## **I.1. Zwei klinische Manifestationsformen der koronaren Herzerkrankung: Angina pectoris und Myokardinfarkt**

Die koronare Herzkrankheit (KHK) gehört zu den häufigsten Erkrankungen der westlichen Welt und stellt in diesen Ländern eine der häufigsten Todesursachen dar (Yusuf et al., 2001). Die KHK ist eine stenosierende Erkrankung der Herzkranzgefäße. Ursache dieser Stenose sind atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwand. Im Verlauf der Krankheit führen die Gefäßwandveränderungen zu einer Minderdurchblutung und somit zu einer unzureichenden Sauerstoffversorgung des Herzmuskels.

Die stabile Angina pectoris (AP) ist eine Bezeichnung für einen klinisch stabilen Symptomenkomplex bei Patienten mit KHK. Die Symptome reichen von Thoraxschmerzen, retrosternalem Engegefühl bis hin zu vegetativen Symptomen. Ursache dieser Symptome ist eine inkomplette Insuffizienz eines Koronargefäßes. Am häufigsten liegt dieser Insuffizienz eine atherosklerotische Veränderung der Gefäßwand (Plaque) zu Grunde, deren Material an der Gefäßwand haftet. Dies führt lediglich zu einer inkompletten Ischämie des vom Koronargefäß versorgten Herzmuskelbereiches. Aus dieser Minderversorgung des Herzmuskels folgt die relativ typische klinische Symptomatik, jedoch reicht sie nicht aus, eine Herzmuskelnekrose nach sich zu ziehen. Folglich führt die inkomplette Minderperfusion weder zu einem Serumanstieg der herzspezifischen Enzyme noch zu Infarkt-typischen phasenhaften EKG-Veränderungen.

Der Myokardinfarkt (MI) tritt als eine Komplikation der KHK auf. Klinisch imponieren Patienten mit MI oft durch einen akuten Symptomenkomplex, der alle Symptome der AP bis hin zum plötzlichen Herztod beinhaltet. Dem MI liegt eine absolute Koronarinsuffizienz zugrunde. Die häufigste Ursache einer absoluten Koronarinsuffizienz ist die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque. Die Ruptur setzt subendotheliale Strukturen frei, die zur Thrombozytenaktivierung führen und das Koronargefäß verlegen. Dies führt zu einer anhaltenden Ischämie im Versorgungsgebiet des Gefäßes, was eine Nekrose des betroffenen Herzmuskelbereiches nach sich zieht. Infarkt-Patienten können durch typische Veränderungen im EKG und durch erhöhte Serumkonzentrationen herzspezifischer Enzyme identifiziert werden.

Der auf pathophysiologischer Ebene entscheidende Unterschied zwischen den zwei klinischen Manifestationsformen der KHK (AP bzw. MI) stellt die Stabilität bzw. Instabilität

der Plaque dar. Im Folgenden sollen deshalb gängige Modelle zur Pathogenese einer atherosklerotischen Gefäßwandveränderung bis hin zur Ruptur einer instabilen Plaque dargestellt werden.

## **I.2. Pathogenese der Atherosklerose**

### I.2.1. Geschichtlicher Überblick

Die Pathogenese der Atherosklerose ist seit Jahrzehnten Gegenstand lebhafter wissenschaftlicher Diskussion. Durch die Entwicklung neuer diagnostischer und wissenschaftlicher Methoden wurden immer detailliertere Untersuchungen möglich. So hat sich im Laufe der Zeit der Blickwinkel auf den Entstehungsprozess der Atherosklerose stark verändert.

In den 1970er Jahren konzentrierte sich die wissenschaftliche Diskussion auf den kausalpathogenetischen Zusammenhang erhöhter Serum-Lipidwerte und der Atherosklerose. Klinisch-epidemiologische und experimentelle Untersuchungen ließen den Schluss zu, dass eine Hypercholesterinämie zu Atherosklerose führen kann (Ross und Harker, 1976).

Zell- und molekularbiologische Methoden erlaubten in den 1980er Jahren funktionelle Einsichten in den Entwicklungsprozess der Atherosklerose. Es konnten zahlreiche Signal-Proteine wie z.B. PDGF-A (platelet derived growth factor) und TGF- $\beta$  (transforming growth factor) identifiziert werden, die mannigfaltig in diesen Prozess involviert sind. Als Zielzellen dieser Signal-Moleküle reagieren z.B. glatte Muskelzellen mit erhöhter Proliferationsrate (zusammengefasst von Nilsson, 1993).

Im letzten Jahrzehnt setzte sich die Vorstellung durch, dass die Atherosklerose eine entzündliche Erkrankung darstellt (zusammengefasst von Ross, 1993; Libby, 2002).

### I.2.2. Pathogenese der stabilen Plaque

Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat sich folgendes pathogenetisches Modell der Atherosklerose etabliert:

Als auslösender Faktor wird eine endotheliale Verletzung mit nachfolgender Dysfunktion angenommen, die durch bestimmte Risikofaktoren getriggert wird („response-to-injury-theory“; Ross et al., 1977). Die Dysfunktion erlaubt die transendotheliale Diffusion von Lipoproteinen, die sich in die Arterienwand einlagern (Springer, 1994). Zusammen mit zahlreichen anderen Faktoren führt dies zu einer intramuralen Entzündungsreaktion

(zusammengefasst von Ross, 1999). Als Hauptbestandteil dieser intramuralen Lipidansammlungen wurde LDL (low density Lipoprotein) charakterisiert (Yla-Herttuala et al., 1989). Die eingelagerten Lipide werden oxidiert (zusammengefasst von Berliner et al., 1995) und führen zu einer Hochregulierung der Expression von z.B. makrophage colony stimulating factor (M-CSF) (Rajavashisth et al., 1990) und monocyte chemotactic protein (MCP-1) (Leonard und Yoshimura, 1990). Dies löst eine Entzündungsreaktion aus, die von Entzündungsmediatoren wie tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1) und M-CSF unterhalten wird. Die genannten Zytokine induzieren den Einbau von LDL-Rezeptoren in die Endothelzellmembran, was die LDL-Aufnahme in die intramuralen Lipidansammlungen begünstigt (zusammengefasst von Ross, 1999).

Gesundes Endothel bindet in Kontakt mit fließendem Blut keine Leukozyten. In atherosklerotischen Läsionen induzieren die modifizierten Lipoproteinpartikel im Zusammenspiel mit einer pathologischen Hämodynamik eine erhöhte endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten (Cybulsky und Gimbrone, 1991; Nagel et al, 1994; Dong et al, 1998). Dadurch kommt es zur Adhäsion von Leukozyten an das atherosklerotische Endothel, was zur Leukozyten-Diapedese in die Intima führt (Filip et al., 1987).

Zusätzlich wirken Zytokine chemotaktisch auf die Leukozyten. So lockt MCP-1 und IL-8 (Interleukin 8) Blutmonozyten an (Gu et al., 1998; Boisvert et al., 1998), die unter dem Einfluss von MCP-1 und M-CSF zu Makrophagen differenzieren (Kodama et al., 1999). Die Makrophagen exprimieren „scavenger-Rezeptoren“ (scavenger = *engl.* Aasfresser) an ihrer Oberfläche, über die die modifizierten Lipide gebunden und durch die Makrophagen phagozytiert werden können (Geng et al., 1995; Nicholson et al., 2001). Die Cholesterol-beladenen Makrophagen werden ihrer Morphologie nach als „Schaumzellen“ bezeichnet.

Die vorgestellten Mechanismen führen zu einer intimalen Einlagerung von Lipiden und Leukozyten. Diese Einlagerung stellt sich lichtmikroskopisch als „fatty streak“ (*engl.* Fett-Streifen) dar (Stary et al., 1994). Der „fatty streak“ ist das erste histopathologische Korrelat der Atherosklerose (zusammengefasst von Berliner et al., 1995).

Die weitere Entwicklung ist durch Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen in der Arterienwand gekennzeichnet (Ross und Glomset, 1973). Dabei spielen Zytokine, Wachstumsfaktoren und eine veränderte Hämodynamik die Schlüsselrollen (Ross, 1999; Lee et al., 2001). Die glatten Muskelzellen beginnen Kollagen und Proteoglykane zu synthetisieren, die zur weiteren Permeabilitätssteigerung des Endothels, zur Lipidakkumulation und Oxidation der Lipoproteine beitragen (zusammengefasst von Wight,

1989; Olin et al., 1999). Neben glatten Muskelzellen bilden Makrophagen, unter dem Einfluss von aktivierten T-Lymphozyten, verstärkt extrazelluläre Matrix, u.a. Proteoglykane. Diese Vorgänge führen zusammen zur Verdickung der Arterienwand (zusammengefasst von Libby, 2000).

Das Vollbild einer atherosklerotischen Plaque besteht aus Schaumzellen, Entzündungszellen, nekrotischem Material und Fetteinlagerungen (Steinberg, 1987). Eine fibröse Kappe („fibrous cap“) aus glatten Muskelzellen, extrazellulärer Matrix und Kollagen bedeckt diese thrombogene Gefäßwandinlagerung und grenzt sie gegen den Blutstrom ab (Kereiakes, 2003; zusammengefasst von Falk, 1992). „Stabil“ bedeutet in diesem Zusammenhang, dass von einer wandhaftenden und nicht rupturgefährdenden Plaque auszugehen ist. Die stabile Plaque (SP) entspricht somit am ehesten dem klinischen Bild der stabilen AP. Von der SP kann die „vulnerable“ bzw. instabile Plaque abgegrenzt werden, die die Gefahr einer Plaqueruptur in sich birgt.

### I.2.3. Pathogenese der Plaqueruptur

Wie oben ausgeführt (Abschnitt I.1.) ist anzunehmen, dass der Stabilitätszustand einer Plaque eine entscheidende Rolle dabei spielt, wie sich eine KHK klinisch manifestiert. Diese Hypothese führte zu den von Naghavi und Kollegen (2003) geprägten Begriffen der instabilen bzw. vulnerablen Plaque.

Die „vulnerable“ Plaque bezeichnet einen Plaquezustand, der sich durch Instabilität und somit durch Verletzbarkeit und Rupturgefahr auszeichnet. Man darf annehmen, dass einem MI ursächlich eine rupturierte Plaque (RP) zugrunde liegt. Morphologisch wird eine vulnerable Plaque durch eine ausgedünnte fibröse Kappe über der zum Teil nekrotischen Ansammlung aus Lipiden, Entzündungszellen und Neovaskularisationen charakterisiert (Kereiakes, 2003; zusammengefasst von Nakamura et al., 2004).

Die drei Mechanismen, die zu den hauptsächlichen Ursachen für die Entwicklung einer vulnerablen Plaque bzw. für das Risiko einer Plaqueruptur gezählt werden, umfassen (1) die Ausdünnung der fibrösen Kappe, (2) apoptotische Vorgänge innerhalb der Plaque und (3) Einblutung in die Plaque aus neu gebildeten Gefäßen (zusammengefasst von Libby et al., 2002).

#### (1) Ausdünnung der fibrösen Kappe:

Die fibröse Kappe stellt einen mechanischen Schutzmechanismus gegen die Plaqueruptur dar. Sie grenzt die Ansammlung von Lipiden, Entzündungszellen und das nekrotisch gewordene Gewebe gegen seine Umgebung, den Blutfluß ab. Kommt es zur Ausdünnung



dieser abdeckenden Schutzschicht, kann es zur Ruptur kommen. Man geht davon aus, dass dies den häufigsten Mechanismus der Plaqueruptur darstellt (zusammengefasst von Libby, 2000).

Mögliche molekulare Mechanismen, die zur Ausdünnung der fibrösen Kappe führen können, wurden von zahlreichen Autoren beschrieben. Während der Entwicklung der fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion beginnen die aktivierten Leukozyten hydrolytische Enzyme, Metalloproteinasen (Camejo, 2003; Hermann et al., 2001), Zytokine und Wachstumsfaktoren (Amento et al., 1991) freizusetzen, die zu einer Auflösung der Gewebsverbindungen bis zu fokalen Nekrosen in der fibrösen Kappe führen können (zusammengefasst von Libby, 2001).

#### (2) Apoptose:

Der programmierte Zelltod („Apoptose“) scheint zur Instabilität der Plaque beizutragen (zusammengefasst von Mallat und Tedgui, 2001; Kockx, 1998). Apoptose bedeutet, dass einzelne Zellen durch ein spezifisches intrazelluläres Programm gesteuert absterben. Der Zellkern beginnt zu schrumpfen, das Chromatin wird fragmentiert, die Plasmamembran zerfällt in Vesikel, was schließlich zur Auflösung der Zelle führt. Die daraus entstehenden apoptotischen Reste werden von Makrophagen phagozytiert, wobei keine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Induziert werden kann die Apoptose einer Zelle sowohl auf extrinsischem als auch auf intrinsischem Weg. Beide Wege führen zur gemeinsamen Endstrecke, der Aktivierung von Kaspasen und damit zum programmierten Zelltod (zusammengefasst von Mallat und Tedgui, 2000).

Durch Transmissions-Elektronen-Mikroskopie von Atherektomie-Proben konnte gezeigt werden, dass in Plaquematerial von Patienten mit instabiler AP eine höhere Apoptoserate vorliegt als in Plaque von Patienten mit stabiler AP (Bauriedel et al., 1997). Die apoptotischen Vorgänge finden v.a. in den Schaumzellen, in glatten Muskelzellen, T-Lymphozyten, Endothelzellen (zusammengefasst von Mallat und Tedgui, 2000) und insbesondere in Makrophagen (Björkerud und Björkerud, 1996) statt.

#### (3) Einblutung aus Gefäßneubildungen:

Als dritte mögliche Ursache einer Plaqueruptur wird die Einblutung aus fragilen neugebildeten Mikrogefäßen angenommen. Diese Neovaskularisationen bilden sich in Folge der Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie dem vascular endothelial growth factor (VEGF), durch Endothelzellen und Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen. Kommt es zur Ruptur dieser fragilen Gefäße, kann dies zur Instabilität des Plaques beitragen (de Boer et al., 1999).

Bisher sind noch keine biologischen Marker gefunden worden, die im klinischen Alltag bei der Differenzierung zwischen einer vulnerablen und stabilen atherosklerotischen Plaque helfen könnten.

### **I.3. Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Atherosklerose**

#### I.3.1. Historische und molekularbiologische Aspekte

NF $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Rel-Familie gehört und in zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen eine zentrale Rolle einnimmt. Fünf Mitglieder dieser Rel-Familie sind bisher identifiziert worden: p65 (RelA), p50/p105, c-Rel, p52/p100 und RelB. Allen gemeinsam ist die Rel-homologe-Domäne (RHD) (zusammengefasst von Janssen-Heininger et al., 2000).

1986 entdeckten Sen und Baltimore NF $\kappa$ B im Zellkern von B-Lymphozyten, wo der Transkriptionsfaktor während der Entwicklung von B-Lymphozyten die Transkription der  $\kappa$ -Leichtketten von Immunglobulinen induziert. Wenig später wurde NF $\kappa$ B als Faktor im Zytoplasma anderer Zellen entdeckt (Lenardo et al., 1989).

Das prototypische NF $\kappa$ B-Dimer besteht aus den Untereinheiten p50 und p65 (RelA) (Baeuerle und Baltimore, 1989). Im inaktiven Zustand liegt NF $\kappa$ B als Homo- oder Heterodimer im Zytosol an sein Inhibitorprotein I $\kappa$ B (Inhibitory kappa B) gebunden vor (Baeuerle und Baltimore, 1988). I $\kappa$ B bindet an die Rel-homologe-Domäne (RHD) und maskiert das Translokationssignal des Transkriptionsfaktors. Durch diese Bindung verbleibt NF $\kappa$ B in inaktiver Form im Zytoplasma (Ganchi et al., 1992).

#### I.3.2. Regulation der Aktivität von NF $\kappa$ B

Die Aktivität von NF $\kappa$ B wird durch I $\kappa$ B-Proteine reguliert (Ghosh und Baltimore, 1990). Zu den wichtigsten Mitgliedern der I $\kappa$ B-Familie werden I $\kappa$ B- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\epsilon$  gezählt. Im inaktiven Zustand liegt NF $\kappa$ B im Zytosol an I $\kappa$ B-Proteine gebunden vor. Eine Aktivierung von NF $\kappa$ B wird durch die Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Proteine vermittelt (Baeuerle und Baltimore, 1988; Brown et al., 1995; Ghosh und Baltimore, 1990). Diese Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Proteine durch den I $\kappa$ B-Kinase-Komplex und der Proteinkinase C führt zur Lösung von I $\kappa$ B aus dem Komplex mit NF $\kappa$ B. Damit wird das Translokationssignal von NF $\kappa$ B freigelegt, und es kommt zu einem raschen Import von NF $\kappa$ B in den Kern der Zelle. (Ghosh and Baltimore,

1990). Im Kern bindet NF $\kappa$ B an die DNA und reguliert die Transkription einer großen Zahl von Genen (Lenardo et al., 1989; zusammengefasst von Pahl, 1999). Nachdem NF $\kappa$ B im Zellkern an die DNA gebunden hat, wird I $\kappa$ B vermehrt exprimiert, wobei I $\kappa$ B- $\alpha$  , als wichtigster Inhibitor autoregulatorisch durch NF $\kappa$ B in seiner Expression reguliert wird (Sun et al., 1993). I $\kappa$ B transloziert in den Zellkern, löst die Bindung von NF $\kappa$ B an die DNA und geht erneut einen Komplex mit NF $\kappa$ B ein (Zabel und Baeuerle, 1990). Der inaktive NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B -Komplex wird zurück in das Zytoplasma transportiert. Damit schließt sich der Regelkreis aus Aktivierung und Inaktivierung von NF $\kappa$ B (Arenzana-Seisdedos et al., 1997). Verschiedene Stimuli können den Transkriptionsfaktor aktivieren. Zu diesen aktivierenden Faktoren zählen z.B. Zytokine, virale und bakterielle Zellbestandteile, Radikale (zusammengefasst von Pahl, 1999) und oxidativer Stress (Schreck et al., 1992). Aktiviertes NF $\kappa$ B bindet wiederum an die DNA einer Zelle und führt zu einer Hochregulierung von bestimmten Genen, die an Entzündungsreaktionen, viraler Replikation, NO-Produktion, Zell-Zell-Interaktion, Apoptose, Proliferation etc. beteiligt sind (zusammengefasst von Pahl, 1999). Dabei nimmt die p50-Untereinheit eine unterstützende Funktion bei der Bindung von p65 an die DNA ein. P65 hingegen ist für die Initiation der Transkription verantwortlich (Schmitz und Baeuerle, 1991) und ist Rezeptor für I $\kappa$ B (Urban und Baeuerle, 1990).

### I.3.3. Die Rolle von NF $\kappa$ B in der Pathogenese der Atherosklerose

Auffallend viele Gene, die eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielen, werden durch den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B in ihrer Expression positiv reguliert. Dazu gehören proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$ , Interleukin-1-beta (IL-1 $\beta$ ), M-CSF und MCP-1, die in atherosklerotischer Plaque vermehrt exprimiert werden (Collins, 1993). Adhäsionsmoleküle wie vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und endothelial leucocyte adhesion molecule 1 (ECAM-1), die das Anheften von Leukozyten an das Endothel von Gefäßen ermöglichen, werden ebenfalls durch NF $\kappa$ B hochreguliert (Iademarco et al., 1992; van de Stolpe et al., 1994; Whelan et al., 1991). Umgekehrt sind Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  und IL-1, sowie oxidiertes LDL, in der Lage, NF $\kappa$ B zu aktivieren (Osborn et al., 1989, Rajavashisth et al., 1995). Die Sekretion von Metalloproteinasen (MMP-1 und -3) durch Schaumzellen, die entscheidend zur Instabilität der Plaque beiträgt, ist abhängig von der Aktivierung durch NF $\kappa$ B (Chase et al., 2002).

Die Expression dieser NF $\kappa$ B-regulierten Gene führt zur Entzündungsreaktion und zur Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen in der atherosklerotischen Läsion. Dem

folgt die Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, was wiederum NFκB aktiviert (zusammengefasst von Collins und Cybulscy, 2001). Mit Kulturen von Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und T-Lymphozyten konnte eine Aktivierung von NFκB durch entzündliche und proliferative Stimuli gezeigt werden. Brand et al. (1996) wies aktiviertes NFκB in glatten Muskelzellen, Makrophagen und Endothelzellen der atherosklerotischer Plaque nach. In gesunden Gefäßen, die frei von atherosklerotischen Veränderungen sind, wurde kaum aktiviertes NFκB nachgewiesen (zusammengefasst von Collins und Cybulscy, 2001). Mithilfe von immunhistochemischer Anfärbung von aktiviertem NFκB und mithilfe Electromobility Shift Assays konnte eine erhöhte Aktivität von NFκB in Plaque und Myokard von Patienten mit instabiler AP gezeigt werden, im Vergleich zu stabiler AP (Wilson et al., 2002; Valen et al., 2000). Eine erhöhte Aktivität von NFκB beim akuten MI wurde bisher vor allem auf tierexperimenteller Ebene gezeigt.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass NFκB die Entzündungsreaktion in der frühen Phase einer atherosklerotischen Plaque triggert. Welche Rolle NFκB in der Pathogenese einer RP spielt, ist bisher nicht beantwortet.

#### **I.4. Anwendung des FilterWire-Protektionssystems**

Die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) mit Stent-Implantation in atherosklerotisch verengte native und Bypass-Gefäße hat zu einer deutlichen Verbesserung des Krankheitsverlaufes und der Prognose der KHK beigetragen. Bei über 90 % der Patienten erfolgt der Eingriff mit einer Kombination aus Stent-Implantation und Medikation erfolgreich. Häufig kommt es jedoch zu Mikroembolisationen von atherosklerotischem Material (Topol und Yadav, 2000). Schon früh wurde das Phänomen der Mikroembolisierung (Thrombosierung eines mikroskopisch kleinen Gefäßes) beschrieben. Atherosklerotische Mikroembolisationen entstehen aus abgelöstem Plaquematerial, das in die koronare Mikrozirkulation ausgeschwemmt wird und dort kleinste Gefäße verschließt. Eine Mikroembolisation kann sich bei einer Ruptur von atherosklerotischer Plaque bei einem akuten koronaren Ereignis oder während einer koronaren Intervention ereignen. Nach Interventionen kommt es bei diesen Patienten zu einem Serumanstieg von herzspezifischen Enzymen infolge von minimalen ischämischen Myokardschäden („minor myocardial injury“). Lokal löst die Mikroembolisation multifokale Mikroinfarkte (Davies et al., 1986)

und eine Entzündungsreaktion aus, die durch eine zelluläre Infiltration charakterisiert ist (Falk, 1985).

Um Mikroembolisationen während Stentimplantationen und Ballonangioplastie zu verhindern, wurden Protektionssysteme entwickelt, die distal der Stentimplantation das abgelöste embolische Material auffangen können. Zur ersten Generation dieser Protektionssysteme zählten Angioguard-Filter. Einer der neueren Filter stellt der FilterWire Ex (Boston Scientific-Embolic Protection, Santa Clara, CA) dar. Der Filter selbst besteht aus einer Polyurethan-Tasche, die Poren in der Größe von 80µm besitzt. Diese Porengröße erlaubt eine normale Perfusion während der Intervention und fängt gleichzeitig das embolische Material auf.

Das distale Protektionssystem FilterWire Ex stellt nicht nur einen klinische Fortschritt in der postinterventionellen Komplikationsbewältigung dar (Baim et al., 2002), sondern bietet die Möglichkeit, humanes Plaquematerial in vivo aus Koronararterien zu gewinnen.

## **I.5. Fragestellung**

Die häufigste Ursache für einen akuten Myokardinfarkt (MI) ist die Ruptur einer instabilen, vulnerablen Plaque. Die molekularen Mechanismen, die zur Ruptur einer Plaque führen sind bisher nur unzureichend erklärt.

Das FilterWire-Protektionssystem ermöglichte die Gewinnung von Material aus humaner stabiler Plaque (SP) und rupturierter Plaque (RP) aus Koronararterien während PTCA. Mithilfe von cDNA-Arrays wurde die Genexpression von über 2387 Genen in Proben aus SP und RP analysiert. Ein Vergleich der Genexpressionsergebnisse von SP und RP sollte ein Genexpressionmuster ergeben, das differentiell zwischen SP und RP exprimiert war. Das Ziel dieser Arbeit war es, unter dem differentiell exprimierten Genexpressionmuster Gene zu identifizieren, die in der Pathogenese der RP eine mögliche Rolle spielen und als Zielstrukturen für neue therapeutische Optionen dienen könnten.

## **II. Material und Methoden**

### **II.1. Patienten und Probengewinnung**

Insgesamt wurden FilterWire-Proben von 68 Patienten gewonnen, die im Rahmen einer Stentimplantation eine distale Prorektion mittels FilterWire-System (Boston Scientific) erhalten hatten. 43 der 68 Patienten hatten einen MI erlitten, 25 der 68 Patienten zeigten die Symptomatik einer stabilen AP. Die Patienten mit akutem MI (RP) erhielten die Stentimplantation innerhalb 48 Stunden nach Beginn der Infarktschmerzen. Keiner der Patienten mit stabiler AP (SP) hatte je einen MI erlitten.

15 der 68 FilterWire-Proben (RP:  $n=10$ , SP:  $n=5$ ) wurden histologisch und immunhistologisch analysiert. Die restlichen 53 der 68 Proben (RP:  $n=33$ , SP:  $n=20$ ) wurden für die Genexpressionsanalyse genutzt.

Das mittels FilterWire-System gewonnene Probenmaterial wurde bis zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### **II.2. RNA-Isolation und cDNA-Synthese durch RT-PCR**

Die in flüssigem Stickstoff tiefgekühlten Proben wurden direkt weiterverarbeitet, um eine enzymatische Zerstörung der RNA bei Erwärmung der Probe zu vermeiden. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit Lysispuffer (Dyna) lysiert. Mit magnetischen Dynabeads Oligo (dT) 25 (Dyna) wurde die mRNA am Poly-A-Ende gebunden und isoliert. Mit Superscript II (Gibco), einer reversen Transkriptase, und dem CFL5c-Primer [5'-(CCC)<sub>5</sub> GTC TAG A (NNN)<sub>2-3</sub>'] wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden 15-20 dGTP-Basen in der Tailingreaktion durch die Terminale Deoxynucleotide Transferase (MBI Fermentas) an das freie 5' Ende angehängt. Dadurch konnte die modifizierte cDNA mit dem CP2 Primer [5'-TCA GAA TTC ATG (CCC)<sub>5-3</sub>'] effektiv amplifiziert und mit Digoxigenin-11-dUTP (Roche) markiert werden. In dieser Form konnte die modifizierte cDNA auf kommerziell erwerbliche cDNA-Arrays hybridisiert werden.

Im Einzelnen wurde in folgenden Schritten vorgegangen:

Die in flüssigem Stickstoff gefrorenen FilterWire-Proben wurden direkt in 1000µl Lysispuffer (Dyna) lysiert. Nach wiederholtem Vortexen und Scheren mit der Pipette wurde

die Probe kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde zu magnetischen Dynabeads Oligo (dT) 25 (Dyna) gegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert.

Danach wurde das Gemisch aus Beads und Probe alternierend in Waschpuffer-1 (50 mM Tris-HCL, pH 8,3, 75 mM KCL, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 0,5 % Igepal) und Waschpuffer-2 (50 mM Tris-HCL, pH 8,3, 75 mM KCL, 3 M MgCl<sub>2</sub>, 10 M DTT, 0,5 % Tween-20) mit dem Magneten gewaschen. Die an die Beads gebundene mRNA wurde in First Strand Buffer (Gibco) mit 0,01 M DTT, 0,25 % Igepal, 50 µM CFL-5c-Primer [5'-(CCC)<sub>5</sub> GTC TAG A (NNN)<sub>2</sub>-3'], 0,5 mM dNTP und 200 U Superscript II (Gibco) in einer 20 µl Reaktion bei 44°C für 45 Minuten revers transkribiert. Mit diesem Schritt war die mRNA in cDNA umgeschrieben.

Anschließend wurden die Beads mit Tailingwaschpuffer (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0, 1 mM DTT, 0,25 % Igepal) im Magneten gewaschen. In einem Volumen von 10 µl mit 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM DTT, 0,2 mM dGTP, und 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurde die Tailingreaktion mit 94°C gestartet. Damit wurde der RNA-DNA-Doppelstrang denaturiert und die cDNA von den Beads gelöst. Im Anschluß daran wurden 10 U Terminaler Deoxynucleotidtransferase (MBI-Fermentas) bei 37°C zugegeben, und die Tailingreaktion lief bei 37°C für 24 min weiter. Mit diesem Schritt wurden dGTP-Basen an das freie 5'Ende der cDNA angehängt.

In der anschließenden PCR wurde die cDNA mit Puffer 1 (Expand™ Long Template, Roche), 3 % Formamid, 1,2 µM CP2-Primer [5'-TCA GAA TTC ATG (CCC)<sub>5</sub>-3'], 350 µM dNTP und 4,5 U DNA-Polymerase-Mix (Roche) in einem Gesamtvolumen von 50 µl amplifiziert. Die PCR Reaktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt: 20 Zyklen: 94°C für 15 Minuten, 65 °C für 30 Sekunden und 68 °C für 2 Minuten. Im Anschluss daran folgten 20 Zyklen 94 °C für 15 Sekunden, 65 °C für 30 Sekunden, 68 °C für 2:30 Minuten + 10 Sekunden /Zyklus und einer abschließenden Extension von 68 °C für 7 Minuten.

Durch die vorgestellten Schritte war die mRNA zu cDNA umgeschrieben und amplifiziert worden.

### **II.3. Markierung der cDNA mit Dig-dUTP**

Die amplifizierte cDNA wurde in einer Reamplifikations-PCR mit Digoxigenin gekoppeltem dUTP (50µM Digoxigenin-11-dUTP, Dig-dUTP) (Roche) amplifiziert. Die PCR wurde in einem Volumen von 50µl in Anwesenheit von Puffer 1 (Expand™ Long

Template, Roche), 20% Formamid, 1/7 dNTP-Mix (10mM dCTP, 10mM dGTP, 10mM dATP, 8,4mM dTTP), 24µM CP2-Primer [5'-TCA GAA TTC ATG (CCC)<sub>5</sub>-3'], Digoxigenin-11-dUTP (Roche) und 3,5 U DNA-Polymerase-Mix (Roche) durchgeführt. Mit diesem Schritt war die cDNA mit Dig-dUTP markiert.

#### II.4. Hybridisierung der cDNA-Arrays und Filmentwicklung

Die cDNA-Arrays wurden über Nacht in DigEasyHyb-Puffer (Roche) und einem DNase-Verdau prähybridisiert. Dieser erste Schritt diente der Blockierung aller nicht-spezifischen Bindungen. Danach wurde die cDNA-Probe zugegeben, und die Filter wurden über mindestens 48 Stunden hybridisiert. In dieser Phase fand die Bindung der Proben-cDNA an die DNA-Sonden des Filters statt. Daran schloss sich ein mehrgängiger Waschvorgang mit Antikörpermarkierung an.

Im Einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Atlas Human Cancer 1.2-, Human 1.2- und Cardiovascular-Arrays (clontech) wurden über Nacht in *DigEasyHyb*-Puffer (Roche) und einem DNase-Verdau bei 44 °C prähybridisiert.

Die markierte cDNA wurde mit Heringsperm-DNA bei 94 °C für 10 Minuten denaturiert. Anschließend wurde die cDNA-Probe der Hybridisierungslösung zugefügt und für 48 Stunden bei 44 °C inkubiert.

Die Arrays wurden nach Anleitung des Herstellers gewaschen, und die gebundenen cDNA/DNA-Sonden-Komplexe mit dem Antikörper Anti-Dig-AP (Anti-Digoxigenin-AP (fab-fragment) antibody, Roche) markiert.

Die einzelnen Waschvorgänge sahen wie folgt aus:

Schritt	Zeit	Temp.
Waschen in 2 x SSC (Sigma)/0,1 % SDS (Sigma)	kurz	68°C
Waschen in 1 x SSC/0,1% SDS	kurz	68°C
Waschen in 0,5 x SSC/0,1% SDS-Lösung	15 min	68°C
Zweimal Waschen in 0,1 x SSC/0,1% SDS	2x30 min	68°C
Schwenken in Dig-Waschpuffer I (10mM Maleinsäure pH:7,5, 150mM NaCl auf 1000ml)	kurz	RT
Blockieren in 50 ml Blocking-Lösung (10mM Maleinsäure pH:7,5, 150mM NaCl, 0,3% Tween und 1%iges Blocking-Reagent auf 1000 ml)	30 min	RT
Hinzufügen des Antikörper Anti-Digoxigenin-Ap (fab fragment) (Roche),	45 min	RT



1:1000 verdünnt		
Zweimal waschen in Dig-Waschpuffer-II (10mM Maleinsäure pH:7,5, 150mM NaCl und 0,3% Tween auf 1000 ml)	2x15 min	RT
Schwenken in Dig-Waschpuffer-III (100mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH 9,5 auf 1000 ml)	kurz	RT
Trocknen der Filter	Kurz	RT
Inkubation mit 1:100 CSPD-Verdünnung (Roche)	5 min	RT
Trocknen der Filter	Kurz	RT
Inkubation bei 37°C	15 min	37°C

Tabelle 1: Waschschritte bei der Hybridisierung der cDNA-Arrays

Nach den Waschgängen wurden die Filter für 30 Minuten auf Röntgenfilmen inkubiert und anschließend entwickelt.

## II.5. Auswertung der Ergebnisse und Analyse der Daten der cDNA-Arrays

Die entwickelten Filme wurden mit einem kalibrierten Scanner eingescannt und mit der array vision™ Software (Imaging Research Inc) ausgewertet. Der Hintergrund wurde subtrahiert und die Hybridisierungssignale wurden in Graustufen auf die Signalintensität der neun Housekeeping-Gene, die sich auf jedem Filter befanden, normalisiert. Die durchschnittliche Signalintensität der Housekeeping-Gene bekam einen numerischen Wert von eins. Der Hintergrund einen numerischen Wert von Null.

## II.6. Validierung der Daten mittels genspezifischer PCR

4 Gene der 89 differentiell expremierten Gene wurden durch eine genspezifische PCR validiert. Darüber hinaus wurde eine genspezifische PCR für für das Gen I $\kappa$ B- $\alpha$  gemacht, das nicht auf den Arrays analysiert worden war. Mithilfe einer  $\beta$ -Aktin spezifischen PCR wurde für jede Probe ein bestimmtes Volumen ermittelt wurde, das gleichen cDNA-Mengen entsprach. Die Amplifizierung wurde in einem 25 $\mu$ l Reaktionsvolumen mit PCR-Puffer (Sigma), 200  $\mu$ M dNTPs, 0,1  $\mu$ M eines jeden Primers und 0,75 U Taq Polymerase (Sigma)

durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel mit Ethyidiumbromid (0,5 µg/ml) elektrophoretisch getrennt.

## **II.7. Histologie und Immunhistochemie**

Für die histologische und immunhistologische Untersuchung wurden 15 FilterWire-Proben in 4% Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingelegt. Die eingebetteten Proben wurden 2 µm dick geschnitten und mit Hämatoxylin und nach van-Giesson gefärbt.

Für die immunhistologische Färbung wurden die Schnitte in Xylol deparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe entwässert. Zur Antigendarstellung wurden die Schnitte für 7 Minuten in Citratpuffer (10 mM, pH= 6,0) druckerhitzt. Anschließend wurde die endogene Peroxidase mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und bei der p-65- Färbung zusätzlich noch mit 4% dried skim milk für 15 Minuten geblockt. Anschließend wurde der Primärantikörper gegen CD3 (A0452, Dako, 1:400), CD68 (M0814, Dako, 1:100) bzw. p65 (clone 12H11, Chemicon, 1:200) in Antibody Diluent (Dako) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Immunfärbung wurde die Streptavidin-Horseradish-Peroxidase Technik (Dako ChemMate detection Kit K5001) benutzt. Mit DAB als Substrat wurden die Schnitte entwickelt und zur Kernfärbung in Hämalaun inkubiert. Alle Waschschritte wurden bei der CD-3 und CD-68-Färbung mit TRIS-Puffer (pH= 7,6), bei der p65-Färbung ergänzend dazu mit 0,01% Triton durchgeführt.

## **II.8. Statistik**

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der humanen FilterWire-Proben sind als mittlere Expressionswerte der untersuchten Proben der Patientengruppen dargestellt. Die Unterschiede zwischen der Infarkt- und der Angina-Gruppe sind mit dem Man-Whitney-Test analysiert worden.

Es wurden nur solche Gene als differentiell exprimiert akzeptiert, wenn das mediane Expressionsniveau zwischen den beiden Gruppen einen mehr als  $\geq 2$ -fachen Unterschied zeigte und der p-Wert in der statistischen Analyse  $< 0,05$  war.

Alle statistischen Analysen wurden mit dem SPSS Statistikpaket (Version 8.0-10.0) durchgeführt.

## **III. Ergebnisse**

### **III.1. Patienten und Probengewinnung**

Insgesamt wurden FilterWire-Proben von 68 Patienten nach Genexpressionsmuster [ $n=53$ ] und nach sowohl histologischer als auch immunhistochemischer Zusammensetzung [ $n=15$ ] untersucht.

Die Patienten hatten im Rahmen einer Stentimplantation eine distale Protektion mittels FilterWire-System (Boston Scientific) erhalten. Die klinischen, demographischen und angiographischen Daten der Patienten, bei denen die Genexpressionsanalyse erfolgreich war, sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

### **III.2. Die Zusammensetzung des Probenmaterials**

Zur histologischen Untersuchung wurden 15 FilterWire-Proben ( $n=10$  RP,  $n=5$  SP) in 4% Formaledehyd fixiert und in Paraffin eingelegt. Die Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin und nach van-Giesson gefärbt. Mithilfe der van-Giesson-Färbung konnte kollagenes Material rot dargestellt werden. Darüber hinaus wurden dieselben Proben immunhistochemisch mit verschiedenen Antikörpern untersucht, die es ermöglichten, den zellulären Bestandteil des aufgefangenen Materials weiter zu differenzieren. Mit Anti-CD-3-Antikörpern konnte ein T-Zell-spezifisches Oberflächenantigen nachgewiesen werden. Mit Anti-CD-68-Antikörpern wurden spezifisch Makrophagen erkannt.

Von den 10 RP-Proben enthielten 4 Proben (40%) kein Material. Die restlichen 60% enthielten Komponenten von Plaquematerial. Dazu gehörten Kollagen, Schaumzellen, Fibroblasten, Granulozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen, amorphe Lipidsubstanz, Fibrin, organisierter Thrombus und nekrotisches Material. Die 5 SP-Proben enthielten ebenfalls in 40% der Proben kein Material. 60% enthielten zelluläres Material, das in seiner Zusammensetzung den Infarkt-Proben entsprach. Daraus war zu schließen, dass das mit dem FilterWire-System aufgefangene Material sich in der RP und der SP entsprach. Abbildung 1 zeigt histologische Bestandteile des aufgefangenen Plaquematerials.

	RP (n=5)	SP (n=5)
Alter	71,2±8,6	67,8±6,3
Frauen	1	1
Aktive Raucher/ Ex-Raucher	1/0	0/1
Hypercholesterinämie	4	4
Art.Hypertonus	4	5
Diabetes mellitus	0	2
Akuter Myokardinfarkt	5	0
Eingeschränkte LV- Funktion	4	0
CK-max (U/l)	646,2±343,5	36,36±17,9
Troponin-max (ng/ml)	4,2±2,6	≤0,01±0,0
Zielläsion		
LAD	2	1
LCX		1
RCA	1	2
Bypass	2	1

Tab.2: Die Tabelle zeigt Absolutwerte oder Mittelwerte ± Standardabweichung von den Patientendaten der Genexpressionsanalyse. RP= rupturierte Plaque; SP= stabile Plaque; CK= Creatininkinase; LV= linker Ventrikel; LAD= Ramus interventricularis anterior; LCX= linker Ramus circumflexus; RCA= rechte Koronararterie.

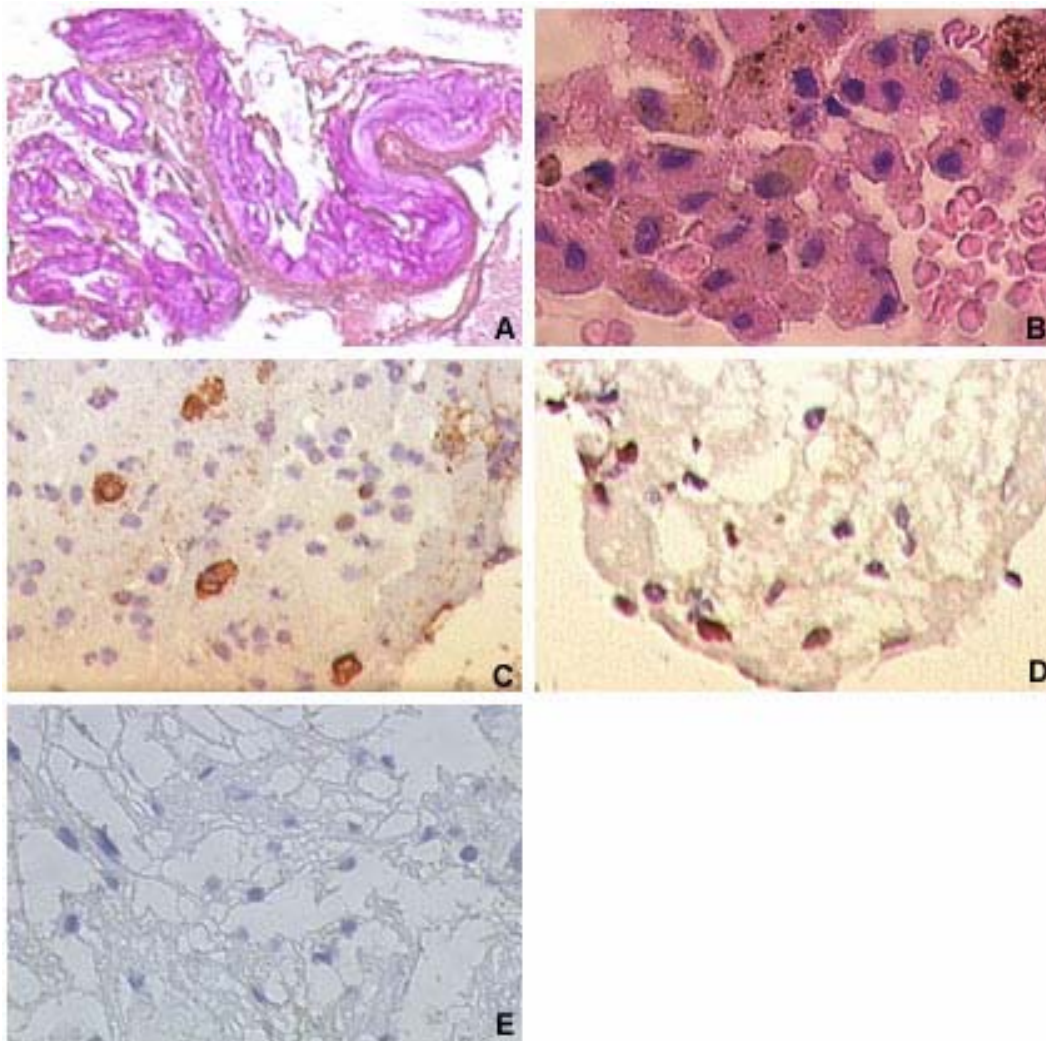


Abb.1: Histologische Bestandteile des aufgefangenen Plaquematerials. (A) nach van-Giesson gefärbtes Kollagen (rot-lila); (B) immunhistochemische Färbung von T-Lymphozyten mit einem Anti-CD3-Antikörper (braun); (C) immunhistochemische Färbung von Makrophagen mit einem Anti-CD68-Antikörper (braun); (D) HE-gefärbte Schaumzellen (randständige basophile Zellkerne mit vakuolisiertem Zytoplasma; (E) HE-gefärbte Fibroblasten (basophile ovale Zellkerne)

### III.3. Vergleichende Genexpressionsanalyse zwischen rupturierter Plaque und stabiler Plaque

53 FilterWire-Proben standen für die Genexpressionsanalyse zur Verfügung, davon gehörten 33 Proben zur RP- und 20 Proben zur SP-Gruppe. Aus dem in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Plaquematerial wurde die mRNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Die markierte cDNA wurde auf jeweils drei cDNA-Arrays hybridisiert. Pro Probe wurden 2387 bekannte Gene analysiert. Lediglich 36% ( $n=19$ ) der 53 Proben konnten erfolgreich in cDNA umgeschrieben werden, und 19% ( $n=5$  RP,  $n=5$  SP) konnten danach erfolgreich auf die

cDNA-Arrays hybridisiert werden. Abbildung 2 zeigt beispielhaft jeweils einen hybridisierten Array der RP- und der SP-Gruppe.

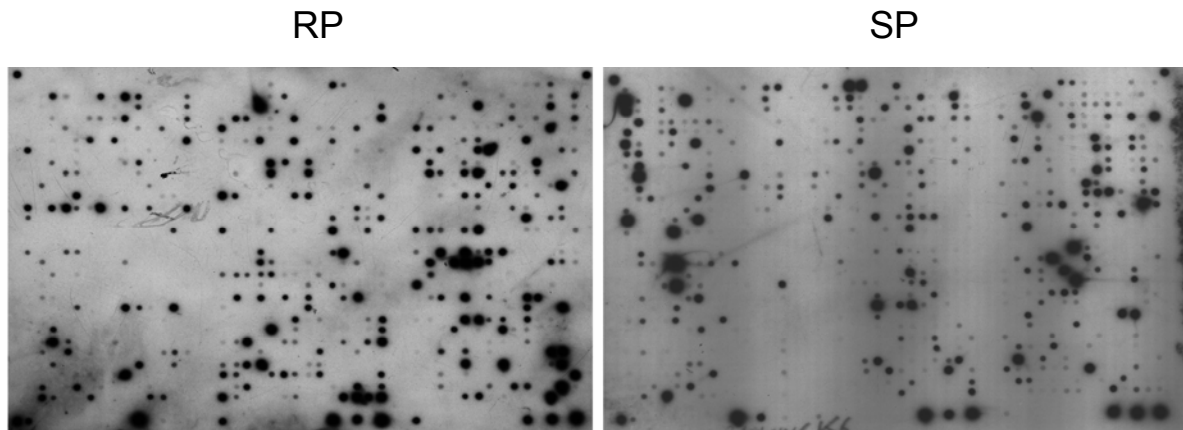


Abb.2: Beispielhaftes Ergebnis hybridisierter cDNA-Arrays (Human Cancer 1.2, Clontech) mit einer cDNA der RP- und der SP-Gruppe.

Spots der Housekeeping Gene zeigten durchweg gleich starke Signalintensitäten, ähnlich wie Spots der humanen genomischen DNA, die als Positivkontrolle dienten. Dagegen zeigten die Negativkontrollen kein Signal. Die Genexpressionsergebnisse der RP-Gruppe wurden mit Ergebnissen der SP-Gruppe verglichen. Der statistische Vergleich ergab 89 Gene, die zwischen der RP- und der SP-Gruppe differentiell exprimiert waren. Alle 89 Gene waren in der RP hochreguliert. Es wurden keine Gene gefunden, die im Vergleich zur SP in der RP herunter reguliert waren.

### III.3.1. Regulation von Transkriptionsfaktoren in der rupturierten Plaque

Von den insgesamt 89 in der RP hochregulierten Genen konnten 14 Gene in die Gruppe der Transkriptionsfaktoren eingeordnet werden (s. Abb.3). Einige dieser Transkriptionsfaktoren spielen eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen, so die p65-Untereinheit von NF $\kappa$ B, die DNA-binding-subunit von NF $\kappa$ B, interferon regulatory factor-1 (IRF-1) und interferon-regulatory-factor-3 (IRF-3). Des Weiteren waren nukleäre Rezeptoren wie estrogen-related-receptor-alpha, nuclear-receptor-related 1, retinoic acid receptor alpha und beta (RXR- $\alpha$  und - $\beta$ ) vertreten. Darüber hinaus waren die Transkriptionsfaktoren CHD-3, R $\kappa$ B DNA-binding protein (R $\kappa$ B), myocyte-specific enhancer factor 2B (MEF2B), phospholipase A2, cellular nucleic acid binding protein (CNBP), DNA-binding protein TAXREB302 und tristetraproline (TTP) in der RP hochreguliert.

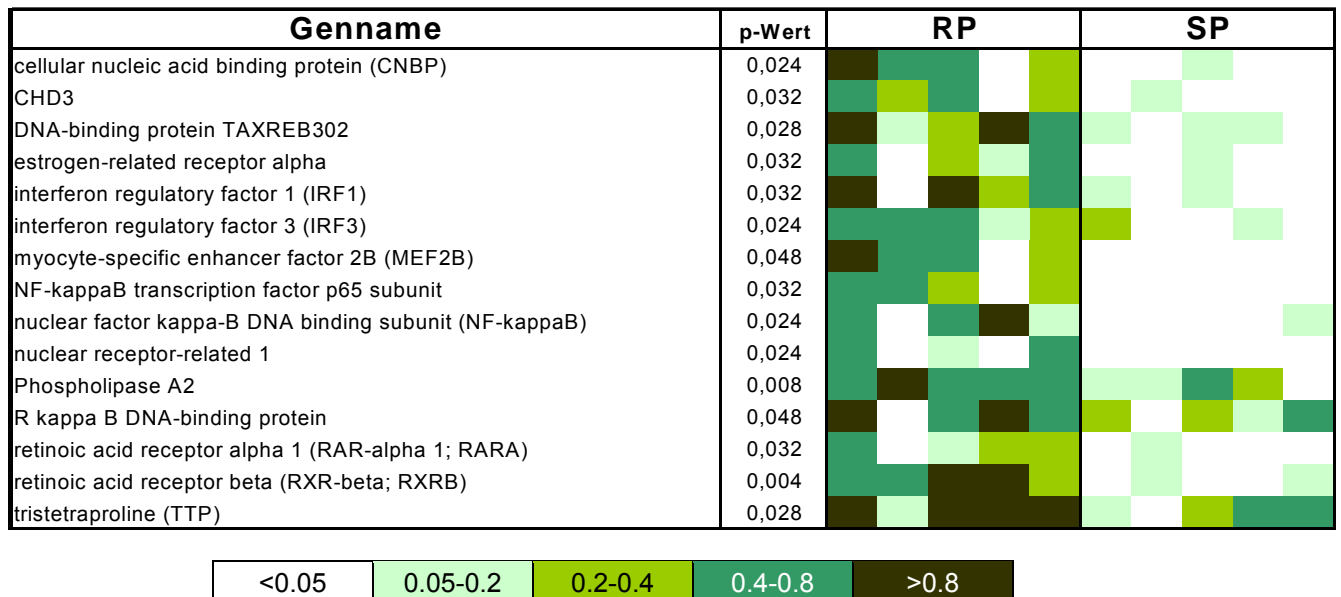


Abb. 3: Differentielle Expression von Transkriptionsfaktoren zwischen der RP- und der SP-Gruppe. Jede Zeile entspricht den Genexpressionswerten eines Gens, jede farbige Spalte entspricht den Genexpressionswerten einer Probe. Dunkle Farben stehen für eine hohe Signalintensität auf den cDNA-Arrays, wie es unterhalb der Abbildung dargestellt ist.

### III.3.2. Regulation von apoptoseassoziierten Genen in der rupturierten Plaque

Unter den 89 in der RP hochregulierten Genen fällt eine große Gruppe auf, die an Apoptose beteiligt ist (s. Abb.4). TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), TNF-type-1-receptor-associated-factor-1 (TRAF-1), TNF-receptor-1 (TNFR-1) und TNF-receptor-2 (TNFR-2) gehören zur TNF-Familie, die hauptsächlich apoptotische Funktionen besitzt. In diese Gruppe von TNF-Mitgliedern kann das fas-associated death domain protein (FADD) dazugezählt werden, da dieses Protein als universales Adapterprotein für alle death-domain-enthaltenden Mitglieder der TNF-Rezeptoren dient und über die Kaspase-Kaskade zur Apoptose führt (Hsu et al., 1996).

Als pro-apoptotische Proteine gelten NIP3, PDCD und die Protein Phosphatase 2C alpha und gamma. Die Protein Phosphatase 2C alpha hemmt die Zellteilung in der G2/M-Phase und aktiviert den p53-Transduktionsweg, der zur Apoptose führt (Ofek et al., 2003). Das Onkogen Akt-1, das durch PDGF aktiviert wird, führt zur Phosphorylierung und Inaktivierung von Komponenten der apoptotischen Maschinerie (z.B. BAD).

Aus der bcl-Familie waren BAD und bcl-2A1 in der RP hochreguliert. BAD gehört zu den pro-apoptotischen und Bcl-2A1 zu den anti-apoptotischen Mitgliedern dieser Gen-Familie (Yang and Korsmeyer, 1996). Gleichmaßen besitzen die atrial natriuretic peptide receptors A und B (ANPB, ANPB) sowohl apoptotische als auch proliferative Funktion.

Genname	p-Wert	RP	SP
atrial natriuretic peptide receptor A precursor (ANPA)	0,024		
atrial natriuretic peptide receptor B precursor (ANPB)	0,024		
BAD protein	0,048		
BCL-2-related protein A1 (BCL2A1)	0,044		
caspase-10 precursor (CASP10)	0,028		
NIP3 (NIP3)	0,024		
PDCD2	0,024		
protein phosphatase 2C alpha isoform (PP2C-alpha)	0,024		
protein phosphatase 2C gamma	0,048		
rac-alpha serine/threonine kinase (rac-PK-alpha); akt1	0,032		
TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)	0,024		
tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2)	0,028		
tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)	0,008		
tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein (TRAP1)	0,024		

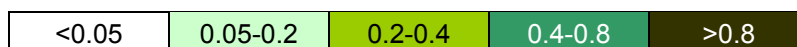


Abb. 4: Expression von differentiell exprimierten Genen zwischen der RP- und der SP-Gruppe, die an apoptotischer Regulation beteiligt sind. Jede Zeile entspricht den Genexpressionswerten eines Gens, jede farbige Spalte entspricht den Genexpressionswerten einer Probe. Dunkle Farben stehen für eine hohe Signalintensität auf den cDNA-Arrays, wie es unterhalb der Abbildung dargestellt ist.

### III.3.3. Regulation von proliferationsassoziierten Genen in der rupturierten

#### Plaques

Zwei Rezeptoren aus der Familie der Eph-Rezeptoren (Ephrin A receptor 4, Ephrin A receptor 1) und ein Ephrin-Ligand (Ephrin A4) waren in der RP hochreguliert. Die Eph-Rezeptoren sind die größte bisher bekannte Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und spielen eine Rolle bei Proliferation, Zell-Zell-Interaktion und der Angiogenese (Drescher, 1997; Tuzi und Gullick, 1994; Klein, 2001).

Neben der Ephrin-Gen-Familie lassen sich funktionell ähnliche Gene zusammenfassen. So sind der platelet-derived growth factor A subunit precursor (PDGF-A), der interleukin-3 receptor beta subunit precursor (IL-3R-beta), der epidermal growth factor receptor (EGFR) und der Wachstumsfaktor Neuromedin-B receptor (NMBR) als Mitogene bekannt. IL-3 und PDGF-A vor allem als Mitogene von glatten Muskelzellen (Brizzi et al., 2001; Misiakos et al., 2001). Als weitere Gene mit proliferationsassoziierten Funktionen waren das melanoma growth stimulatory activity protein (GRO), der osteoclast stimulating factor, die 58-kDa inhibitor of the RNA-activated protein kinase und die kleinen G-Proteine RalB GTP-binding protein (RalB) sowie rho GDP dissociation inhibitor 1 (Rho-GDI) in der RP hochreguliert. Die Protein-Kinase-C $\delta$  gehört in die Familie der Phospholipid abhängigen Serin-/Threonine-Kinasen und ist an intrazellulären Signaltransduktionswegen beteiligt, die Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und die Organisation des Zytoskelettes beinhalten (zusammengefasst von Toker, 1998). Die Expression von Nucleobindin (NUC) in



Lymphozyten korreliert mit der Aktivität und der Proliferation von Lymphozyten (Kubota et al., 1998).

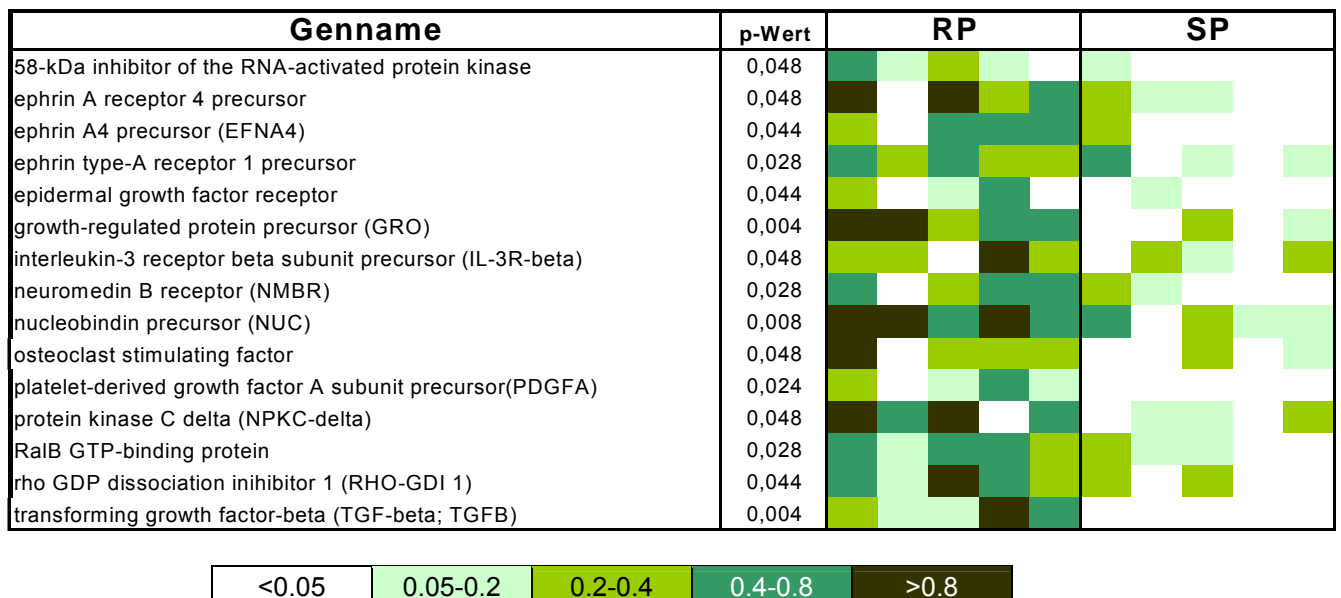


Abb. 5: Expression von differentiell exprimierten Genen zwischen RP- und der SP-Gruppe, die an der Proliferation von Zellen beteiligt sind. Jede Zeile entspricht den Genexpressionswerten eines Gens, jede farbige Spalte entspricht den Genexpressionswerten einer Probe. Dunkle Farben stehen für eine hohe Signalintensität auf den cDNA-Arrays, wie es unterhalb der Abbildung dargestellt ist.

### III.3.4. Regulation von Genen aus dem Bereich des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix und der Adhäsionsmoleküle in der rupturierten Plaque

7 der 89 differentiell exprimierten Gene werden nach ihrer Funktion in eine Gruppe eingeteilt, die der Adhäsion, der Ausbildung der extrazellulären Matrix und des Zytoskeletts dienen (s. Abb.6). Integrin alpha 7 B und L-Selektin sind Adhäsionsmoleküle, die auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert werden, und eine entscheidende Rolle bei der Interaktion zwischen Leukozyten und dem Endothel (z.B. während Entzündungsreaktionen) spielen (Ley et al., 1995).

Mit Funktionen im Bereich des Zytoskeletts waren die Intermediärfilamente Vimentin, Zytokeratin-8 und das transforming protein rhoB (ARHB; ARH6) in der RP hochreguliert. ARHB spielt eine Rolle bei der neoplastischen Transformation und beim Wachstum von Tumorzellen (Tovar et al., 2003).

Aus der Torsin-Genfamilie ist Torsin-A (DYT1) in der RP hochreguliert. Torsin-A beeinflusst zahlreiche Funktionen im Zellstoffwechsel: Biogenese der Zellorganellen, Mikrotubulus-Organisation, Proteolyse und DNA-Replikation (Kamm et al., 2004).

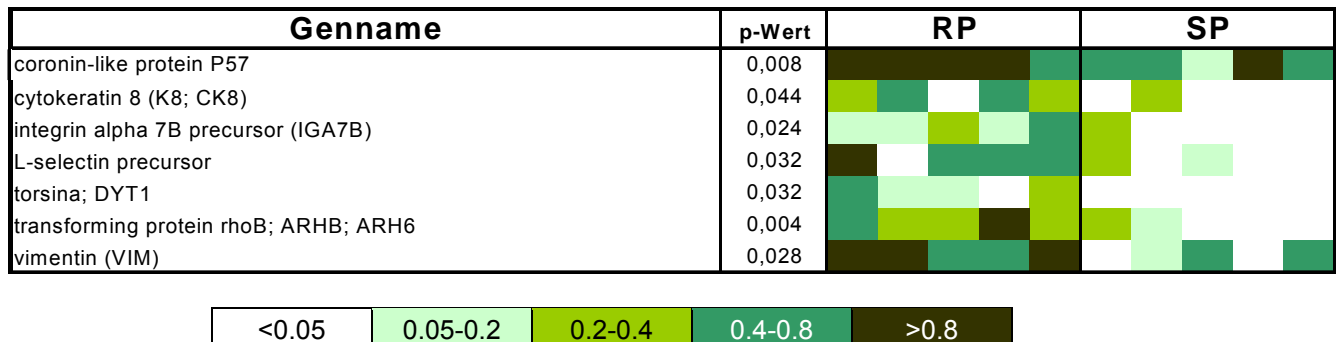


Abb. 6: Expression von differentiell exprimierten Gene zwischen der RP- und der SP-Gruppe aus dem Bereich der Adhäsionsmoleküle, des Zytoskelettes und der extrazellulären Matrix. Jede Zeile entspricht den Genexpressionswerten eines Gens, jede farbige Spalte entspricht den Genexpressionswerten einer Probe. Dunkle Farben stehen für eine hohe Signalintensität auf den cDNA-Arrays, wie es unterhalb der Abbildung dargestellt ist.

### III.3.5. Regulation von proinflammatorischen Genen in der rupturierten Plaque

16 der 89 differentiell exprimierten Genen werden nach ihrer Funktion in eine Gruppe eingeteilt, die inflammatorische Funktionen besitzen (s. Abb.7):

Aus der Familie der Zytokine sind Interleukin-10 (IL-10), die beiden Rezeptoren 1 und 2 von Interleukin-1 (IL-1R1, IL-1R2) und das macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP-2-alpha) in der RP hochreguliert. Als proinflammatorisches Mitglied der TNF-Familie ist Lymphotoxin-β (LT-beta) differentiell exprimiert.

Aus dem Bereich der Blutgerinnung und des Kallikrein-Kinin-Systems sind der Gerinnungsfaktor XII (coagulating factor XII), glandular kallikrein und alpha-2-antiplasmin vertreten. Alpha-2-antiplasmin ist v.a. im Plasma und in Thrombozyten präsent und ist als ein starker Inhibitor der Fibrinolyse bekannt.

Als weitere proinflammatorische Proteine sind der allograft inflammatory factor 1 (AIF1), das Akute-Phase-Protein alpha-1-acid-glycoprotein (orosomucoid) und die Transkriptionsfaktoren myeloid cell nuclear differentiation antigen (MND) und myocyte specific enhancer factor (MEF2B) in der RP hochreguliert. MND spielt eine Rolle in der Granulozyten- und Monozyten-spezifischen Zellantwort auf Interferon und wurde bei Entzündungsreaktionen in aktivierten Makrophagen und Riesenzellen entdeckt (Briggs et al., 1992). Phospholipase C beta 2 ist als Aktivator von Thrombozyten bekannt. Ubiquitin-like-protein spielt eine Rolle in inflammatorischen Prozessen, sowie in Zellwachstum und der Onkogenese (zusammengefasst von Saitoh und Hinchey, 2000). Der leukocyte IgG receptor

(FC-gamma-R) ist an Phagozytose, an der Antikörperproduktion von B-Zellen und an der Abwehr vor fremden Antigenen beteiligt, indem der Rezeptor Antigen-Antikörper-Komplexe aus der Zirkulation entfernt. Das Oberflächenantigen bone marrow stromal antigen 1 (BST-1) zeigt eine erhöhte Expression bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Lee et al., 1996).

Genname	p-Wert	RP				SP			
allograft inflammatory factor 1 (AIF1)	0,044	■	■	■	■	■	■	■	■
alpha-2-antiplasmin	0,024	■	■	■	■	■	■	■	■
bone marrow stromal antigen 1 (BST-1)	0,032	■	■	■	■	■	■	■	■
coagulation factor XII	0,024	■	■	■	■	■	■	■	■
glandular kallikrein	0,024	■	■	■	■	■	■	■	■
interleukin-1 receptor type I precursor (IL-1R1)	0,008	■	■	■	■	■	■	■	■
interleukin-1 receptor type II precursor (IL-1R2)	0,032	■	■	■	■	■	■	■	■
interleukin-10 precursor (IL-10)	0,044	■	■	■	■	■	■	■	■
leukocyte IgG receptor (FC-gamma-R)	0,028	■	■	■	■	■	■	■	■
lymphotoxin-beta (LT-beta; LTB)	0,048	■	■	■	■	■	■	■	■
macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha)	0,032	■	■	■	■	■	■	■	■
myeloid cell nuclear differentiation antigen (MND)	0,004	■	■	■	■	■	■	■	■
orosomuroid 1 (OMD1)	0,004	■	■	■	■	■	■	■	■
phospholipase C beta 2 (PLC-beta 2; PLCB2)	0,032	■	■	■	■	■	■	■	■
ubiquitin-like protein SMT3C	0,032	■	■	■	■	■	■	■	■
urokinase-type plasminogen activator receptor	0,032	■	■	■	■	■	■	■	■

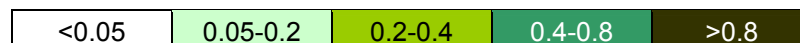


Abb. 7: Expression der differentiell exprimierten Gene zwischen der RP- und der SP-Gruppe, die inflammatorische Funktionen besitzen. Jede Zeile entspricht den Genexpressionswerten eines Gens, jede farbige Spalte entspricht den Genexpressionswerten einer Probe. Dunkle Farben stehen für eine hohe Signalintensität auf den cDNA-Arrays, wie es unterhalb der Abbildung dargestellt ist.

### III.3.6. Hochregulierung von Genen aus dem Bereich DNA-Reparatur, -Replikation, -Transkription und -Translation

Von den 89 differentiell exprimierten Genen gehören 8 Gene in den Bereich von DNA-Reparatur, -Replikation, -Transkription und -Translation (s. Abb.8). Mit Funktionen im Bereich der DNA-Reparatur sind 5 Gene bekannt (DNA excision repair protein ERCC-1, DNA repair protein XRCC9, growth arrest & DNA-damage-inducible protein 153 (GADD153), Ubiquitin-conjugating enzyme E2 17-kDa (UBE2A) und das Xeroderma pigmentosum group B. Aus dem Bereich der Translation ist die aspartyl-tRNA-synthetase (ASPRS), aus dem Bereich der Replikation die 38-kDa- und die 40 kDa-Untereinheit des repliation factor C hochreguliert. Das high mobility group protein HMG2 gehört in die Gruppe der DNA- und Chromatin-bindenden Proteine.

Genname	p-Wert	RP	SP
aspartyl-tRNA synthetase (ASPRS); aspartate-tRNA ligase	0,032		
DNA excision repair protein ERCC1	0,048		
DNA repair protein XRCC9	0,032		
growth arrest & DNA-damage-inducible protein 153 (GADD153)	0,024		
high mobility group protein HMG2	0,048		
Replication factor C 38-kDa subunit (RFC38)	0,004		
Replication factor C 40-kDa subunit (RFC40)	0,004		
ubiquitin-conjugating enzyme E2 17-kDa (UBE2A)	0,008		
Xeroderma pigmentosum group B complementing protein (XPB)	0,032		

<0.05	0.05-0.2	0.2-0.4	0.4-0.8	>0.8
-------	----------	---------	---------	------

Abb. 8: Expression differentiell exprimierter Gene, die Funktionen im Bereich DNA-Reparatur, -Replikation, -Transkription und-Translation besitzen. Jede Zeile entspricht den Genexpressionswerten eines Genes, jede farbige Spalte entspricht den Genexpressionswerten einer Probe. Dunkle Farben stehen für eine hohe Signalintensität auf den cDNA-Arrays, wie es unterhalb der Abbildung dargestellt ist.

### III.3.7. Hochregulierung von Genen mit Funktionen im Bereich von Stoffwechselreaktionen und Andere

Die kleinste Gruppe aus den 89 differentiell exprimierten Genen stellen 4 Gene mit Funktionen in Stoffwechselreaktionen dar (s. Abb.9).

Genname	p-Wert	RP	SP
1,4-alpha-glucan branching enzyme	0,024		
acetyl-CoA acyltransferase (ACAA)	0,024		
microsomal glutathione S-transferase 12 (GST12; MGST1)	0,016		
phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform (PI-TP-alpha)	0,024		

<0.05	0.05-0.2	0.2-0.4	0.4-0.8	>0.8
-------	----------	---------	---------	------

Abb. 9: Expression von differentiell exprimierten Genen, die Funktionen im Bereich des Stoffwechsels besitzen. Jede Zeile entspricht den Genexpressionswerten eines Genes, jede farbige Spalte entspricht den Genexpressionswerten einer Probe. Dunkle Farben stehen für eine hohe Signalintensität auf den cDNA-Arrays, wie es unterhalb der Abbildung dargestellt ist.

Weitere 9 Gene konnten nicht in eine der vorgestellten Gruppen eingeteilt werden und wurden in Abbildung 10 zusammengefasst.

Genname	p-Wert	RP	SP
adenylate cyclase VII	0,032		
Brain-specific tubulin alpha 1 subunit (TUBA1)	0,048		
clone 23815 (Soares library 1NIB from IMAGE Consortium)	0,032		
cytidine deaminase (CDA)	0,048		
G-protein-coupled receptor HM74	0,016		
hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT)	0,024		
lipid-activated protein kinase PRK1	0,016		
placental ribonuclease inhibitor; RNH	0,048		
regulator of G protein signaling 3 (RGS3; RGP3)	0,024		

<0.05	0.05-0.2	0.2-0.4	0.4-0.8	>0.8
-------	----------	---------	---------	------

Abb. 10: Expression von differentiell exprimierten Genen zwischen der RP- und der SP-Gruppe, die in keine übergeordnete Gruppe eingeteilt werden konnten. Jede Zeile entspricht den Genexpressionswerten eines Genes, jede farbige Spalte entspricht den Genexpressionswerten einer Probe. Dunkle Farben stehen für eine hohe Signalintensität auf den cDNA-Arrays, wie es unterhalb der Abbildung dargestellt ist.

### III.3.8. Regulation von NFκB assoziiertem Genexpressionsmuster

In der Gruppe der Transkriptionsfaktoren waren zwei Untereinheiten des Transkriptionsfaktors NFκB hochreguliert. Dazu passend gehörten 15 der 89 in der RP hochregulierten Gene zu den Zielgenen von NFκB (s. Abb.11) (Pahl, 1999). Das bedeutet, dass diese Gene eine NFκB spezifische Promotorregion enthalten und in ihrer Expression durch NFκB aktiviert werden. Zu diesen Genen zählen die proinflammatorischen Gene alpha-1-acid glycoprotein, IRF-1, IL-10, LT-beta, MIP-2, und der Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR). Als NFκB regulierte Gene mit Funktionen in der Apoptose, waren Bcl-2-A1, TRAF-1, die beiden TNF-Rezeptoren TNFR-1 und -2 und TRAIL hochreguliert (zusammengefasst von Pahl, 1999). Der EGFR (Nishi et al., 2003) und die Phospholipase A2 gehören zu den Proliferations-assoziierten Genen. Auch die NFκB-Untereinheit p105 und das Zytokeratin Vimentin gehören zu den NFκB regulierten Genen.

Genname	p-Wert	RP	SP
BCL-2-related protein A1 (BCL2A1)	0,044		
epidermal growth factor receptor	0,044		
growth-regulated protein precursor (GRO)	0,004		
interferon regulatory factor 1 (IRF1)	0,032		
interleukin-10 precursor (IL-10)	0,044		
Lymphotoxin-beta (LT-beta)	0,048		
macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha)	0,032		
nuclear factor kappa-B DNA binding subunit (NF-kappaB; NFKB)	0,004		
orosomucoid 1 (OMD1)	0,004		
Phospholipase A2	0,008		
TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)	0,024		
Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2)	0,028		
Tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein (TRAP1)	0,024		
urokinase-type plasminogen activator receptor	0,032		
Vimentin (VIM)	0,028		

<0.05	0.05-0.2	0.2-0.4	0.4-0.8	>0.8
-------	----------	---------	---------	------

Abb. 11: Expression von differenziell exprimierten Genen, die von NFκB reguliert werden. Jede Zeile entspricht den Genexpressionswerten eines Gens, jede farbige Spalte entspricht den Genexpressionswerten einer Probe. Dunkle Farben stehen für eine hohe Signalintensität auf den cDNA-Arrays, wie es unterhalb der Abbildung dargestellt ist.

Neben den 13 „target genes“ (*engl.*: Zielgene), die von NFκB reguliert werden, fanden sich noch weitere 10 Gene, die an der Aktivierung von NFκB beteiligt sind (s. Abb12). Akt-1 (Kane et al., 1999), EGFR (Nishi et al., 2003), FADD (Schneider et al., 1997), die Guanylate-Cyclase-A und B/ atrial natriuretic peptide receptor A und B precursor (Izumi et al., 2001), L-Selectin (Turutin et al., 2003), PDGF-A (Aizawa et al., 2003), Proteinkinase C delta (Storz et al., 2004), TGF-β (Han et al., 1998), TNFR-1 (Hsu et al., 1996) und TRAIL (Schneider et al., 1997).

Genname	p-Wert	RP	SP
atrial natriuretic peptide receptor A precursor (ANPA)	0,024		
atrial natriuretic peptide receptor B precursor (ANPB)	0,024		
caspase-10 precursor; fas-associated death domain protein (FADD)	0,028		
epidermal growth factor receptor	0,044		
L-selectin precursor	0,032		
platelet-derived growth factor A subunit precursor (PDGFA)	0,024		
protein kinase C delta (NPKC-delta)	0,048		
rac-alpha serine/threonine kinase (rac-PK-alpha); akt1	0,032		
TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)	0,024		
transforming growth factor-beta (TGF-beta)	0,004		

<0.05	0.05-0.2	0.2-0.4	0.4-0.8	>0.8
-------	----------	---------	---------	------

Abb. 12: Expression von differenziell exprimierten Genen, die zu den Aktivatoren von NFκB gehören. Jede Zeile entspricht den Genexpressionswerten eines Gens, jede farbige Spalte entspricht den Genexpressionswerten einer Probe. Dunkle Farben stehen für eine hohe Signalintensität auf den cDNA-Arrays, wie es unterhalb der Abbildung dargestellt ist.

### III.3.9. Dysregulation von Mitgliedern der I $\kappa$ B-Genfamilie in der rupturierten Plaque

Der Vergleich der Genexpressionsanalyse von RP- und SP-Gruppe ergab keine Hochregulierung der I $\kappa$ B Proteine I $\kappa$ B epsilon (IKBE) und B-cell lymphoma 3-encoded protein (bcl-3) (s. Abb.13).

Genname	p-Wert	Infarkt				Angina			
B-cell lymphoma 3-encoded protein (bcl-3)	0,246	■	■	■	■	■	■	■	■
I $\kappa$ appaB epsilon (IKBE)	0,206	■	■	■	■	■	■	■	■

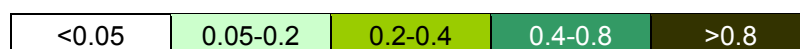


Abb. 13: Expression von Genen, die zur I $\kappa$ B-Familie gehören. Jede Zeile entspricht den Genexpressionswerten eines Genes, jede farbige Spalte entspricht den Genexpressionswerten einer Probe. Dunkle Farben stehen für eine hohe Signalintensität auf den cDNA-Arrays, wie es unterhalb der Abbildung dargestellt ist.

Da das am stärksten NF $\kappa$ B-hemmende I $\kappa$ B Protein I $\kappa$ B $\alpha$  nicht zu den 2386 mittels cDNA-Arrays analysierten Genen gehörte, wurde eine genspezifische PCR für I $\kappa$ B- $\alpha$  durchgeführt. Die PCR ergab, dass auch I $\kappa$ B- $\alpha$  in der RP nicht hochreguliert war (s. Abb.14).

### III.4. Validierung der Daten der cDNA-Arrays mit genspezifischer PCR

Um die Hybridisierungsergebnisse der Genexpressionsanalyse zu validieren, wurde eine genspezifische PCR der cDNA von 4 Genen durchgeführt (s. Abb 14), die in der RP hochreguliert waren: NF $\kappa$ B DNA binding subunit (NF $\kappa$ B), interleukin-1 receptor type II precursor (IL-1R2), rho GDP dissociation inhibitor 1 (RHO-GDI 1) und tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1). Darüber hinaus wurde eine genspezifische PCR für das Gen I $\kappa$ B- $\alpha$  durchgeführt, um die Expression von I $\kappa$ B- $\alpha$  zwischen der RP und der SP zu vergleichen, da I $\kappa$ B- $\alpha$  nicht auf den cDNA-Arrays analysiert worden war.

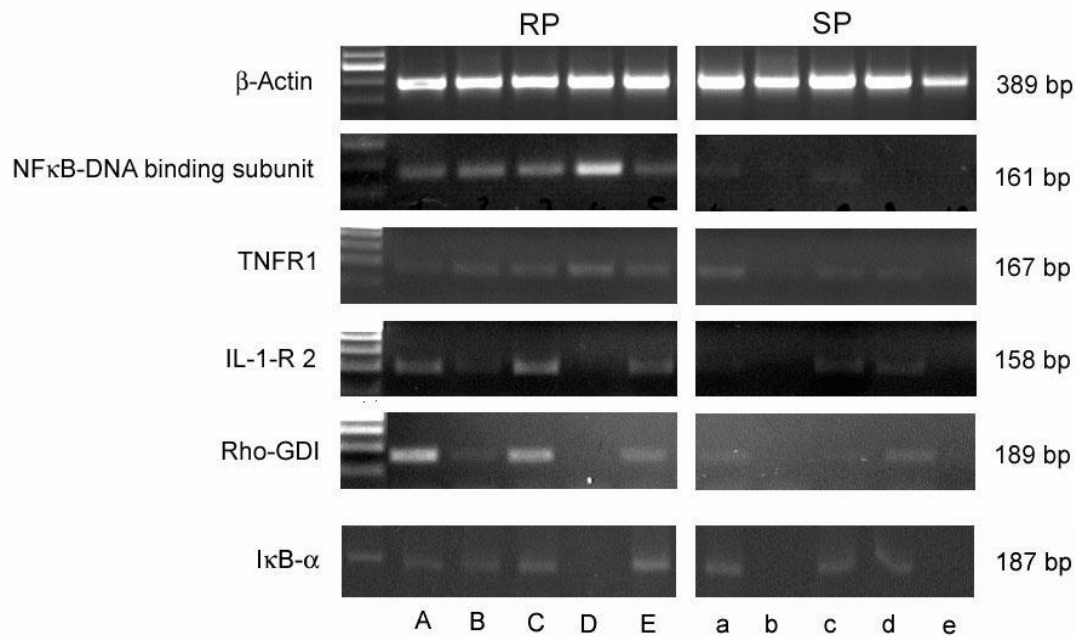


Abb. 14: PCR mit genspezifischen Primern von 4 hochregulierten Genen und von I $\kappa$ B- $\alpha$ , das nicht auf den cDNA-Arrays analysiert worden war. Die Größe der erwarteten PCR-Fragmente ist auf der rechten Seite dargestellt. Die Spalten A bis E entsprechen den Proben der RP, Spalten a bis e die der SP.

### III.5. Immunhistochemischer Nachweis von aktiviertem NF- $\kappa$ B durch Färbung der NF $\kappa$ B-Untereinheit p65

Von den Proben, die bereits mit HE-Färbung, van-Giesson-Färbung und mit immunhistochemischer Färbung (mit CD3 und CD68) analysiert worden waren, wurde jeweils noch eine immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen Mouse-Antikörper (MAB3026, Chemicon) gegen die p65-Untereinheit von NF $\kappa$ B gefärbt (s. Abb.16). Dies diente dem Nachweis von aktiviertem NF $\kappa$ B auf Protein-Ebene.

Von den 6 RP-Proben, die Material enthielten, zeigten 6 Proben braun gefärbtes p65 im Zytoplasma und in den Zellkernen von Granulozyten, Makrophagen und Schaumzellen. Von den 3 Angina-Proben, die Material enthielten, konnte in zwei Proben kein p65 angefärbt werden. Eine Probe der SP-Gruppe zeigte vereinzelt p65-positive Zellen.



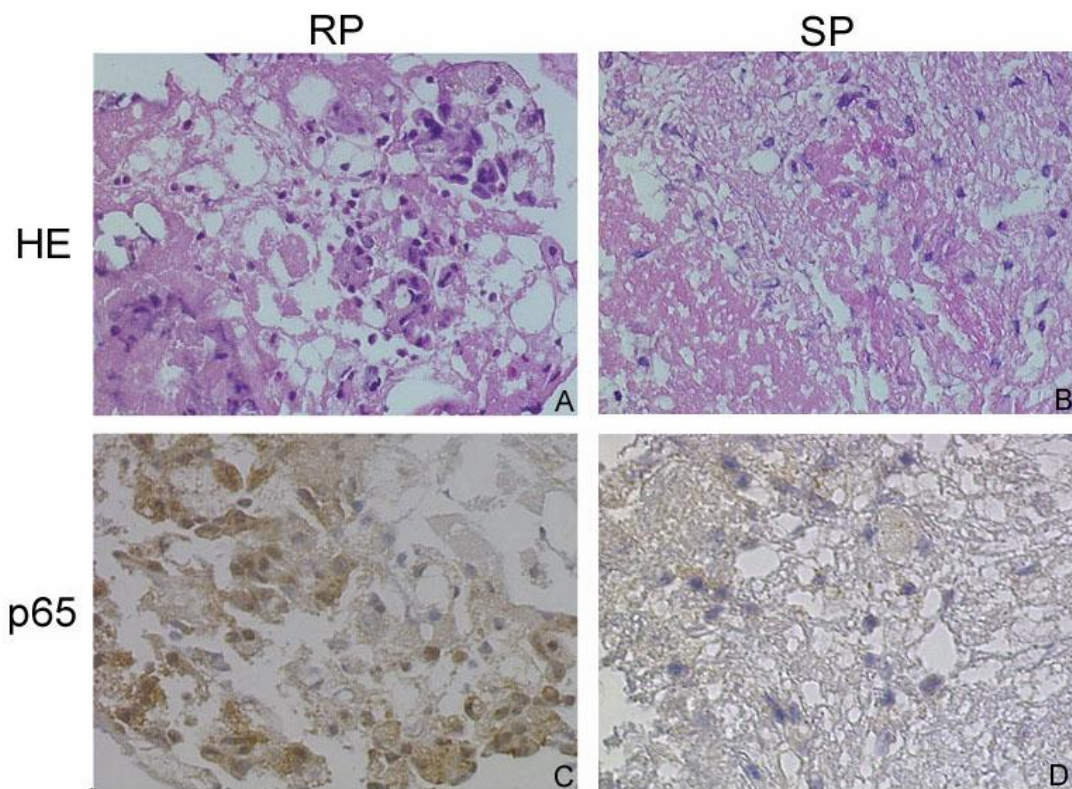


Abb. 16: Die Abbildung zeigt beispielhaft RP und SP, die jeweils mit HE (A,B) und immunohistochemisch (C,D) mit einem p65-Mouse-Antikörper gefärbt wurde. In der RP konnte p65 im Zytosol und im Kern der Zellen nachgewiesen werden (C), dagegen nicht in der SP (D).

## **IV. Diskussion**

Der Begriff „vulnerable Plaque“ bezeichnet einen instabilen verletzlichen Zustand einer atherosklerotischen Plaque, der mit dem Risiko einer Plaqueruptur einhergeht. Die Ursachen und molekularbiologischen Vorgänge, die zu einer Ruptur der vulnerablen Plaque führen können, sind bis heute nicht vollständig geklärt. Eine besondere Schwierigkeit liegt darin, humanes Plaquematerial *in vivo* zu gewinnen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war der Vergleich von Genexpressionsmustern zwischen humaner stabiler Plaque und rupturierter Plaque. Die Genexpressionsanalyse ermöglichte die Identifizierung von differentiell exprimierten Genen, die in der Pathogenese der Plaqueruptur eine Rolle spielen könnten und darüber hinaus als potentielle Ziele neuer therapeutischer Ansätze dienen könnten. Die vorgelegten Ergebnisse erlauben die Hypothese, dass NF $\kappa$ B und der TNF-Signaltransduktionsweg in der Pathogenese der Plaqueruptur eine wichtige Rolle spielen und das Angriffsziel neuer Therapieansätze darstellen können.

### **IV.1. Das FilterWire-System fängt *in vivo* Plaquematerial auf**

Das FilterWire-Protektionssystem ermöglichte es während PTCA humanes Plaquematerial *in vivo* aus Koronararterien aufzufangen. Zur zellulären Charakterisierung des aufgefangenen Materials wurde eine histologische und immunhistochemische Untersuchung von 15 FilterWire-Proben durchgeführt. Hierdurch sollte geklärt werden, ob es sich bei dem aufgefangenen Material um Plaquematerial oder lediglich um thrombotisches Material handelte.

Die histologische und immunhistochemische Untersuchung der FilterWire-Proben wies Schaumzellen, Kollagen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten nach. Diese zellulären Materialkomponenten sind in einem reinen Thrombus nicht vorhanden, sondern sind charakteristische Bestandteile einer atherosklerotischen Plaque: Schaumzellen sind cholesterolbeladene Makrophagen und sind essentieller Bestandteil der Ansammlung aus Lipiden, Entzündungszellen und nekrotischem Material in einer atherosklerotischen Plaque (Ross, 1993). Die fibröse Kappe, die diese Ansammlung aus Lipiden, Entzündungszellen und nekrotischem Material bedeckt, besteht aus glatten Muskelzellen, z.T. aus Fibroblasten, und Kollagen (Newby und Zaltsman, 1999). Frühere Arbeiten anderer Arbeitsgruppen hatten das aufgefangene Material von distalen Protektionssystemen histologisch untersucht und kamen

zu dem Schluss, dass es sich bei dem aufgefangenen Material um Plaquematerial handelt (Grube et al., 2001; Popma et al., 2002). Die vorgelegten Ergebnisse dieser Arbeit entsprechen den Ergebnissen dieser Autoren und lassen den Schluss zu, dass das Ausgangsmaterial für die Genexpressionsanalyse humaner Plaque entsprach.

#### **IV.2. Das Plaquematerial der Infarkt-Patienten kann als rupturierte vulnerable Plaque bezeichnet werden**

Das Plaquematerial der Infarkt-Proben stammte jeweils aus dem Koronargefäß, indem der akute Gefäßverschluss stattgefunden hatte. Da die häufigste Ursache eines akuten Myokardinfarktes die Ruptur einer vulnerablen Plaque ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem aufgefangenen Material der Infarkt-Patienten um rupturierte Plaque handeln muss.

Die 10 SP-Proben stammten von Patienten, die noch nie einen MI erlitten hatten. Dies ließ den Schluss zu, dass das aufgefangene Material der SP-Proben nicht als rupturierte oder vulnerable, sondern als stabile Plaque (SP) angesehen werden konnte.

RP und SP aus humanen Koronar-Gefäßen diene als Ausgangsmaterial für die Identifizierung von Genen, die differentiell zwischen SP und RP exprimiert waren.

8 FilterWire-Proben stammten aus Venengraft-Gefäßen. Die restlichen 16 Proben stammten aus nativen Koronararterien. Es ist bekannt, dass die zelluläre Zusammensetzung von atherosklerotischer Plaque in Venengraft-Gefäßen und in nativen Gefäßen sich sehr ähnelt. Lediglich in der höheren Quantität an T-Lymphozyten und Makrophagen und in der Schnelligkeit der Entzündungsreaktion unterscheidet sich die Plaque in Venengraft-Gefäßen von Plaque in nativen Gefäßen (van der Wal et al., 1992). Da jedoch alle Venengraft-Gefäße vor 7 bis 20 Jahren implantiert worden sind, kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei nicht um eine kurzfristige atherosklerotische Veränderung der Gefäßwand handeln kann. Daraus und aus der Tatsache, dass sich die Materialkomponenten der aus nativen und Venengraft-Gefäßen gewonnen Proben in ihrem histologischen Aspekt entsprachen, konnte geschlossen werden, dass die FilterWire- Proben aus Venengraft-Gefäßen den FilterWire-Proben aus nativen Gefäßen gleichgestellt werden konnten.

### **IV.3. Kandidaten-Gene, die zu Neovaskularisation und zu verminderten Zell-Zell-Kontakten führen**

Unter den 89 in der RP hochregulierten Genen gehörten GRO-1, IL-3R-beta, TGF- $\beta$  und 3 Mitglieder der Ephrin-Familie (EphA4-Rezeptor, EphA1-Rezeptor und EphA4-Ligand). Diese Gene könnten über

- (1) die Verminderung von Zell-Zell-Kontakten und/oder
- (2) die Induktion von Neovaskularisationen (Gefäßneubildungen) zur Instabilität einer Plaque beitragen.

Die Eph-Familie stellt eine der größten Subfamilien der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren dar (Tuzi und Gullik, 1994) und spielt eine Rolle in Zell-Zell-Interaktion und in der Angiogenese (Tuzi und Gullik, 1994; Klein, 2001). In vielen Tumoren wurde eine Hochregulierung von Eph-Rezeptoren und/oder Ephrin-Liganden nachgewiesen (zusammengefasst von Bogenrieder und Herlyn, 2003). Diese Hochregulierung führt zu verminderten Zell-Zell-Kontakten, was eine Rolle in der Entstehung von Metastasen spielt (zusammengefasst von Cheng et al., 2002). Auch von GRO-1 wird eine Beteiligung an der Metastasierung von Tumoren angenommen (Shintani et al., 2004). In der Pathogenese der RP könnten Ephrine und GRO-1 so über die Induktion verminderter Zell-Zell-Kontakte zu einer Lockerung der Zellverbände führen und damit zur Instabilität der Plaque und somit zur Plaqueruptur beitragen.

Neben der Verminderung von Zell-Zell-Kontakten sollen die Ephrine und GRO-1 Einfluss auf Neovaskularisationen, z.B. in Tumoren, nehmen (Brantley et al., 2002; Shintani et al., 2004). Auch von IL-3 und TGF- $\beta$  ist bekannt, dass sie zu Neovaskularisationen führen können, indem sie die Expression des Wachstumsfaktors VEGF induzieren (Brizzi et al., 2001; Dentelli et al., 1999; Naginei et al., 2003). Die Hochregulierung dieser Gene erlaubt die Hypothese, dass sie zur Neubildung von Gefäßen in einer atherosklerotischen Plaque führen könnten. Da neu gebildete Gefäße sehr fragil sind, kann es durch Ruptur dieser fragilen Gefäße zur Einblutung in die Plaque kommen. Eine Einblutung in die Plaque gilt als eine der wichtigsten Ursachen für Plaque-Instabilität bzw. -Ruptur (de Boer et al., 1999).

Diese Überlegungen legen nahe, dass Ephrine, GRO-1, IL-3R-beta und TGF- $\beta$  über die Induktion verminderter Zell-Zell-Kontakte und Neovaskularisationen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Plaqueruptur spielen.

#### IV.4. Kandidaten-Gene, die zu Proliferation und Apoptose beitragen

Zur besseren Übersicht wurden die 89 differentiell exprimierten Gene in Funktionsgruppen eingeteilt. Der größte Teil übt proliferative und apoptotische Funktionen aus. Zu den proliferationsassoziierten Genen gehören der EGFR, PDGF-A und TGF- $\beta$ . Als proliferative Wachstumsfaktoren bewirken sie, dass Zellen aus der G<sub>0</sub>- in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus übergehen. Insbesondere ist ihre proliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen nachgewiesen (Kawakami et al., 2003; Nakata et al., 1996; Misiakos et al., 2001; Stouffer und Owens, 1994). Die Proliferation von glatten Muskelzellen dient in der Anfangsphase einer atherosklerotischen Läsion dem Aufbau der fibrösen Kappe und trägt entscheidend zur Stabilität einer Plaque bei. Die Hochregulierung von EGFR, PDGF-A und TGF- $\beta$  in der RP lässt vermuten, dass diese Gene in der vulnerablen Plaque die Proliferation von glatten Muskelzellen induzieren. Dies könnte der Stabilisierung der Plaque dienen bzw. einen Gegenpol für die instabilisierenden Kräfte in einer vulnerablen Plaque darstellen.

Als zweite große Gruppe waren Gene mit apoptotischer Funktion hochreguliert: Darunter befanden sich zwei Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie (TNFR-1 und TNFR-2) und zwei Mitglieder der TNF-Familie (TRAIL und TRAF-1) mit apoptotischer Wirkung (Ashkenazi und Dixit, 1998; Vandenabeele et al., 1992; Vicat et al., 2003).

Es ist bekannt, dass Apoptose einen Schlüsselmechanismus in der Pathogenese der vulnerablen Plaque darstellt (Kockx, 1998). Die Induktion der Expression pro-apoptotischer Gene könnte einen molekularen Mechanismus darstellen, der zu vermehrter Apoptose in der vulnerablen Plaque beiträgt.

TRAIL wird von den meisten Geweben exprimiert und löst Apoptose lediglich in transformierten Zellen und Tumorzellen aus, nicht aber in gesunden Zellen (Baker und Reddy, 1996). In einer Plaque kann, wegen des hohen Gehaltes an entzündlichen und nekrotischen Zellen, davon ausgegangen werden, dass TRAIL Apoptose induziert. Unter den 89 hochregulierten Genen ist der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B vertreten, von dem bekannt ist, dass er die TRAIL vermittelte Apoptose noch verstärkt (Chen et al., 2003). Die Tatsache, dass es zu Apoptose kommt, wenn beide TNF-Rezeptoren (TNFR-1 und -2) hochreguliert sind (Lazdins et al., 1997), legt die Vermutung nahe, dass TNFR-1 und -2 in der vulnerablen Plaque Apoptose induzieren. FADD ist ein gemeinsames Adapterprotein für viele Mitglieder der TNF-Rezeptoren, das unmittelbar die Kaspase-Kaskade einleitet und damit einen Teil der apoptotischen Endstrecke darstellt (Hsu et al., 1996).

In der RP sind einerseits Gene mit apoptotischer Wirkung hochreguliert und andererseits Gene mit proliferativer Wirkung. Es ist anzunehmen, dass Apoptose in der Pathogenese der RP für die Destabilisierung der Plaque verantwortlich ist. Die Proliferation hingegen könnte ein Mechanismus sein, der dieser Destabilisierung entgegen zu wirken sucht. Die Kombination aus Proliferation mit überschießender Materialzunahme auf der einen Seite und Apoptose, insbesondere mit Ausdünnung der fibrösen Kappe, auf der anderen Seite könnte zur Ruptur der Plaque führen.

#### **IV.5. Die Aktivierung von NFκB in der Plaque führt zu einem NFκB assoziierten Genexpressionsmuster**

Die Rolle von NFκB in der Pathogenese der Atherosklerose ist in den letzten Jahren vielseitig diskutiert worden. Aktiviertes NFκB konnte in glatten Muskelzellen, Makrophagen und Endothelzellen von atherosklerotischer Plaque nachgewiesen werden (Brand et al., 1996) und wurde als Initiator einer atherosklerotischen Läsion beschrieben (Collins, 1993). Durch immunhistochemische Anfärbung konnte eine erhöhte Aktivität von NFκB in Plaque von Patienten mit instabiler AP nachgewiesen werden, im Vergleich zu Plaque von Patienten mit stabiler AP (Wilson et al., 2002). Auch systemisch konnte eine erhöhte Aktivität von NFκB im Blut von Patienten mit instabiler Angina pectoris mithilfe von electromobility shift assays (EMSAs) gezeigt werden (Ritchie, 1999).

Schwierigkeiten bei der Interpretation dieser Arbeiten stellen die Begriffe „stabile“ und „instabile“ AP dar, da sie auf einer rein klinischen Einteilung beruhen. Dies macht eine Interpretation der Ergebnisse auf morphologischer und pathogenetischer Ebene schwierig. Die hier vorliegende Arbeit hingegen besitzt demgegenüber einige Vorteile: das untersuchte humane Plaquematerial wurde in vivo gewonnen und konnte anhand klinischer und zeitlich bezogener Daten klar charakterisiert werden. Die Gewinnung des Plaquematerials direkt im akuten MI erlaubte eine übersichtliche Abgrenzung zu Plaquematerial von Patienten, die noch nie einen MI erlitten hatten.

Die bisher veröffentlichte Literatur zur Rolle von NFκB in der Atherosklerose bezieht sich hauptsächlich auf die Bildungsphase einer atherosklerotischen Plaque. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit erlaubten jedoch die Hypothese, dass NFκB in der vulnerablen Phase einer atherosklerotischen Plaque eine entscheidende Rolle einnimmt, da NFκB in der RP auf mRNA- und Protein-Ebene aktiviert war.

Um die Hochregulierung auf Proteine-Ebene zu bestätigen wurde eine immunhistochemische Anfärbung der p65-Untereinheit in RP und SP durchgeführt. Die Ergebnisse der Immunhistochemie zeigten, dass NFκB im Zytoplasma und in den Zellkernen der Zellen aus RP markiert war. Die Präsenz von NFκB in den Zellkernen erlaubte die Schlußfolgerung, dass NFκB aktiviert sein musste. Denn nur aktiviertes NFκB ist in der Lage, in den Kern einer Zelle zu translozieren und dort an die DNA zu binden (Ghosh and Baltimore, 1990). Diese Aktivierung von NFκB spiegelt sich auch in den 89 hochregulierten Genen wieder, indem 15 der 89 differentiell exprimierten Gene zu den NFκB-regulierten Genen gezählt werden. Das bedeutet, dass diese Gene eine NFκB spezifische Promotorregion enthalten und in ihrer Expression durch NFκB aktiviert werden. Bemerkenswert ist, dass sich diese Gene komplett von dem bisher in der Initiation der Atherosklerose beschriebenen Genexpressionsmuster unterscheiden. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass die Hochregulierung des in dieser Arbeit beschriebenen Genexpressionsmusters in der vulnerablen Phase und nicht in der initialen Phase der atherosklerotischen Plaque stattfand. Die beschriebenen hochregulierten NFκB-abhängigen Gene üben hauptsächlich Funktionen bei Entzündung, Apoptose und Proliferation aus.

Die Hochregulierung der pro-inflammatorischen Gene LT-beta, MIP2-alpha, Orosomuroid, Phospholipase A2 und des uPAR durch NFκB lässt vermuten, dass NFκB über diese Gene zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion in der vulnerablen Plaque beiträgt. Von Orosomuroid ist bereits bekannt, dass ein erhöhter Plasmalevel an Orosomuroid positiv mit dem Risiko für einen akuten MI korreliert. Darüber hinaus wird Orosomuroid als Marker diskutiert, der das Erkrankungsrisiko für einen akuten MI anzeigen könnte (Lind et al., 2001) Die Phospholipase A2 wird in Verbindung mit der Atherosklerose als ein wichtiger Mediator der Entzündungsreaktion diskutiert (Niessen et al., 2003). Patienten mit KHK zeigen einen erhöhten Plasmalevel an Phospholipase A2, der mit dem CRP-Level und anderen Risikofaktoren korreliert und als Risikofaktor für ein akutes koronares Ereignis gilt (Kugiyama et al., 1999). Der uPAR reguliert die Adhäsion von Monozyten an das Gefäßendothel durch direkte Verbindung von Vitronectin an Integrine. Es konnte eine erhöhte Expression von uPAR in Monozyten bei akutem MI im Vergleich zu stabiler AP nachgewiesen werden (May et al., 2002).

Die Hochregulierung der NFκB regulierten Gene TNFR-2, TRAF-1 und TRAIL legen die Hypothese nahe, dass NFκB über diesen Weg Apoptose in atherosklerotischer Plaque initiieren könnte. Dies würde einen entscheidenden Beitrag zur Vulnerabilität der Plaque darstellen. Bisher wurde eine pro-apoptotische Funktion von NFκB in humanen

Endothelzellen diskutiert, indem eine Aktivierung von NF $\kappa$ B über den p53-Signaltransduktionsweg programmierten Zelltod in Endothelzellen hervorrufen kann (Aoki et al., 2001).

Die hochregulierten proliferationsassoziierten Gene GRO-1 und EGFR gehören ebenfalls zu den NF $\kappa$ B regulierten Genen. Wie bereits in Abschnitt IV.4. ausgeführt, könnte eine vermehrte Proliferation von glatten Muskelzellen durch EGFR in Kombination mit apoptotischen Vorgängen ein destabilisierendes Moment in der Plaque darstellen. Über die Hochregulierung von GRO-1 in der Plaque könnte NF $\kappa$ B zu Neovaskularisationen und zu verminderten Zell-Zell-Kontakten führen, was die Instabilität und Vulnerabilität der Plaque weiter erhöhen würde.

Zu den 89 hochregulierten Genen gehören weitere 10 Gene, die zu den Aktivatoren von NF $\kappa$ B gezählt werden. Die 15 NF $\kappa$ B-regulierten Gene und die 10 Aktivatoren von NF $\kappa$ B machen einen Anteil von ca. 30% der hochregulierten Gene aus und können zusammen als NF $\kappa$ B- assoziiertes Genexpressionsmuster bezeichnet werden.

Die Aktivierung von NF $\kappa$ B im fortgeschrittenen Stadium einer atherosklerotischen Plaque könnte zur Hochregulierung eines NF $\kappa$ B regulierten Genexpressionsmusters führen. Die Hochregulierung von proinflammatorischen, proapoptotischen und proliferationsassoziierten Genen durch NF $\kappa$ B könnte entscheidend sein für die Entwicklung einer instabilen vulnerablen Plaque.

#### **IV.6. Dysregulation von NF $\kappa$ B als möglicher Mechanismus, der zur Vulnerabilität und Ruptur der Plaque führt**

Ein interessanter Aspekt an den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse war, dass keines der analysierten Mitglieder der I $\kappa$ B-Familie hochreguliert war: weder I $\kappa$ B- $\alpha$  noch I $\kappa$ B- $\epsilon$  noch BCL3 waren in der RP hochreguliert. Die Hochregulierung von NF $\kappa$ B in der RP hätte eine Hochregulierung der I $\kappa$ B-Proteine erwarten lassen, da I $\kappa$ B in einem Regelkreis als physiologischer Inhibitor von NF $\kappa$ B fungiert (Ghosh und Baltimore, 1990).

Sobald NF $\kappa$ B in den Zellkern transloziert ist, werden I $\kappa$ B-Proteine vermehrt exprimiert. NF $\kappa$ B selbst führt zu einer Hochregulierung von I $\kappa$ B- $\alpha$ , das in seinem Promotor eine „NF $\kappa$ B binding site“ enthält (Sun et al., 1993). Die I $\kappa$ B-Proteine translozieren dann ebenfalls in den Zellkern und inaktivieren NF $\kappa$ B (Zabel und Baeuerle, 1990). Im Komplex an I $\kappa$ B gebunden wird NF $\kappa$ B zurück ins Zytosol transportiert, wo der Transkriptionsfaktor in inaktivem Zustand verbleibt bis durch die Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Proteine eine neue Aktivierung



von NFκB eingeleitet wird. Durch diesen Regelkreis wird die Aktivität von NFκB in Grenzen gehalten.

Die Tatsache, dass IκB-α und -ε, als stärkste Inhibitoren von NFκB, in der RP nicht hochreguliert waren, legt die Hypothese nahe, dass dieser Regelkreis gestört sein muss, indem die Aktivität von NFκB nicht gehemmt wird und es damit zu einer Dysregulation von NFκB gekommen ist.

In der atherosklerotischen Plaque führt eine Aktivierung von NFκB zur Hochregulierung von Genen mit Funktionen bei Entzündung, Apoptose und Proliferation. Dies könnte durch eine Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion und durch die Initiation von sowohl apoptotischen als auch proliferativen Wirkungen entscheidend zur Vulnerabilität einer Plaque beitragen. Fällt die limitierende Wirkung der IκB-Proteine weg, würde dies in einer ungehemmten Bindung von NFκB an die DNA enden, was zu einer chronischen Hochregulierung des NFκB-assoziierten Genexpressionsmusters und einem Circulus vitiosus führen würde. Die Dysregulation von NFκB könnte demnach ein Schlüsselereignis in der Pathogenese der Plaqueruptur darstellen.

#### **IV.7. Der TNF-Signaltransduktionsweg und die Aktivierung von NFκB**

Unter den 89 hochregulierten Genen in der RP war die TNF-Familie stark vertreten: beide TNF-Rezeptoren (TNFR-1, TNFR-2), LT-beta, TRAF-1 und TRAIL. Dazu passend war das TNF-assoziierte Adapterprotein FADD in der RP hochreguliert. Die Hochregulierung dieser vor allem apoptoseassoziierten Mitglieder der TNF-Familie erlaubte die Hypothese, dass über die beiden TNF-Rezeptoren, über TRAIL und FADD Apoptose in der atherosklerotischen Plaque induziert wird. Neben der proapoptotischen Wirkung der TNF-Familie sind zahlreiche Verbindungen zwischen Mitgliedern der TNF-Familie und dem Transkriptionsfaktor NFκB bekannt. So reguliert NFκB die Expression von LT-beta, TNFR-2, TRAF-1 und TRAIL (zusammengefasst von Pahl, 1999). Auf der anderen Seite aktiviert TNF-α über die TNF-Rezeptoren wiederum NFκB (Legler et al., 2003) und gilt als einer der stärksten Aktivatoren von NFκB (Osborn et al., 1989).

Das Zytokin TNF-α ist das wichtigste und bekannteste Mitglied der TNF-Familie und vermittelt über zahlreiche TNF-Rezeptoren seine Wirkungen in Apoptose, Zytotoxizität und Proliferation (Tartaglia et al., 1993; Haridas et al., 1998; Ashkenazi und Dixit, 1998). TNF-α wurde während allen Stadien der Atherosklerose in glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Mastzellen nachgewiesen (Barath et al., 1990; Kaartinen et al., 1996). Darüber hinaus weisen

Patienten mit akutem MI einen erhöhten Level an TNF- $\alpha$  im Serum vor (Lissoni et al., 1992). Das erhöhte TNF- $\alpha$  im Serum der Infarkt-Patienten könnte über die lokal in der Plaque hochregulierten TNF-Rezeptoren und Mitglieder der TNF-Familie zu einer NF $\kappa$ B-Aktivierung führen, ohne selbst in der Plaque hochreguliert zu sein. Aktiviertes NF $\kappa$ B wiederum könnte durch die Hochregulierung von TNFR-2 und TRAF-1 zu einer Sensitivierung der Zellen für TNF- $\alpha$  in der Plaque führen, was die Aktivierung von NF $\kappa$ B wieder verstärken würde.

Über die folgenden drei Wege könnte NF $\kappa$ B durch TNF- $\alpha$  im Serum und Mitglieder der TNF-Gen-Familie in der Plaque aktiviert werden:

- Da bekannt ist, dass TNF- $\alpha$  insbesondere über TNFR-1 NF $\kappa$ B aktiviert, indem I $\kappa$ B-Proteine phosphoryliert werden (Legler et al., 2003; Chen et Goeddel., 2002), könnte TNF- $\alpha$  über diesen Weg NF $\kappa$ B in der atherosklerotischen Plaque aktivieren.
- Über TRAF-1 vermittelt TNF- $\alpha$  eine Aktivierung von NF $\kappa$ B. Das aktivierte TRAF-1 verbindet als Adapterprotein Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie mit dem IL-1 Rezeptor und führt über diesen Weg ebenfalls zur Aktivierung von NF $\kappa$ B (Schwenzer et al., 1999). Diese These wird dadurch unterstützt, dass neben TRAF-1 und den beiden TNF-Rezeptoren auch beide IL-1-Rezeptoren (IL-1R-1 und -2) in der RP hochreguliert waren.
- Unabhängig von TNF- $\alpha$  ist TRAIL in der Lage in Kooperation mit FADD NF $\kappa$ B zu aktivieren (Schneider et al., 1997). Sowohl TRAIL als auch FADD waren in der RP hochreguliert. Im Vergleich zu TNF- $\alpha$  ist die Aktivierung von NF $\kappa$ B durch TRAIL jedoch nicht so effektiv und schnell (Secchiero et al., 2003).

#### **IV.8. Klinische Relevanz und therapeutische Ansätze**

Diese Arbeit ermöglichte es, Gene zu identifizieren, die als potentielle Ziele einer präventiven Therapie der Plaqueruptur dienen könnten.

Ein solches therapeutisches Ziel-Gen könnte der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit erlauben die Hypothese, dass NF $\kappa$ B in der RP aktiviert ist und zur Hochregulierung eines NF $\kappa$ B spezifischen Genexpressionsmusters geführt hat. Die hochregulierten Gene mit proinflammatorischen, apoptotischen und proliferativen Wirkungen könnten entscheidend zur Ruptur der vulnerablen Plaque beitragen. Die fehlende Hochregulierung der I $\kappa$ B-Proteine läßt vermuten, dass es zu einer Dysregulation von NF $\kappa$ B und einer ungehemmten Aktivität von NF $\kappa$ B gekommen sein musste. Ein therapeutisches

Eingreifen müsste demnach am Beginn dieser Kaskade ansetzen, um die Hochregulierung der Gene zu verhindern, die durch Entzündung, Apoptose und Proliferation zur Vulnerabilität bis hin zur Ruptur der Plaque führen könnten. Ziel wäre es demnach, den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B in seiner Aktivität zu hemmen. Eine solche Hemmung könnte (1) direkt über eine Hemmung von NF $\kappa$ B oder (2) indirekt über eine Hemmung des TNF-Signaltransduktionsweges erreicht werden oder (3) indirekt über eine Förderung der intrinsischen Hemmung durch I $\kappa$ B.

Eine Hemmung von NF $\kappa$ B ist von folgenden Medikamenten beschrieben worden: Azetylsalizylsäure inhibiert NF $\kappa$ B, indem sie die Phosphorylierung von I $\kappa$ B hemmt (Kopp und Ghosh, 1994; Kutuk und Basaga, 2004). Azetylsalizylsäure wurde bisher vor allem wegen ihrer thrombozytenaggregationshemmenden Wirkung in der Prävention und Therapie des MI eingesetzt (Bredie et al., 2003). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit könnte Azetylsalizylsäure darüber hinaus durch eine Hemmung von NF $\kappa$ B in der Plaque lokal präventiv gegen eine Plaqueruptur wirken.

Statine werden vor allem wegen ihrer cholesterinsenkenden, anti-entzündlichen, anti-proliferativen und antithrombogenen Wirkung in der Therapie der Atherosklerose eingesetzt (Laws et al., 2004). Am Modell der Ratte konnte gezeigt werden, dass Statine die Aktivität von NF $\kappa$ B in Zellen atherosklerotischer Plaque hemmen (Hernandez-Presa et al., 2003). Die vorgelegten Ergebnisse legen nahe, dass die lokale Wirkung der Statine in humaner Plaque über eine Hemmung von NF $\kappa$ B zu einer Stabilisierung der atherosklerotischen Plaque beitragen könnte.

Folgende Medikamente, die nicht in der Therapie der KHK eingesetzt werden, könnten eventuell in Zukunft über eine lokale Hemmung von NF $\kappa$ B in der Plaque für eine Therapieoption interessant sein: Sulfasalazine (Egan und Sandborn, 1998), Rifampicin (Yerramesti et al., 2002), Ribavirin (Fiedler et al., 1996) oder Glukokortikoide (Auphan et al., 1995). Auch Nahrungsmittel wie Apfelsaft (Shi und Jiang, 2002), Vitamin-E (Suzuki und Packer, 1993) und das Genussmittel Rotwein (Blanco-Colio et al., 2000) wirken hemmend auf NF $\kappa$ B.

Eine Hemmung von TNF- $\alpha$  könnte die Aktivierung von NF $\kappa$ B über TNFR-1, TRAF-1 und den IL-1-Rezeptor hemmen. Eine Aktivierung von NF $\kappa$ B durch TRAIL wäre davon unabhängig und müsste direkt am TRAIL-Signaltransduktionsweg ansetzen. Bisher sind keine therapeutischen Ansätze zur Hemmung des TRAIL-Signaltransduktionsweges beschrieben worden.

Eine medikamentöse Hemmung von TNF- $\alpha$  gehört seit Jahren zur Standardtherapie der therapierefraktären rheumatoiden Arthritis und des Morbus Crohn. Vertreter dieser TNF-Inaktivatoren sind Etanercept und Infliximab. Etanercept ist ein rekombinantes TNF-Rezeptor-Fusionsprotein und inaktiviert TNF-alpha, indem es zwei TNF-Moleküle verbindet und damit inaktiviert. Infliximab ist ein monoklonaler Antikörper, der an TNF- $\alpha$  bindet und es damit hemmt. Auch die Azetylsalizylsäure soll nach regelmäßiger Einnahme zu einem verminderten Serumspiegel an TNF- $\alpha$  führen (Solheim et al., 2003). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit würde eine systemische Hemmung von TNF- $\alpha$  im Serum von Infarkt-Patienten zu einer lokalen Hemmung von NF $\kappa$ B in der Plaque führen.

Diese Arbeit legt nahe, dass die bisher in der Therapie und Prävention des MI etablierten Medikamente neben ihrer systemischen Wirkung auch eine lokale Wirkung in der Plaque besitzen. Darüber hinaus könnten Medikamente, die bei chronisch entzündlichen Krankheiten angewandt werden eine neue Therapiemöglichkeit der fortgeschrittenen KHK darstellen.

## **V. Zusammenfassung**

Die Ruptur vulnerabler atherosklerotischer Plaque gilt als häufigste Ursache für einen akuten Myokardinfarkt (MI). Die Pathogenese und molekularbiologischen Grundlagen der Ruptur einer vulnerablen Plaque sind bisher nur unzureichend geklärt. Aufgrund der Schwierigkeit humanes Plaquematerial *in vivo* für wissenschaftliche Zwecke zu gewinnen, basieren die meisten Studien auf zellbiologischen Modellen und Tierexperimenten. Das Ziel dieser Arbeit war es, Genexpressionsmuster in humaner Plaque zu analysieren und die Ergebnisse zwischen stabiler Plaque (SP) und rupturierter Plaque (RP) zu vergleichen. Unter den differentiell exprimierten Genexpressionsmustern sollten Gene identifiziert werden, die in der Pathogenese der Plaqueruptur eine tragende Rolle spielen und als Ziel neuer therapeutischer Strategien dienen könnten.

Das FilterWire-Protektionssystem ermöglichte die Gewinnung von humanem Plaquematerial aus Koronararterien während PTCA. Das Plaquematerial stammte von Patienten mit akutem MI und von Patienten mit Symptomen einer stabilen AP. Es wurde als RP bzw. SP bezeichnet. Mithilfe von cDNA-Arrays wurden Genexpressionsmuster von RP und SP charakterisiert und miteinander verglichen.

Die statistische Analyse ergab 89 Gene, die im Vergleich zur SP in RP hochreguliert waren. Die hochregulierten Gene üben hauptsächlich Funktionen bei Apoptose, Proliferation und Entzündung aus: Das Nebeneinander von Proliferation mit Materialzunahme auf der einen Seite und Apoptose mit Zelluntergang auf der anderen Seite kann einen Circulus vitiosus unterhalten, der zur Vulnerabilität der Plaque beitragen könnte. Verminderte Zell-Zell-Kontakte, Neovaskularisationen und die Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion in der Plaque könnten ebenfalls eine tragende Rolle in der Pathogenese der Plaqueruptur einnehmen.

Es ist besonders interessant, dass zwei Untereinheiten des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B hochreguliert waren: die p65- und die DNA-bindende-Untereinheit. Auf Protein-Ebene konnte eine Aktivierung von NF $\kappa$ B durch eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen die p65-Untereinheit in RP nachgewiesen werden.

Passend zur Hochregulierung von NF $\kappa$ B war unter den 89 hochregulierten Genen ein NF $\kappa$ B-assoziiertes Genexpressionsmuster aus NF $\kappa$ B-regulierten Genen und NF $\kappa$ B-Aktivatoren zu finden. Die NF $\kappa$ B-regulierten Gene mit proapoptotischer, proliferativer und proinflammatorischer Wirkung könnten durch die Induktion von Apoptose, Proliferation und einer Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion zur Ruptur der vulnerablen Plaque führen.

Die I $\kappa$ B-Proteine, die als Regulatoren von NF $\kappa$ B bekannt sind, waren nicht differentiell exprimiert. Die fehlende Hochregulierung der I $\kappa$ B-Proteine legte die Hypothese nahe, dass es zur Dysregulation von NF $\kappa$ B gekommen sein musste (s. Abb.17).

Eine solche Dysregulation würde bedeuten, dass NF $\kappa$ B ungehemmt zu einer chronischen Hochregulierung des NF $\kappa$ B spezifischen Genexpressionsmusters geführt hat, was als instabilisierendes Moment für die Vulnerabilität der Plaque verantwortlich sein könnte. Die Hochregulierung von TNF-Rezeptoren und Mitgliedern der TNF-Familie und die Tatsache, dass der Level an TNF- $\alpha$  bei Patienten mit akutem MI im Serum erhöht ist, erlaubte die Hypothese, dass der TNF-Signaltransduktionsweg für die Aktivierung von NF $\kappa$ B in der Plaque verantwortlich sein könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit schreiben dem Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Plaqueruptur zu. NF $\kappa$ B könnte als Ziel neuer therapeutischer Strategien dienen: entweder indirekt durch Hemmung des TNF-Signaltransduktionsweges oder durch eine Hemmung von NF $\kappa$ B direkt.

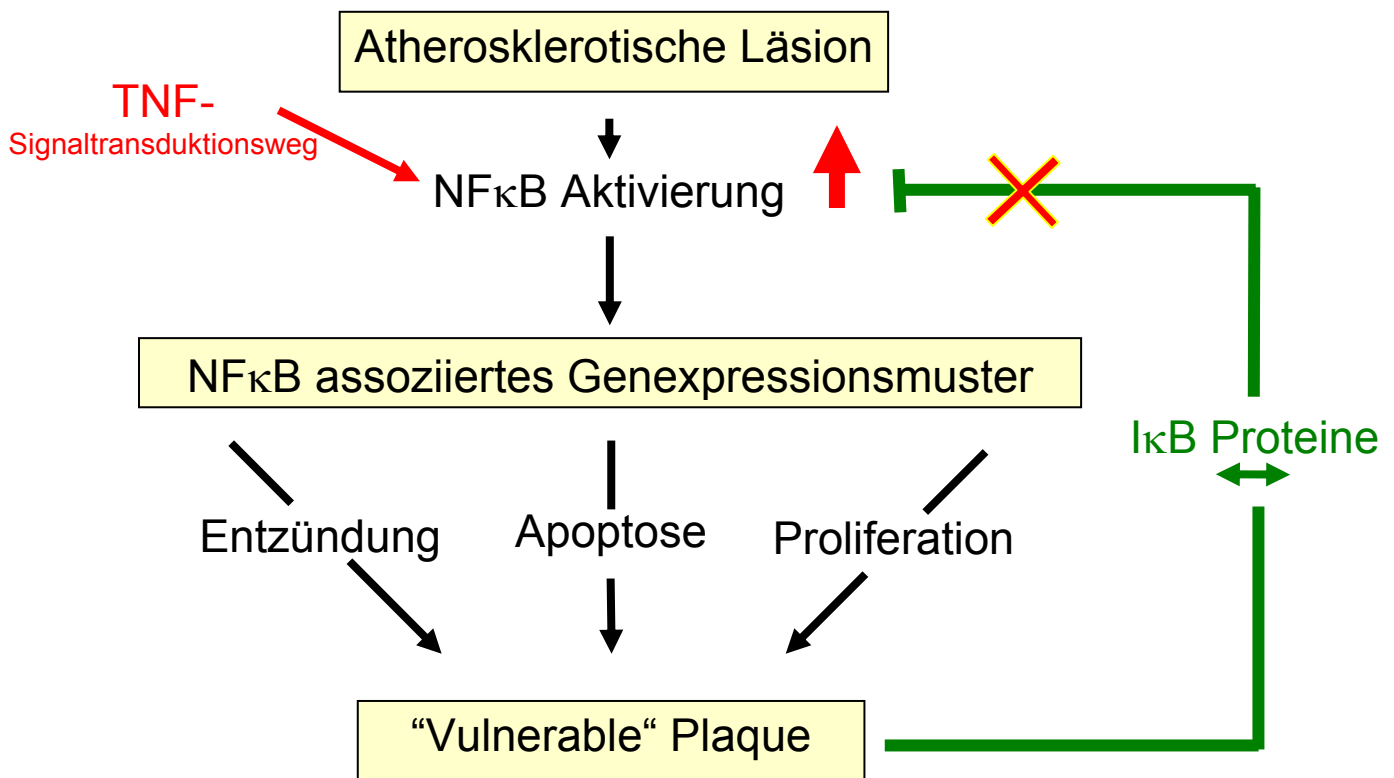


Abb. 16: Hypothetisches Modell der Dysregulation von NF $\kappa$ B in der Pathogenese der RP. Die Aktivierung von NF $\kappa$ B durch den TNF-Signaltransduktionsweg führt zur einer Hochregulierung NF $\kappa$ B-regulierter Gene mit Funktionen bei Apoptose, Proliferation und Entzündung. Dies führt zur vulnerablen Plaque. Die fehlende Hochregulation der I $\kappa$ B-Proteine führt zu einer ungehemmten Aktivierung und Dysregulation von NF $\kappa$ B, was in der Ruptur der vulnerablen Plaque enden würde.

## **VI. Literaturverzeichnis**

Aizawa, K., Suzuki, T., Kada, N., Ishihara, A., Kawai-Kowase, K., Matsumura, T., Sasaki, K., Munemasa, Y., Manabe, I., Kurabayashi, M., Collins, T., Nagai, R. Regulation of platelet-derived growth factor-A chain by Krüppel-like factor 5. *J. Biol. Chem.* 279 (2003) 70-76.

Amento, E.P., Ehsani, N., Palmer, H., Libby, P.. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb.* 11 (1991) 1223-1230.

Aoki, M., Nata, T., Morishita, R., Matsushita, H., Nakagami, H., Yamamoto, K., Yamazaki, K., Nakabayashi, M., Ogihara, T., Kaneda, Y. Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF-kappaB: antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells. *Hypertension* 38 (2001) 48-55.

Arenzana-Seisdedos F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, RT., Virelizier, JL., Dargemont, C. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *Cell Sci.* 110 (1997) 369-78.

Ashkenazi, A., Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281 (1998) 1305-1308.

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

Baeuerle, P.A. and Baltimore, D. I-kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 242 (1988) 540- 546.

Baeuerle, P.A., Baltimore, D. A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB. *Genes Dev.* 3 (1989) 1689-98.

Baim, D.S., Wahr, D., George, B., Leon, M.B., Greenberg, J., Cutlip, D.E., Kaya, U., Popma, J.J., Ho, K.K.L., Kuntz, R.E. Randomized trial of a distal embolization protection device during percutaneous intervention of saphenous vein aorto-coronary bypass grafts. *Circulation* 105 (2002) r13-r18.

Baker, S.J. and Reddy, E.P. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12 (1996) 1-9.

Barath, P., Fishbein, M.C., Cao, J., Berenson, J., Helfant, R.H., Forrester, J.S. Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am. J. Cardiol.* 65 (1990) 297-302.

Bauriedel, G., Schmucking, I., Hutter, R., Luchesi, C., Welsch, U., Kandolf, R., Luderitz, B. Increased apoptosis and necrosis of coronary plaques in unstable angina. *Z Kardiol.* 86 (1997) 902-10.

Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Watson, A.D., Lusis, A.J. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 91 (1995) 2488-2496.

Björkerud, S., Björkerud, B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am. J. Pathol.* 149 (1996) 367-380.

Blanco-Colio, L.M., Valderrama, M., Alvarez-Sala, L.A., Bustos, C., Ortego, M., Hernandez-Presa, M.A., Cancelas, P., Gomez-Gerique, J., Millan, J., Egido, J. Red wine intake prevents nuclear factor-kappa B activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation* 102 (2000) 1020-6.

Bogenrieder, T., Herlyn, M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 22 (2003) 6524-36.

Boisvert W.A., Santiago, R., Curtiss, L.K., Terkeltaub, R.A. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 353-63.

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

Brantley, D.M., Cheng, N., Thompson, E.J., Lin, Q., Brekken, R.A., Thorpe, P.E., Muraoka, R.S., Ceretti, D.P., Pozzi, A., Jackson, D., Lin, C., Chen, J. Soluble Eph A receptors inhibit tumor angiogenesis and progression in vivo. *Oncogene* 21 (2002) 7011-26.

Bredie, S.J., Wollersheim, H., Verheugt, F.W., Thien, T. Low-dose aspirin for primary prevention of cardiovascular disease. *Semin. Vasc. Med.* 3 (2003) 177-84.

Briggs, J.A., Burrus, G.R., Stickney, B.D., Briggs, R.C. Cloning and Expression of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen: regulation by interferon alpha. *J. Cell. Biochem.* 49 (1992) 82-92.

Brizzi, M.F., Formato, L., Dentelli, P., Rosso, A., Pavan, M., Garbarino, G., Marco, P., Camussi, G., Prgoraro, L. Interleukin-3 stimulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 103 (2001) 549-554.

Brown, K., Gerstberger S., Carlson, L., Franzoso, G., Siebenlist, U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267 (1995) 1485-8.

Camejo, G. Hydrolytic enzymes released from resident macrophages and located in the intima extracellular matrix as agents that modify retained apolipoprotein B lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1312-3.

Chase, A.J., Bond, M., Crook, M.F., Newby, A.C. Role of nuclear factor-kappa B activation in metalloproteinase-1, -3, and -9 by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced



in vivo. *Arterioscler. Thromb.* 22 (2002) 765-771.

Chen, G., Goeddel, D.V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296 (2002) 1634-1635.

Chen, X., Kandasamy, K., Srivastava, R.K. Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor  $\kappa$ B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling. *Cancer Res.* 63 (2003) 1059-1066.

Cheng, N., Brantley, D.M., Chen, J. The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13 (2002) 75-85.

Collins, T. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab. Invest.* 68 (1993) 499-508.

Collins, T. and Cybulscy M.I. NF-kappa B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J.Clin. Invest.* 107 (2001) 255-264.

Cybulscy, M.I. and Gimbrone, M.A. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251 (1991) 788-791.

Davies, M.J., Thomas, A.C., Knapman, P.A., Hangartner, J.R. Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden ischemic cardiac death. *Circulation* 73 (1986) 418-427.

De Boer, O.J., van der Wal, A.C., Teeling, P., Becker, A.E. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc. Res.* 41 (1999) 443-9.

Dentelli, P., Del Sorbo, L., Rosso, A. Human IL-3 stimulates endothelial cell motility and promotes in vivo new vessel formation. *J. Immunol.* 163 (1999) 2151-2159.

Dong, Z.M., Chapman, S.M., Brown, A.A., Frenette, P.S., Hynes, R.O., Wagner, D.D. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 102 (1998) 145-152

Drescher, U. The Eph family in the patterning of neural development. *Curr. Biol.* 7 (1997) R799-R807.

Egan, L.J., Sandborn, W.J. Inhibition of nuclear factor kappaB by sulfasalazine: a new target for inflammatory bowel disease therapy? *Gastroenterology* 115 (1998) 1295-6.

Falk, E. Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death: Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation* 71 (1985) 699-708.

Falk, E. Why do plaques rupture? *Circulation* 86 (1992) III30-42.

Fiedler, M.A., Wernke-Dollries, K., Stark, J.M. Inhibition of viral replication reverses respiratory syncytial virus-induced NF-kappa B activation and interleukin-8 gene expression in A549 cells.

J. Virol. 70 (1996) 9079-82.

Filip, D.A., Nistor, A., Bulla, A., Radu, A., Lupu, F., Simionescu, M. Cellular events in the development of valvular atherosclerotic lesions induced by experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 67 (1987) 199-214.

Ganchi, P.A., Sun, S.C., Greene, W.C., Ballard, D.W. I-kappa B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF-kappa B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF-kappa B p65 DNA binding. *Mol. Biol. Cell.* 3 (1992) 1339-52.

Geng, Y., Holm, J., Nygren, S., Bruzelius, M., Stemme, S., Hansson, G.K. Expression of the macrophage scavenger receptor in atheroma. Relationship to immune activation and the T-cell cytokine interferon.gamma. *Arterterioscler. Thromb.* 15 (1995) 1995-2002.

Ghosh, S., Baltimore, D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature*, 12 (1990) 678-82.

Grube, E., Gerckens, U., Yeung, C., Rowold, S., Kirchhof, N., Sedgewick, J., Yadav, J.S., Stertz, S. Prevention of distal embolization during coronary angioplasty in saphenous vein graft and native vessels using porous filter protection. *Circulation* 104 (2001) 2436-2441.

Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P., Rollins, B.J. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol.Cell.* 2 (1998) 275-81.

Han, S.H., Yea, S.S., Jeon, Y.J., Yang, K., Kaminski, N.E. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) promotes IL-2 mRNA expression through the up-regulation of NF- $\kappa$ B, AP-1 and NF-AT in EL4 cells. *J. Pharmacol. And Experim. Ther.* 287 (1998) 1105-1112.

Haridas, V., Darnay, B.G., Natarajan, K., Heller, R., Aggarwal, B.B. Overexpression of the p80 TNF receptor leads to TNF-dependent apoptosis, nuclear factor- $\kappa$ B activation, and c-Jun Kinase activation. *J. of Immunol.* 160 (1998) 3152-3162.

Hermann, M.P., Sukhova, G.K., Libby, P., Gerdes, N., Tang, N., Horton, D.B., Kilbride, M., Breitbart, R.E., mChun, M., Schönbeck, U. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma. *Circulation* 104 (2001) 1899-1904.

Hernandez-Presa, M.A., Ortego, M., Tunon, J., Martin-Ventura, J.L., Blanco-Colio, L.M., Aparicio, C., Ortega, L., Gomez-Gerique, J., Egido, J. Simvastatin reduces NF-kappa B activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet. *Cardiovasc. Res.* 57 (2003) 168-77.

Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G., Goeddel, D.V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell.* 84 (1996) 299-308.

Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V., Goeddel, D.V. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity.* 4 (1996) 387-96.

Iademarco, M.F., McQuillan, J.J., Rosen, G.D., Dean, D.C. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *Biol. Chem.* 267 (1992) 16323-9.

Izumi, T., Saito, Y., Kishimoto, I., Harada, M., Kuwahara, K., Hamanaka, I., Takahashi, N., Kawakami, R., Li, Y., Takemura, G., Fujiwara, H., Garbers, D.L., Mochizuki, S., Nakao, K. Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF- $\kappa$ B activation and alleviates myocardial ischemia/ reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 203-213.

Janssen-Heininger, Y., Poynter, M.E., Baeuerle, P.A. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor  $\kappa$ B. *Free Radical Biology & Medicine* 28 (2000) 1317-1327.

Kaartinen, M., Penttila, A., Kovanen, P.T. Mast cells in rupture-prone areas of human coronary atheromas produce and store TNF- $\alpha$ . *Circulation* 94 (1996) 2787-92.

Kamm, C., Boston, H., Hewett, J., Wilbur, J., Corey, D.P., Hanson, P.I., Ramesh, V., Breakefield, X.O.. The early onset dystonia protein torsinA interacts with kinesin light chain 1. *J Biol Chem.* 279 (2004) 19882-92.

Kane, L.P., Shapiro, V.S., Stokoe, D., Weiss, A. Induction of NF- $\kappa$ B by the Akt/ PKB kinase. *Curr. Biol.* 9 (1999) 601-604.

Kawakami, A., Tanaka, A., Chiba, T., Nakajima, K., Shimokado, K., Yoshida, M. Remnant lipoprotein-induced smooth muscle cell proliferation involves epidermal growth factor receptor transactivation. *Circ.* 108 (2003) 2679-2688.

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

Klein, R. Excitatory Eph receptors and adhesive ephrin ligands. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13 (2001) 196-203.

Kockx, M. M. Apoptosis in the atherosclerotic plaque. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (1998) 1519-1522.

Kodama, N., Otani, H., Yamada, Y., Mune, M., Yukawa, S. Involvement of MCP-1 and M-CSF in glomerular foam cell formation in ExHC rats. *Kidney Int. Suppl.* 71 (1999) S174-7.

Kopp, E., Ghosh, S. Inhibition of NF $\kappa$ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265 (1994) 956-959.

Kubota, T., Miyauchi, M., Hirokawa, G., Awaya, A., Miyasaka Kurosawa, Y., Kanai, Y., Maruyama, K. Upregulation of nucleobindin expression in human-activated lymphocytes and non-Hodgkin's lymphoma. *Pathol. Int.* 48 (1998) 22-8.

Kugiyama, K., Ota, Y., Takazoe, K., Moriyama Y., Kawano, H., Miyao, Y., Sakamoto, T., Soejima, H., Ogawa, H., Doi, H., Sugiyama, S., Yasue, H. Circulating levels of secretory type II phospholipase A2 predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation*

100 (1999) 1280-1284.

Kutuk, O., Basaga, H. Aspirin inhibits TNF $\alpha$ - and IL-1-induced NF-kappa B activation and sensitizes HeLa cells to apoptosis. *Cytokine* 25 (2004) 229-37.

Laws, P.E., Spark, J.I., Cowled, P.A., Fitridge, R.A. The role of statins in vascular disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 27 (2004) 6-16.

Lazdins, J.K., Grell, M., Walker, M.R., Woods-Cook, K., Scheurich, P., Pfizenmaier, K. Membrane tumor necrosis factor (TNF) induce cooperative signaling of TNFR60 and TNFR80 favors induction of cell death rather than virus production in HIV-infected T cells. *J. Exp. Med.* 185 (1997) 81-90.

Lee, B.O., Ishihara, K., Denno, K., Kobune, Y., Itoh, M., Muraoka, O., Kaisho, T., Sasaki, T., Ochi, T., Hirano, T. Elevated levels of the soluble form of bone marrow stromal cell antigen 1 in the sera of patients with severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39 (1996) 629-37.

Lee, R.T., Yamamoto, C., Feng, Y. Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 13847-13851.

Legler, D.F., Micheau, O., Doucey, M.A., Tschopp, J., Bron, C. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF $\alpha$ -mediated NF-kappaB activation. *Immunity* 18 (2003) 655-64.

Lenardo, M.J., Fan, C.M., Maniatis, T., Baltimore, D. The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. *Cell.* 57 (1989) 287-94.

Leonard, E.J. and Yoshimura, T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol. Today* 11 (1990) 97-101.

Ley, K., Bullard, D.C., Arbones, M.L., Bosse, R., Vestweber, D., Tedder, T.F., Beaudet, A.L. Sequential contribution of L- and P-Selectin to leukocyte rolling in vivo. *J. Exp. Med.* 181 (1995) 669-675.

Libby, P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis and stabilization. *Am. J. Cardiol.* 86 (2000) 3J-9J.

Libby, P. What have we learned about the biology of atherosclerosis? The role of inflammation. *Am J. Cardiol.* 88 (2001) 3J-6J.

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.

Lind, P., Hedblad, B., Stavenow, L. Influence of plasma fibrinogen levels on the incidence of

myocardial infarction and death is modified by other inflammation-sensitive proteins: a long-term cohort study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 452-458.

Lissoni, P., Pelizzoni, F., Mauri, O., Perego, M., Pittalis, S., Barni, S. Enhanced secretion of tumour necrosis factor in patients with myocardial infarction. *Eur. J. Med.* 1 (1992) 277-80.

Mallat, Z., Tedgui, A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br. J. Pharmacol.* 130 (2000) 947-962.

Mallat, Z., Tedgui, A. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ. Res.* 88 (2001) 998-1003.

May, A.E., Schmid, R., Kanse, S.M., Chavakis, T., Stephens, R.W., Schömig, A., Preissner, K.T., Neumann, F.J. Urokinase receptor surface expression regulates monocyte adhesion in acute myocardial infarction. *Blood* 100 (2002) 3611-3617.

Misiakos, E.P., Kouraklis, G., Agapitos, E., Perrea, D., Karatzas, G., Boudoulas, H., Karayannakos, P.E. Expression of PDGF-A, TGF $\beta$  and VCAM-1 during the development stages of experimental atherosclerosis. *Eur. Surg. Res.* 33 (2001) 264-9.

Nagel, T., Resnick, N., Atkinson, W.J., Dewey, C.F., Jr., Gimbrone, M.A. Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression on cultured human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 885-91.

Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S.W., Litovsky, S., Rumberger, J., Badimon, J.J., Stefanadis, C., Moreno, P., Pasterkamp, G., Fayad, Z., Stone, P.H., Waxman, S., Raggi, P., Madsen, M., Zarrabi, A., Burke, A., Yuan, C., Fitzgerald, P.J., Siscovick, D.S., de Korte, C.L., Aikawa, M., Juhani Airaksinen, K.E., Assmann, G., Becker, C.R., Chesebro, J.H., Farb, A., Galis, Z.S., Jackson, C., Jang, I.K., Koenig, W., Lodder, R.A., March, K., Demirovic, J., Navab, M., Priori, S.G., Reekhter, M.D., Bahr, R., Grundy, S.M., Mehran, R., Colombo, A., Boerwinkle, E., Ballantyne, C., Insull, W. Jr, Schwartz, R.S., Vogel, R., Serruys, P.W., Hansson, G.K., Faxon, D.P., Kaul, S., Drexler, H., Greenland, P., Muller, J.E., Virmani, R., Ridker, P.M., Zipes, D.P., Shah, P.K., Willerson, J.T. From vulnerable Plaque to vulnerable Patient. *Circulation* 108 (2003) 1664-1672.

Nagineni, C.N., Samuel, W., Nagineni, S., Pardhasaradhi, K., Wiggert, B., Detrick, B., Hooks, J.J. Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human pigment epithelial cells : involvement of mitogen-activated protein kinases. *J. Cell Physiol.* 197 (2003) 453-62.

Nakamura, M., Lee, D.P., Yeung, A.C. Identification and treatment of vulnerable plaque. *Rev. Cardiovasc. Med.* 2 (2004) S22-33.

Nakata, A., Miyagawa, J., Yamashita, S., Nishida, M., Tamura, R., Yamama, K., Nakamura, T., Nozaki, S., Kameda-Takemura, K., Kawata, S., Tanigu, N., Higashiyama, S., Matsuzawa, Y. Localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human coronary arteries. Possible roles of HB-EGF in the formation of coronary atherosclerosis. *Circ.* 94 (1996) 2778-86.

- Newby, A.C., Zaltsman, A.B. Fibrous cap formation or destruction-the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc. Res.* 41 (1999) 345-60.
- Nicholson, A.C., Han, J.,Febbraio, M., Silverstein, R.L., Hajjar, D.P. Role of CD36, the macrophage class B scavenger receptor, in atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 947(2001) 224-8.
- Niessen, H.W., Krijnen, P.A., Visser, C.A., Meijer, C.J., Erik Hack, C. Type II secretoty phospholipase A2 in cardiovascular disease: mediator in atherosclerosis and ischemic damage to cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 60 (2003) 68-77.
- Nilsson, J. Cytokines and smooth muscle cells in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 27 (1993) 1184-90.
- Nishi, H., Neta, G., Nishi, K.H., Akers, L.M., Rikiyama, T., Proctor, K.N., Murphy, B.A., Johnson, A.C. Analysis of the epidermal growth factor receptor promotor: the effect of nuclear factor-kappaB. *Int. J. Mol. Med.* 11 (2003) 49-55.
- Ofek, P., Ben-Meir, D., Kariv.Inbal, Z., Oren, M., Lavi, S. Cell cycle regulation and p53 activation by protein phosphatase 2C $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 14299-14305.
- Olin, K.L., Potter-Perigo, S., Barrett, P.H. Lipoprotein lipase enhances the binding of native and oxidized low density lipoproteins to versican and biglycan synthesized by cultured arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 34629-33466.
- Osborn, L., Kunkel, S., Nabel, G.J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 (1989) 2336-40.
- Pahl, H.L. Activators and target genes of Rel/Nf-kappa B transcription factors. *Oncogene* 18 (1999) 6853-6866.
- Popma, J.J., Cox, N., Hauptmann, E., Reifart, N., Virmani, R., Emira, K., Murphy, S., Gibson, M., Grube, E. Initial Clinical Experience with distal Protection Using the FilterWire in Patients Undergoing Coronary Artery and Saphenous Vein Graft Percutaneous Intervention. *Catheeterization and Cardiovascular Interventions* 57 (2002) 125-134.
- Rajavashisth, T.B., Andalibi, A., Territo, M.C., Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Lusis, A.J. Induktion of endothelila cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 344 (1990) 254-257.
- Rajavashisth, T.B, Yamada, H., Mishra, N.K. Transcriptional activation of the macrophage-colony stimulating factor gene by minimally modified LDL. Involvement of nuclear factor-kappa B. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15 (1995) 1591-8.
- Ritchie, M.E. Nuclear factor-kappaB is selectively and markedly activated in humans with

unstable angina pectoris. *Circulation* 100 (1999) 1462-3.

Ross, R., Glomset, J.A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of lesions of atherosclerosis. *Science* 180 (1973) 1332-9.

Ross, R., Harker, L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science* 193 (1976) 1094-100.

Ross, R., Glomset, J., Harker, L. Response to injury and atherogenesis. *Am. J. Pathol.* 86 (1977) 675-84.

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.

Saitoh, H., Hinchey, J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-like-related protein modifiers SUMO-1 *versus* SUMO-2/3. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 6252-6258.

Schmitz, M.L. and Baeuerle, P.A. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO. J.* 10 (1991) 3805-17.

Schneider, P., Thome, M., Burus, K., Bodmer, J.L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N., Tschopp, J. TRAIL receptor 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappa B. *Immunity* 7 (1997) 841-6.

Schreck, R., Albermann, K., Baeuerle, P.A. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress responsive transcription factor of eucaryotic cells. *Free Radic. Res. Commun.* 17 (1992) 221-37.

Schwenzer, R., Siemienski, K., Liptay, S., Schubert, G., Peters, N., Scheurich, P., Schmid, R.M., Wajant, H. The human tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NFkB and c-Jun N-terminal Kinase. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 19368-19374.

Secchiero, P., Milani, D., Gonelli, A., Melloni, E., Campioni, D., Gibellini, D., Capitani, S., Zauli, G. Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TNF-alpha promote the NF-kappaB-dependent maturation of normal and leukemic myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 74 (2003) 223-32.

Shi, D., Jiang, B.H. Antioxidant properties of apple juice and its protection against Cr(VI)-induced cellular injury. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 21 (2002) 233-42.

Shintani, S., Ishikawa, T., Nonaka, T., Li, C., Nakashiro, K., Wong, D.T., Hamakawa, H. Growth-regulated oncogene-1 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human oral cancer. *Oncology* 66 (2004) 316-22.

Solheim, S., Arnesen, H., Eikvar, L., Hurlen, M., Seljeflot, I. Influence of aspirin on inflammatory markers in patients after acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 92 (2003)

843-845.

Springer, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 76 (1994) 301-314.

Stary, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W.Jr., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89 (1994) 2462-78.

Steinberg, D. Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation* 76 (1987) 508-12.

Storz, P., Doppler, H., Toker, A. Protein kinase C $\delta$  selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF- $\kappa$ B in oxidative stress signaling. *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 2614-26.

Stouffer, G.A., Owens, G.K. TGF- $\beta$  promotes proliferation of cultured SMC via both PDGF-AA-dependent and PDGF-AA-independent mechanisms. *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 2048-55.

Sun, S.C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W., Greene, W.C. NF- $\kappa$ B controls expression of inhibitor I  $\kappa$ B  $\alpha$  evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259 (1993) 1912-5.

Suzuki, Y.J., Packer, L. Inhibition of NF- $\kappa$ B activation by vitamin E derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193 (1993) 277-83.

Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., Goeddel, D.V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74 (1993) 845-53.

Toker, A. Signaling through protein kinase C. *Front. Biosci.* 3 (1998) D1134-47.

Topol, E.J. and Yadav, J.S. Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease. *Circulation* 101 (2000) 570-80.

Tovar, D., Faye, J.C., Favre, G. Cloning of the human RHOB gene promoter: characterization a VNTR sequence that affects transcriptional activity. *Genomics* 81 (2003) 525-30.

Turutin, D.V., Kubareva, E.A., Pushkareva, M.A., Ullrich, V., Sudina, G.F. Activation of NF- $\kappa$ B transcription factor in human neutrophils by sulphatides and L-selectin cross-linking. *FEBS Letters* 536 (2003) 241-245.

Tuzi, N.L., Gullick, W.J. Eph, the largest known family of putative growth factor receptors. *Br. J. Cancer* 69 (1994) 417-421.

Urban, M.B. and Baeuerle, P.A. The p65-kD subunit of NF- $\kappa$ B is a receptor for I- $\kappa$ B and a modulator of DNA-binding specificity. *Genes Dev.* 4 (1990) 1975-84.

Valen, G., Hansson, G.K., Dumitrescu, A., Vaage, J. Unstable angina activates myocardial heat



shock protein 72, endothelial nitric oxide synthase, and transcription factors Nf $\kappa$ B and AP-1  
*Cardiovasc. Res.* 47 (2000) 49-56.

Van der Wal, A.C., Becker, A.E., Elbers, J.R., Das, P.K. An immunocytochemical analysis of rapidly progressive atherosclerosis in human vein grafts. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 6 (1992) 469-73.

Van de Stolpe, A., Caldenhoven, E., Stade, B.G., Koenderman, L., Raaijmakers, J.A., Johnson, J.P., van der Saag, P.T. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 6185-92.

Vanenabeele, P., Declercq, W., Vercammen, D., Van de Craen, M., Groo, J., Loetscher, H., Brockhaus, M., Lesslauer, W., Fiers, W. Functional characterization of the human tumor necrosis factor receptor p75 in a transfected rat/ mouse T cell hybridoma. *J. Exp. Med.* 176 (1992) 1015-24.

Vicat, L.M., Ardila-Osorio, H., Khabir, A., Brezak, M.C., Viossat, I., Kasprzyk, P., Jlidi, R., Opolon, P., Ooka, T., Prevost, G., Huang, D.P., Bussopn, P. Apoptosis and TRAF-1 cleavage in Epstein-Barr virus-positive nasopharyngeal carcinoma cells treated with doxorubicin combined with farnesyl-transferase inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* 63 (2003) 423-33.

Whelan, J., Ghersa, P., Hooft van Huijsduijnen, R., Gray, J., Chandra, G., Talabot, F., DeLamarter, J.F.. An NF  $\kappa$  B-like factor is essential but not sufficient for cytokine induction of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Nucleic Acids. Res.* 19 (1991) 2645-53.

Wight, T.N. Cell biology of arterial proteoglykans. *Arteriosclerosis* 9 (1989) 1-20.

Wilson, S.H., Best, P.J.M., William, D.E., Holmes, D.R., Carlson, P.J., Celermajer, D.S., Lerman, A. NF- $\kappa$  B immunoreactivity is present in human coronary plaque and enhanced in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis* 160 (2002) 147-153.

Yang, E., Korsmeyer, S.J. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88 (1996) 386-401.

Yerramesti, R., Gollapudi, S., Gupta, S. Rifampicin inhibits CD95-mediated apoptosis of Jurkat T cells via glucocorticoid receptors by modifying the expression of molecules regulating apoptosis. *J Clin. Immunol.* 22 (2002) 37-47.

Yla-Herttuala, S., Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Butler, S., Witztum, J.L., Steinberg, T. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* 84 (1989) 1086-95.

Yusuf, S., Reddy, S., Ounpuu, S., Anand, S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general consideration, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 104 (2001) 2746-53.

Zabel, S., Baeuerle, P. Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* 61 (1990) 255-65

## **VII. Danksagung**

Mein tiefer Dank gilt Frau PD Dr. D. Zohlhöfer für die Erstellung des Erst-Gutachtens über die vorgelegte Arbeit. Frau PD Zohlhöfers Vorarbeiten legten den methodischen Grundstein für meine wissenschaftliche Arbeit an diesem Thema. Unter ihrer ständigen und umfassenden Betreuung blieb viel Raum für eigene Gestaltung und Ideen für diese Arbeit. Besonders hervorheben möchte ich, dass Frau PD Zohlhöfers Engagement in der Klinik und im wissenschaftlichen Bereich mir immer ein Vorbild war und mich in meiner beruflichen Entscheidung sehr geprägt hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Thomas Nührenberg, der mir in technischen Fragen jederzeit zur Seite stand und sich mit Begeisterung wissenschaftlichen Diskussionen stellte.

Herrn Prof. Schühlen danke ich herzlich für seine Geduld bei der Gewinnung von FilterWire – Proben über 2 Jahre für diese Arbeit.

In Bad Krozingen hat Herr Prof. Neumann und seine Mitarbeiter einen großen Anteil der FilterWire-Proben gewonnen und mich mit großer Freundlichkeit bei meiner Arbeit unterstützt. Dafür möchte ich mich bedanken.

Dankbar bin ich für die hervorragende methodische und technische Hilfe von Frau Renate Hegenloh, Herrn Falko Sorge und Frau Anja Huth, auf die ein wesentlicher Anteil meiner methodischen Ausbildung im Labor aufbaut.

Herr PD Brand hat sowohl methodische als auch inhaltliche Anregungen und Ideen zu dieser Arbeit beigesteuert, wofür ich mich bedanken möchte.

Meinen Eltern und Brüdern danke ich für Ihre Liebe und Unterstützung, ohne die ich diese Arbeit nicht ausgeführt haben könnte.

Aus vollem Herzen möchte ich Herrn Florian Eehalt danken, der mich mit wissenschaftlichen Diskussionen und Gestaltungsideen immer unterstützt hat.