

Aus dem Institut für Immunologie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

**Serielle Genexpressionsanalyse der Neointimabildung nach
Ballonangioplastie im humanen Organkulturmodell mittels cDNA-
Array-Technologie: Neue Erkenntnisse zur Wirkung von Rapamycin**



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Thomas Nührenberg

aus

München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Patrick A. Baeuerle
2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Igo-Kemenes

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. M. Dellian
Prof. Dr. P. Boekstegers

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Dietlind Zohlhöfer

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.10.2005

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| 1. VERÖFFENTLICHUNGEN | 6 |
| 2. EINLEITUNG | 7 |
| 2.1 Klinische Aspekte der Restenose..... | 7 |
| 2.2 Pathophysiologische Grundlagen der Restenose im Menschen..... | 8 |
| 2.3 Bedeutung von Entzündungsreaktionen in der Pathophysiologie der Restenose | 9 |
| 2.4 Bedeutung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in der Pathophysiologie der Restenose..... | 11 |
| 2.5 Therapeutische Strategien zur Behandlung der koronaren Restenose..... | 12 |
| 2.6 Fragestellung..... | 15 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 17 |
| 3.1 Gewinnung und Vorbereitung der Organkulturproben | 17 |
| 3.2 Ballon-Dilatation und Kultivierung humaner renaler Arteriensegmente in vitro..... | 17 |
| 3.3 Reverse Transkription der mRNA humaner renaler Arteriensegmente und globale PCR-Amplifizierung | 18 |
| 3.4 Hybridisierung von cDNA-Arrays und Detektion mittels Chemilumineszenz..... | 19 |
| 3.5 Analyse der Daten der cDNA-Arrays | 19 |
| 3.6 Validierung der cDNA-Daten mittels genspezifischer PCR..... | 20 |
| 3.7 Morphometrische Analyse | 20 |
| 3.8 Immunhistochemische Analyse | 21 |
| 3.9 Statistische Analyse | 22 |
| 4. ERGEBNISSE | 23 |
| 4.1 Morphometrische Analyse der Neointimaformation im humanen Organkulturmodell im Zeitverlauf und unter Einfluss von Rapamycin..... | 23 |
| 4.2 Genexpressionsanalyse im humanen Organkulturmodell mittels cDNA Array Analyse..... | 23 |
| 4.2.1 Vergleichende Genexpressionsanalyse | 23 |
| 4.2.2 Differentielle Genexpression im zeitlichen Verlauf nach Angioplastie..... | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.3 Vergleich der Genexpression des humanen Organkulturmodells mit derjenigen humaner Neointima aus In-Stent-Restenosen | 29 |
| 4.2.4 Funktionelle Zuordnung der nach Angioplastie regulierten Gene | 30 |
| 4.2.5 Regulation proliferations- und apoptose-assoziiertes Gene | 33 |
| 4.2.6 Regulation von Genen aus dem Bereich des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix und der Adhäsionsmoleküle | 34 |
| 4.2.7 Ausbildung eines pro-inflammatorischen Genexpressionsmusters | 36 |
| 4.2.8 Regulation stammzell- und knochenmarks-assoziiertes Gene | 36 |
| 4.3 Effekt von Rapamycin auf das Genexpressionsmuster im humanen Organkulturmodell nach 21 und 56 Tagen | 37 |
| 4.3.1 Hemmung proliferations- und apoptose-assoziiertes Gene | 39 |
| 4.3.2 Hemmung von Genen aus dem Bereich des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix und der Adhäsionsmoleküle | 39 |
| 4.3.3 Hemmung der Ausbildung eines pro-inflammatorischen Genexpressionsmusters | 39 |
| 4.3.4 Hemmung stammzell- und knochenmarks-assoziiertes Gene | 40 |
| 4.4 Validierung der Daten der cDNA Array-Analyse mittels genspezifischer PCR | 40 |
| 4.5 Nachweis einer differentiellen Proteinexpression im Organkulturmodell am Beispiel von beta-Thromboglobulin | 40 |
| 5. DISKUSSION | 43 |
| 5.1 Die Neointimaformation im Organkulturmodell und deren Hemmung durch Rapamycin | 44 |
| 5.2 Neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie der Neointimaformation durch Genexpressionsanalyse im Organkulturmodell..... | 45 |
| 5.2.1 Zeitabhängige Regulation der Genexpression nach Ballonangioplastie | 45 |
| 5.2.2 Gemeinsamkeiten mit nativer Neointima aus In-Stent-Restenosen | 45 |
| 5.2.3 Regulation von Proliferation und Apoptose nach Ballonangioplastie..... | 47 |
| 5.2.4 Veränderungen in der Expression von Genen des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix | 49 |
| 5.2.5 Nachweis vermehrter Inflammation in Abwesenheit von Leukozyten | 50 |
| 5.2.6 Regulation zur Rekrutierung und Expansion hämatopoetischer Vorläuferzellen beitragender Gene | 51 |
| 5.3 Auswirkungen einer Rapamycinbehandlung auf die Genexpression im Organkulturmodell..... | 52 |
| 5.3.1 Effekt von Rapamycin auf die Zellzykluskontrolle | 53 |
| 5.3.2 Effekt von Rapamycin auf Gene des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix | 54 |
| 5.3.3 Reduktion der Expression pro-inflammatorischer Gene | 55 |
| 5.3.4 Hemmung Stammzell-assoziiertes Gene | 56 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG | 58 |
| 7. LITERATURVERZEICHNIS | 61 |
| 8. DANKSAGUNG | 67 |
| 9. LEBENS LAUF | 68 |

Abkürzungen

| | |
|---------------|---|
| beta-TG | beta-Thromboglobulin |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CDK | Cyclin-abhängige Kinase |
| COX-1 | Cyclooxygenase-1 |
| CXCR-4 | CXC-Chemokin Rezeptor 4 |
| EMAP-II | Endothelial Monocyte Activating Polypeptide-II |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| FKBP12 | FK506 Binding Protein-12 |
| GADD 45 | Growth-Arrest and DNA-Damage inducible Gene 45 |
| G-CSF | Granulozyten-spezifischer Kolonie-stimulierender Faktor |
| GCP-2 | Granulozyten-chemotaktisches Protein 2 |
| HPC | Hematopoetic Progenitor Cell |
| ICAM-1 | Intercellular Adhesion Molecule-1 |
| IFN γ | Interferon-gamma |
| IL | Interleukin |
| ITGB7 | Integrin beta 7 |
| IRF | Interferon Regulatory Factor |
| JAK1 | Janus Kinase 1 |
| Mac-1 | Macrophage Antigen-1 |
| mAk | Monoklonaler Antikörper |
| M-CSF | Macrophagen-spezifischer Kolonie-stimulierender Faktor |
| MMP | Matrix Metalloproteinase |
| MMP-9 | Matrix Metalloproteinase 9 |
| mTOR | Mammalian Target of Rapamycin |
| p70 S6K | p70 S6 Kinase |
| PLGF1+2 | Placenta Growth Factors 1+2 |
| PDGF | Platelet-derived Growth Factor |
| PTCA | Percutane transluminale koronare Angioplastie |
| TR | Thrombin Rezeptor |
| TSP-1 | Thrombospondin-1 |
| SDF-1 | Stromal-Derived-Factor-1 |
| TGF- β | Transforming Growth Factor- β |
| TNF- α | Tumor Necrosis Factor- α |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |

1. Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen auf folgendem internationalen Kongress vorgestellt und als Abstract veröffentlicht worden:

Rapamycin reduces vascular wall inflammation on the transcriptional level after angioplasty

Nührenberg T.G., D. Zohlhöfer, P.A. Baeuerle, R. Voisard

European Society of Cardiology Congress 2004, 30 August 2004, Munich, Germany.

Teile der in dieser Arbeit enthaltenen Ergebnisse wurden in folgenden internationalen Fachzeitschriften als Originalarbeiten veröffentlicht:

Rapamycin attenuates vascular wall inflammation and progenitor cell promoters after angioplasty.

Nührenberg T.G., Voisard R., Fahlisch F., Rudelius M., Braun J., Gschwend J., Kountides M., Herter T., Baur R., Hombach V., Baeuerle P.A., Zohlhöfer D.

FASEB J. 2005 Feb;19(2):246-8. Epub 2004 Nov 16.

Transcriptome analysis reveals a role of interferon-gamma in human neointima formation.

Zohlhöfer D., Richter T., Neumann F.J., **Nührenberg T.**, Wessely R., Brandl R., Murr A., Klein C.A., Baeuerle P.A.

Mol Cell. 2001 May;7(5):1059-69.

Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: Detection of FK506-binding protein 12 upregulation.

Zohlhöfer D., Klein C.A., Richter T., Brandl R., Murr A., **Nührenberg T.**, Schömig A., Baeuerle P.A., Neumann F.J.

Circulation. 2001 Mar 13;103(10):1396-402.

2. Einleitung

2.1 Klinische Aspekte der Restenose

Kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere die koronare Herzerkrankung stellen die häufigste Todesursache in der westlichen Welt dar⁶. Andreas Grüntzig entwickelte im Jahre 1977 als Erster eine Möglichkeit der nicht-chirurgischen Behandlung von symptomatischen Koronarstenosen: die Methode der perkutanen, transluminalen, koronaren Angioplastie (PTCA)²³. Diese Therapieform revolutionierte in den folgenden Jahrzehnten die Behandlung der symptomatischen koronaren Herzerkrankung, insbesondere von akuten Koronarsyndromen, wie der instabilen Angina pectoris oder dem akuten Myokardinfarkt. Doch stellt die koronare Restenose nach perkutanen Angioplastieverfahren nach wie vor eine der schwerwiegendsten und häufigsten Komplikationen der interventionellen Kardiologie dar². Als Restenose bezeichnet man einen Lumenverlust des behandelten Gefäßes innerhalb von 6 Monaten nach Intervention, der auf eine überschießende Reaktion der Gefäßwand auf die initiale Verletzung zurückzuführen ist. Angiographisch ist die signifikante Restenose als eine Reduktion des Gefäßlumens um mehr als 50% oder um mehr als 30% des initialen, postinterventionellen Lumens definiert.

Verschiedene Studien ergaben eine Restenoserate von ca. 30-40% sechs bis sieben Monate nach primär erfolgreicher PTCA¹⁵. Die bisher einzige erfolgreiche Therapie zur Reduktion der koronaren Restenose stellte die Implantation intrakoronarer Stents dar, die das Risiko der Restenose um ungefähr 10% reduziert². Dennoch lagen die angiographischen Restenoseraten weiterhin bei 20- 30% der behandelten Patienten, und bei 20% der Patienten ist eine erneute Intervention nötig^{21,73}. Erst durch die Einführung Medikamente-freisetzender Stents (Drug-eluting Stent = DES) konnte eine signifikante Reduktion der Restenose nach Koronarintervention erreicht werden. Bei den derzeit gebräuchlichsten Typen wird ein in einer Polymer-Beschichtung gebundener Wirkstoff kontinuierlich vom Stent am Ort der Gefäßverletzung über zwei bis vier Wochen freigesetzt. Für zwei Substanzen konnte eine gute Wirksamkeit nachgewiesen werden: Rapamycin und Paclitaxel. In den ersten Studien konnte unter Verwendung Rapamycin- beziehungsweise Paclitaxel-beschichteter Stents eine Reduktion der klinischen relevanten Restenoseraten von 16% auf 4%⁴⁸ respektive von 15% auf 4%⁸² nachgewiesen werden. Trotz dieser Erfolge stellen diese Stents derzeit jedoch wegen

ihrer deutlich höheren Kosten noch kein Therapieverfahren dar, welches unselektiv bei jeder Koronarintervention angewandt werden kann.

2.2 Pathophysiologische Grundlagen der Restenose im Menschen

Während der größte Teil des Lumenverlustes nach PTCA auf einen sich negativ auswirkenden Umbau der arteriellen Gefäßwand zurückzuführen ist, sind über 90% des Lumenverlustes nach PTCA mit Stentimplantation auf die Bildung einer sogenannten Neointimahyperplasie zurückzuführen⁴⁶. Histologisch besteht die humane Neointima großen Teils aus lose angeordneter extrazellulärer Matrix³⁸. Der Hauptteil der zellulären Komponente der humanen Neointima der Restenose im Stent besteht nahezu ausschließlich aus glatten Muskelzellen³⁸, von denen zwischen zwei und 20 Prozent für verschiedene Proliferationsmarker positiv sind³⁶.

In der Pathophysiologie der Neointimaformation kommt es als Antwort auf die Verletzung der arteriellen Gefäßwand zu einer Reihe von intravaskulären Veränderungen, die als überschießender Heilungsprozess aufzufassen sind. Die Katheterintervention induziert eine Gefäßwandverletzung, die bis in die tiefen Mediaschichten reicht. Die Stärke dieser initialen Verletzung korreliert mit dem Ausmaß der Neointimabildung und der Restenose, da eine Verletzung der Media mit einer um 29% erhöhten Restenoserate signifikant korreliert ist¹⁹.

Die Antwort der Gefäßwand auf die initiale Verletzung lässt sich grob in vier Phasen einteilen^{38,53}:

- I. Zunächst bewirkt die Gefäßverletzung durch die Stentimplantation eine endotheliale Denudation sowie eine Plaqueruptur mit Freilegung subendothelialer Gefäßschichten.
- II. Dies führt zur Blutgerinnungsaktivierung mit einer konsekutiven Thrombozytenablagerung, -aktivierung und Thrombusformation mit Freisetzung von Mitogenen sowie zur Rekrutierung von Monozyten und Granulozyten.
- III. Unter dem Einfluss von chemotaktisch und proliferativ wirkenden Botenstoffen kommt es zur Entdifferenzierung, Proliferation und Emigration glatter Muskelzellen.
- IV. Die Entzündungs- und Proliferationsprozesse sind im Wesentlichen innerhalb des ersten Monats nach Stentimplantation abgeschlossen. Entdifferenzierte glatte Muskelzellen machen zu diesem Zeitpunkt den ganz überwiegenden zellulären Bestandteil der Neointima aus. Der weitere Lumenverlust beruht dann auf der

überschießenden Bildung extrazellulärer Matrix, was letztendlich zum Lumenverlust des Gefäßes und zur Restenose führt^{18,88}.

Eine große Anzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen sind an der Reaktion der Gefäßwand auf die Verletzung beteiligt, in dem diese Faktoren die Entdifferenzierung und Proliferation glatter Muskelzellen stimulieren. Dazu gehören beispielsweise PDGF, FGF und TGF- β , die hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene reguliert werden. PDGF - der zum großen Teil in den α -Granulen von Blutplättchen gespeichert und von dort bei Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt wird - stimuliert die Zellteilung und die Migration glatter Muskelzellen *in vitro*⁶⁴. *In vivo* führte die Inhibierung von PDGF durch einen blockierenden Antikörper zu einer Reduktion der Neointimaformation im Rattenmodell. Hierbei zeigte sich aber, dass der therapeutische Effekt einer Blockade von PDGF nicht auf einer Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen, sondern vielmehr auf einer Inhibierung der Migration glatter Muskelzellen beruht²⁰.

Neben PDGF sezernieren aktivierte Thrombozyten aber auch noch andere Wachstumsfaktoren, wie TGF- β , den Epidermal Growth Factor und Thrombin, welche auf glatte Muskelzellen mitogen wirken⁵³.

Hinzu kommt, dass ausser den Blutplättchen auch noch andere Zellen der Gefäßwand Wachstumsfaktoren freisetzen. Beispielsweise exprimieren vaskuläre glatte Muskelzellen TNF- α , Interleukine, Chemokine, Matrixmetalloproteinasen und Angiotensin⁶⁴. Viele dieser Faktoren stimulieren ihrerseits selbst das Wachstum und die Migration glatter Muskelzellen, was zu einer autokrinen Schleife führen und eine Erklärung dafür bieten könnte, daß der Prozeß der Neointimaformation auch lange nach Abklingen des initialen Stimulus anhält.

2.3 Bedeutung von Entzündungsreaktionen in der Pathophysiologie der Restenose

Präklinische Studien ergaben Hinweise dafür, dass eine intimale Entzündungsreaktion in der Pathophysiologie der Restenose im Stent eine Rolle spielt. Im Kaninchenmodell kam es nach Stentimplantation in die A. iliaca zu einer frühen Monozytenadhäsion, die mit dem Ausmaß der Proliferation neointimaler glatter Muskelzellen und letztendlich mit der Neointimadicke korrelierte⁶¹. Im Schweinmodell korrelierte die lymphohistiozytäre Zellinfiltration ebenfalls mit einer erhöhten Neointimadicke und einem größeren Lumenverlust des Gefäßes³⁹. Dementsprechend zeigten mehrere Studien, dass die therapeutische Hemmung der Entzündungsreaktion und der Rekrutierung von Entzündungszellen zu einer Reduktion der

Neointimabildung führt. So konnte im Kaninchenmodell nach Stentimplantation in die A. iliaca die Leukozyteninfiltration durch einen inhibierenden Antikörper gegen das leukozytäre Adhäsionsmolekül Mac-1 um die Hälfte reduziert werden, wodurch sich auch die Neointimabildung signifikant reduzieren ließ⁶⁰. Dementsprechend zeigten P-Selektin^{-/-}-Mäuse nach Ligatur der A. carotis eine verminderte Leukozyteninfiltration und ein um 76% reduziertes Neointima/Media-Verhältnis⁴⁰. Ebenso führte die Gabe eines blockierenden Antikörpers gegen ICAM-1 zu einer signifikanten Reduktion der Neointimabildung um 50% im Restenosemodell der A. carotis der Ratte⁹⁴.

Auch an menschlichen Neointimaproben konnte die Infiltration der Neointima mit inflammatorischen Zellen nachgewiesen werden. So wird eine frühe Infiltration um die Stentstreben durch neutrophile Granulozyten beschrieben, die sich aber innerhalb der ersten 30 Tage nach Intervention zurückbildet¹⁸. Im Gegensatz dazu läßt sich eine Infiltration von chronisch-entzündlichen Zellen, wie Lymphozyten und Makrophagen, sowohl in der Frühphase als auch nach mehr als 6 Monate nach Stentimplantation nachweisen¹⁹. Interessanterweise korreliert das Ausmaß dieser Entzündungsreaktion mit der Stärke der Gefäßwandverletzung, insbesondere mit der Verletzung der Media: Stents, die in der Nähe einer Mediawandverletzung liegen oder die den Lipidkern des atherosklerotischen Plaques penetrieren, weisen eine signifikant stärkere Infiltration mit inflammatorischen Zellen auf als Stents, die nur Kontakt zum fibrösen Plaque haben⁸⁸. Den Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Gefäßwandverletzung, der dadurch induzierten Entzündungsreaktion und der Dicke der Neointima untersuchte eine morphologische Arbeit von Farb und Mitarbeitern¹⁹ an 87 Koronararterien. Die Autoren zeigten, dass die Verletzung der Arterienmedia durch die Stentimplantation und die Penetration des Lipidkern des atherosklerotischen Plaques durch die Stentstruts eine anhaltende, chronische Entzündungsreaktion auslöst, die signifikant mit einer verstärkten Neointimabildung und einer höheren Restenoserate assoziiert ist. Diese Daten legen nahe, dass die durch die Gefäßwandverletzung induzierte Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle in der Neointimaformation im Menschen spielt. Das Vorliegen eines pro-inflammatorischen Milieus konnte auch in einer Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. So zeigte die Genexpressionsanalyse humaner Neointima aus In-Stent-Restenosen die Aktivierung von allgemein pro-inflammatorischen Genen wie Cyclooxygenase-1 und dem 70-kDa heat shock protein B⁹⁶. Interessanterweise waren auch 37 Interferon- γ abhängige Gene vermehrt exprimiert. Die Bedeutung des Interferon- γ -

Signaltransduktionsweges für die Neointimaformation konnte auch *in vivo* belegt werden. So wiesen Interferon- $\gamma^{-/-}$ - Mäuse nach Ligatur der A.carotis eine signifikant verminderte Neointimaformation und Mediaproliferation im Vergleich zu Wildtypmäusen auf⁹⁸.

2.4 Bedeutung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in der Pathophysiologie der Restenose

Neben der beschriebenen Bedeutung der Entzündungsreaktion für das Auftreten einer Restenose konnte kürzlich ein weiterer, bisher unerkannter Mechanismus der Neointimaformation identifiziert werden. So konnten im Genexpressionsprofil humaner Neointima Marker hämatopoetischer Vorläuferzellen wie CXCR4, Integrin beta 7 und CD13 beobachtet werden⁹⁸. Diesen Daten entsprechend konnten Sata et al.⁶⁶ im A. femoralis-Verletzungsmodell der Maus zeigen, dass 63% der neointimalen Zellen und 45% der medialen Zellen nach Gefäßverletzung aus dem Knochenmark abstammen. Des Weiteren konnten die Autoren zeigen, dass diese Zellen Eigenschaften glatter Muskelzellen aufweisen. So waren diese Zellen positiv für alpha-smooth-muscle-Actin. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte in einer anderen experimentellen Arbeit zeigen, dass der Anteil hämatopoetischer Vorläuferzellen in der Neointima wesentlich vom verwendeten Tiermodell abhängt. So waren im Gegensatz zur Gefäßverletzung mit dem Führungsdraht nach Platzierung einer perivaskulären Manschette deutlich weniger aus dem Knochenmark stammende Zellen zu beobachten und in der nach Ligatur der Arterie entstehenden Neointima praktisch überhaupt keine dieser Zellen nachweisbar⁸⁴. Dies deutet darauf hin, dass eine endoluminale Verletzung einhergehend mit Endotheldenudation und Mediaruptur für die Rekrutierung hematopoetischer Vorläuferzellen wesentlich ist. Diese Rekrutierung zirkulierender Vorläuferzellen von glatten Muskelzellen konnten Schober et al. nach Drahtverletzung der A.carotis in der Maus bestätigen⁶⁹. Darüberhinaus zeigte sich, dass das Chemokin Stromal-derived-Factor-1 (SDF-1alpha) eine wesentliche Rolle für die Rekrutierung dieser Zellen an den Ort der Gefäßverletzung spielt. Bereits in *in-vitro*-Versuchen konnte von Jo et al.³⁰ nachgewiesen werden, dass SDF-1 chemotaktisch auf hämatopoetische Vorläuferzellen wirkt. Im Mausmodell von Schober führte eine Blockade von SDF-1 alpha mittels eines monoklonalen Antikörpers sowohl zu einer Reduktion der Menge neointimaler SMC als auch zu einer Verminderung der neointimalen Fläche⁶⁹.

Die Bedeutung dieser im Tiermodell belegten Mechanismen für die Restenose im Menschen ist jedoch noch ungeklärt. Erste Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung hämatopoetischer Vorläuferzellen auf die humane Restenose ergab eine Arbeit von Kang et al.³². In dieser kleinen (n=27), randomisierten Studie wurde der Einfluss einer intrakoronaren Infusion peripherer Stammzellen nach Mobilisierung aus dem Knochenmark durch G-CSF als auch die Gabe von G-CSF allein gegenüber unbehandelten Patienten nach akutem Myokardinfarkt verglichen. Überraschenderweise kam es im Vergleich zur Kontrolle (n=7) in der allein mit G-CSF behandelten Gruppe zu einer auffallend hohen Restenoserate, weshalb die Studie vorzeitig abgebrochen wurde. Als mögliche Ursache der hohen Restenoserate wurde eine vermehrte Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen in das Stentareal in Erwägung gezogen.

2.5 Therapeutische Strategien zur Behandlung der koronaren Restenose

Wie bereits erwähnt, ist die bisher erfolgreichste Therapie zur Reduktion der Restenose die Implantation medikamentenfreisetzender Stents, die die Restenoserate auf circa 10% senken konnte.

Vor der Entwicklung dieser lokalen Medikamentenapplikation wurde der Effekt der systemischen Gabe einer Vielzahl von pharmakologischen Wirkstoffen untersucht. Da die Gefäßwandverletzung zu einer Aktivierung der glatten Muskelzellen mit einem erneuten Eintritt in den Zellzyklus der Zellen führt, sah man im anti-proliferativen Ansatz als Option zur Reduktion der Restenose die vielversprechendste Möglichkeit. Die systemische Therapie mit anti-proliferativ wirkenden Substanzen wie Carvedilol^{10,50}, oder zytotoxischen Reagenzien wie Colchicin⁴⁹ blieben in der Therapie der Restenose aber erfolglos.

Neben Methoden des Gentransfers, die aufgrund ihrer geringen Effizienz und hohen Nebenwirkungsrate relativ rasch wieder verlassen wurden, zeigte die Brachytherapie, die in vielen klinischen Studien eingesetzt wurde, zunächst vielversprechende Ergebnisse mit einer signifikanten Reduktion der Restenose. Bei der Brachytherapie wird der Bereich der In-Stent-Restenose während der Koronarintervention kurzzeitig radioaktiven Beta- oder Gamma-Strahlern ausgesetzt, wodurch eine nachfolgende erneute Neointimaprolieration reduziert wird. Dennoch ist auch diese Therapieform durch das Auftreten von zwei schwerwiegenden Komplikationen limitiert⁸⁶. Nach Brachytherapie kam es einerseits signifikant häufiger zum Auftreten einer späten Stentthrombose, die möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass

die Brachytherapie nicht nur das Wachstum glatter Muskelzellen, sondern auch von Endothelzellen hemmt und somit eine Reendothelialisierung der Gefäßwand verhindert⁴⁵. Andererseits kam es im Randbereich des Stents zum Auftreten sogenannter Edge-Restenosen, die dadurch entstehen, dass die Strahlendosis in diesem Bereich nicht mehr anti-proliferativ, sondern vielmehr schon aktivierend und proliferationsfördernd wirkt. Somit stellt auch die zudem noch sehr aufwendige Brachytherapie keine maßgebliche Option zur Therapie der Restenose dar.

In den letzten Jahren fokussierte sich die Aufmerksamkeit der interventionellen Kardiologie zunehmend auf das Makrolidantibiotikum Rapamycin. Dieses Medikament entwickelte sich von einem Antibiotikum ohne klinische Wirksamkeit zu einem vielversprechenden Therapeutikum im kardiovaskulären Bereich, nachdem *in vitro*-Versuche seine ausgeprägte anti-proliferative und migrationshemmende Wirkung auf glatte Muskelzellen belegt haben^{22,29}. Rapamycin ist das natürlich vorkommende Fermentationsprodukt des *Streptomyces hygroscopicus*, der erstmals in einer Bodenprobe von den Oster-Inseln (Rapa Nui-Inseln) identifiziert wurde⁸⁷. Es wurde zunächst vermutet, dass Rapamycin anti-mykotische Wirkungen zeigt, bevor die ausgeprägte immunsuppressive Wirkung des Medikaments nachgewiesen wurde⁷². Da Rapamycin zunächst hauptsächlich als Immunsuppressivum eingesetzt wurde, nahm man zunächst seine potentiellen Möglichkeiten als Therapeutikum für kardiovaskuläre Erkrankungen nicht wahr, obwohl es zunehmend Daten gab, die zeigten, dass es einen positiven Effekt auf entscheidende biologische Eigenschaften von glatten Muskelzellen hat^{17,22,54}.

Die Wirkung von Rapamycin wird durch die Bindung an seinen intrazellulären Rezeptor, das FK506 Binding Protein (FKBP-12), vermittelt. Der Komplex aus FKBP12 und Rapamycin inhibiert die hochkonservierte Proteinkinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin)³¹. Die mTOR Kinase ist essentiell für die Viabilität der Zellen. Sie reguliert das Zellwachstum durch eine Vielzahl von Ansatzpunkten, unter anderem durch eine Aktivierung der Transkription, der Actinorganisation, eine Steigerung des transmembranösen Transports von Aminosäuren und der Genese von tRNA-Molekülen und Ribosomen⁶⁸. Auch aktiviert sie die Translation und die Zellzyklusprogression, indem sie zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der p70 S6 Kinase (p70 S6K) führt³¹. Die p70 S6K wird in humanen glatten Muskelzellen durch Wachstumsfaktoren wie PDGF und Angiotensin aktiviert und ist ein wichtiger Regulator der Zellzyklusprogression⁵¹. Rapamycin hemmt die Aktivierung der

p70S6K in glatten Muskelzellen und führt in diesen Zellen zur verminderten Migration und Proliferation⁵³.

Wegen seiner anti-inflammatorischen Eigenschaften wird Rapamycin schon länger in der Transplantationschirurgie als potentes Immunsuppressivum eingesetzt. Hier zeigte sich im Tiermodell der Ratte, dass die Abstossungsreaktion nach Herztransplantation in zuvor sensibilisierten Tieren durch eine Rapamycinbehandlung signifikant verzögert werden kann⁹³. Ursächlich hierfür wurde vor allem eine verminderte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-8 und eine damit einhergehende deutlich verminderte Infiltration mit neutrophilen Granulozyten gesehen⁹³. In einer anderen Studie an der Ratte reduzierte die zusätzliche Therapie mit Rapamycin in Kombination mit Cyclosporin A nicht nur das Auftreten einer Transplantatvaskulopathie, sondern konnte bereits vorhandene Intimaverdickungen wieder vermindern⁵⁵. In bezug auf die Neointimafomation nach Gefäßverletzung konnte in mehreren Tiermodellen gezeigt werden, dass Rapamycin die Neointimabildung durch Erhöhung des Zellzyklusinhibitors p27(KIP1) und Hemmung des Retinoblastomproteins signifikant reduziert^{22,45}.

Beeindruckenderweise war in den ersten klinischen Studien nach Implantation Rapamycin-freisetzender Stents keine signifikante Restenose zu beobachten. Dabei spielte es in der ersten kleinen Studie (n=30) keine Rolle, ob der Wirkstoff überwiegend innerhalb von 15 (n=15) oder 30 Tagen (n=15) freigesetzt wurde⁷⁹. Weder bei der ersten Kontrollangiographie nach vier Monaten⁷⁹, noch im Langzeitverlauf nach einem⁸⁰ und zwei⁸¹ Jahren konnten signifikante Restenosen nachgewiesen werden. Diese vielversprechenden Ergebnisse liessen sich in einer randomisierten Studie, in der auch Patienten mit einem höheren Restenoserisiko eingeschlossen waren, bestätigen⁴⁸. Die Reduktion der In-Stent-Restenose schlug sich auch klinisch in einer niedrigeren Notwendigkeit der erneuten Revaskularisierung des Zielgefäßes nieder. So mussten sich nur 4.1% der mit einem Rapamycin-freisetzendem Stent behandelten Patienten einer erneuten Koronarintervention unterziehen, während dieser Prozentsatz in der mit einem konventionellen Stent behandelten Gruppe bei 16.6% lag⁴⁸. Kürzlich konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass Rapamycin auch in der Behandlung der In-Stent-Restenose von Bedeutung sein kann. So liess sich die angiographische Restenoserate nach erneuter Ballonangioplastie durch eine orale Hochdosistherapie signifikant von 42.2% auf 22.1% reduzieren²⁵. Dies ist insofern bemerkenswert, da eine lokale Freisetzung rein anti-proliferativer Substanzen wie eines Paclitaxel-Derivats mittels eines polymerbeschichteten

Stents⁴² keinen dauerhaften Effekt in der Behandlung der In-Stent-Restenose zeigte. Dies weist darauf hin, dass auch die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Rapamycin wesentlich zu seiner Wirksamkeit beitragen.

2.6 Fragestellung

Die genauen molekularen Mechanismen, die der Neointimaformation im Menschen zugrunde liegen, sind trotz dieser jüngsten therapeutischen Erfolge nicht vollständig geklärt. Aufgrund der nur begrenzten Verfügbarkeit humaner Neointima aus koronaren Restenosen im Stent basiert unser bisheriges Wissen über die frühen Pathomechanismen der Neointimaformation nahezu ausschließlich auf tierexperimentellen Daten. In den wenigen Studien, die humane Proben untersuchten, wird meist die dann schon bestehende Neointima untersucht^{18,19,38,96,98}. Hier handelt es sich dann um Proben aus dem Stadium IV (siehe 2.2), bei denen die akuten inflammatorischen und proliferativen Vorgänge abgeschlossen sind. Darüberhinaus haben sich die meisten im Tiermodell bisher entwickelten therapeutischen Strategien nicht auf den Menschen übertragen lassen⁷⁰. Diese Tatsache legt nahe, dass es wesentliche Unterschiede in der Neointimabildung zwischen Mensch und Tier gibt. Deshalb war es zunächst Ziel dieser Arbeit, das Genexpressionsprofil humaner Arterien im frühen Stadium nach Ballonangioplastie zu untersuchen, um dadurch neue, bisher im Menschen nicht bekannte pathophysiologische Mechanismen zu identifizieren. Darüberhinaus sollte der Einfluss von Rapamycin untersucht werden, um ein besseres Verständnis seiner Effekte zu bekommen und so möglicherweise Hinweise auf neue therapeutische Optionen zu erlangen. Für die Genexpressionsanalyse wurde ein PCR-Protokoll benutzt, welches gemeinsam mit Herrn Dr. Christoph Klein vom Institut für Immunologie entwickelt wurde^{37,96}. Mit Hilfe dieses Verfahrens war es möglich, aus den Nierenarteriensegmenten repräsentative cDNAs zu erstellen und somit eine Genexpressionsanalyse durchzuführen.

Die moderne Methode der Genexpressionsanalyse eröffnet die Möglichkeit, die Expression von Tausenden von Genen simultan in einer Probe zu analysieren und hat damit das Potential, eine sehr große Zahl an Gendysregulationen zu identifizieren (Abb. 1).

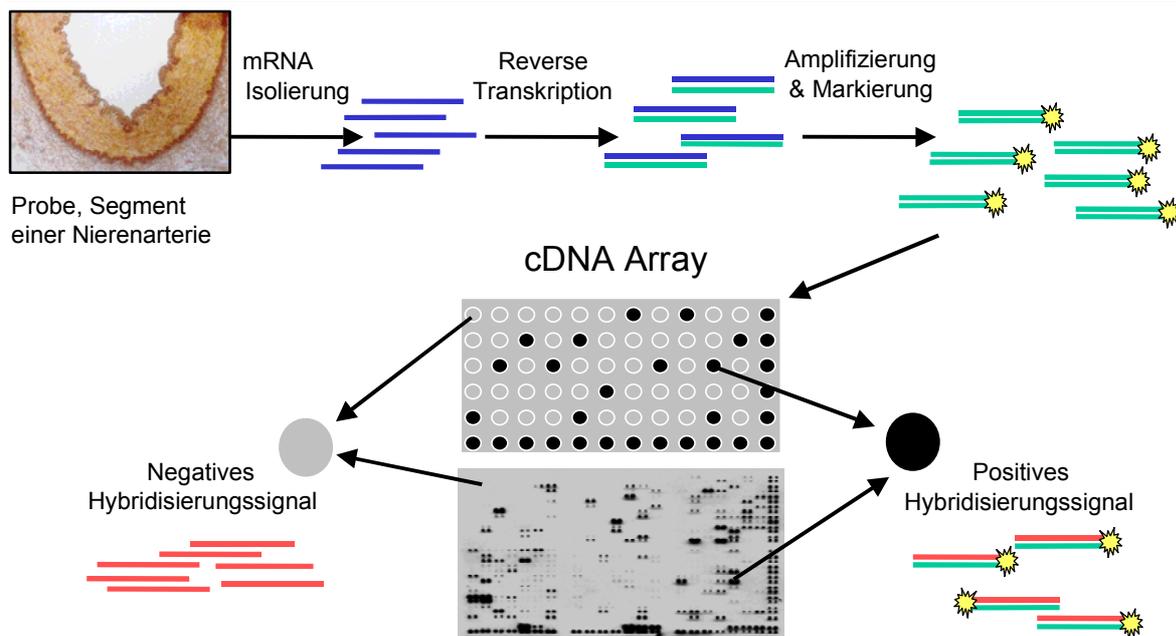


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Methode der Genexpressionsanalyse nach globaler PCR-Amplifizierung der Organkulturproben.

3. Material und Methoden

3.1 Gewinnung und Vorbereitung der Organkulturproben

Während geplanter Nephrektomien an der urologischen Klinik der Universität Ulm und den urologischen Abteilungen der Kliniken Biberach und Heidenheim wurden Teile der Renalarterien von 15 Patienten (11 Männer/ 4 Frauen; Durchschnittsalter \pm Standardabweichung: $66,5 \pm 10$) isoliert. Die Studie wurde durch die Ethikkommission des Klinikums Ulm genehmigt. Alle Patienten wurden über die Entnahme der Arteriensegmente aufgeklärt und stimmten der Verwendung zu. Senkrecht zur Gefässachse wurden jeweils 4mm dicke Segmente abgesetzt. Während des Transportes zum Labor und der Präparation wurden die Segmente in sterilem Hepes-gepufferten (15mM) und Serum-freien Kulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium) aufbewahrt.

3.2 Ballon-Dilatation und Kultivierung humaner renaler Arteriensegmente in vitro

Für die Angioplastie wurden die Arteriensegmente auf einem Ballonkatheter mit 3mm Durchmesser (Medtronic 14K2030E) plaziert und für 60 Sekunden bei einem Inflationsdruck von 9 Bar dilatiert. Als Füllungsmedium der Ballonkatheter wurde Aqua bidest. verwendet. Nach Ballondilatation der einzelnen Segmente wurden diese innerhalb von 15 Minuten (n=6) konserviert oder in six-well Platten (Tecnomara, Fernwald, D) überführt und für 21 Tage (n=4) und 56 Tage (n=5) bei 37°C und 5% Kohlendioxid kultiviert. Der frühe Zeitpunkt sollte dazu dienen, die unmittelbaren Veränderungen nach Ballonangioplastie zu untersuchen. Die späteren Zeitpunkte wurden gemäss den Ergebnissen einer Vorarbeit festgelegt, da nach 21 Tagen der Anteil proliferierender Zellen am höchsten war und andererseits nach 56 Tagen eine maximale Neointimaformation bestand⁸⁹. Während der Kultivierung waren die Segmente vollständig von einer 1:1-Mischung (vol/vol) aus Waymouth's MB 752/1 und Ham F12 Nahrungsmischung (Cambrex, Vervier, B) angereichert mit 15% fetalem Kälberserum (Cambrex, Vervier, B) umgeben. Alle zwei bis drei Tage wurde das Kulturmedium gewechselt.

Rapamycin wurde für 21 (n= 3) und 56 Tage (n= 4) mit einer Konzentration von 100ng/ml zugesetzt. Die für die Genexpressionsanalyse verwendeten Proben (n=27) wurden nach Kultivierung bis zum Zeitpunkt der mRNA-Isolierung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, die

übrigen Proben wurden in 4%igem, gepuffertem Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Germany) fixiert und in Paraffin eingebettet. Für die Kontrollgruppe (n=5) wurden unbehandelte Arteriensegmente verwendet. Alle kultivierten Arteriensegmente wurden freundlicherweise durch Herrn PD Dr. Rainer Voisard (II. Medizinische Klinik der Universität Ulm) zur weiteren Untersuchung zur Verfügung gestellt.

3.3 Reverse Transkription der mRNA humaner renaler Arteriensegmente und globale PCR-Amplifizierung

Die mRNA wurde mittels Superscript II (Gibco) mit dem CFL5c-Primer [5'-(CCC)₅ GTC TAG A (NNN)₂-3'] zunächst in cDNA umgeschrieben. In der folgenden Tailingreaktion wurden durch die Terminale Deoxynucleotide Transferase (MBI Fermentas) an das freie 5'Ende der cDNA zwischen 15-20 dGTP-Basen angehängt. Somit kann die so modifizierte cDNA mittels PCR mit dem CP2-Primer [5'-TCA GAA TTC ATG (CCC)₅-3'] effektiv amplifiziert, markiert und auf z.B. kommerziell erwerbliche cDNA-Arrays hybridisiert werden (Abb.1).

Im Einzelnen wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen: Die schockgefrorenen Nierenarteriensegmente wurden in einem Milliliter Lysis-Puffer (Dyna) lysiert und magnetische Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (Dyna) wurden für 30 Minuten bei 4°C hinzugefügt, um die mRNA zu extrahieren. Nach alternierendem Waschen mit Waschpuffer-1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5% Igepal) und Waschpuffer-2 (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5% Tween-20) wurde die an die Beads gebundene mRNA in First Strand Buffer (Gibco) mit 0,01 M DTT, 0,25 % Igepal, 50 µM CFL5c-Primer [5'-(CCC)₅ GTC TAG A (NNN)₂-3'], 0,5 mM dNTP, und 200 U Superscript II (Gibco) in einer 20 µl Reaktion revers transkribiert. Nach 45 Minuten bei 44°C wurden die Beads mit Tailingwaschpuffer (50 mM KH₂PO₄, pH 7,0, 1 mM DTT, 0,25% Igepal) gewaschen. Nach Denaturierung (94°C, vier Minuten) und Lösung der cDNA von den Beads wurde die Tailingreaktion in einem Volumen von 10 µl mit 4 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT, 0,2 mM dGTP, 10 mM KH₂PO₄, und 10 U terminaler Deoxynucleotidtransferase (MBI Fermentas) bei 37°C für 24 Minuten durchgeführt.

Die cDNA wurde im Anschluss mittels PCR im Puffer 1 (ExpandTM Long Template, Roche) mit 3% deionisiertem Formamid, 1,2 µM CP2-Primer [5'-TCA GAA TTC ATG (CCC)₅-3'], 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 Sekunden, 65°C für 30 Sekunden, 68°C für 2 Minuten; im Anschluss daran 20 Zyklen: 94°C für 15 Sekunden, 65°C für 30 Sekunden, 68°C für 2:30 + 0:10 Minuten/Zyklus und einer abschließenden Extension von 68°C für 7 Minuten.

3.4 Hybridisierung von cDNA-Arrays und Detektion mittels Chemilumineszenz

25 ng von jeder zu untersuchenden cDNA wurden während der PCR mit Digoxigenin-11-dUTP (50 µM Digoxigenin-11-dUPT, Dig-dUTP) (Roche) in Anwesenheit von 300 µM dTTP und den anderen dNTPs in einer Konzentration von 350 µM markiert.

Atlas Human Cancer 1.2-, Human 1.2-, und Cardiovascular-Arrays (Clontech, Palo Alto, USA; www.clontech.com zur Identifizierung der untersuchten Gene) wurden über Nacht in Anwesenheit von 50 µg/ml E. coli-DNA, 50 µg/ml *pbluescript*-DNA and 15 µg/ml Heringsperm-DNA in *DigEasyHyb*-Puffer (Roche) bei 44°C prähybridisiert. Die denaturierte, markierte cDNA- Sonde wurde anschließend zur Hybridisierungslösung hinzugefügt und für 48 Stunden bei 44°C inkubiert. Die Arrays wurden anschließend nach Anleitung des Herstellers gewaschen, wobei zwei abschließende Waschgänge in 0,1x SSC/0,1 % SDS für 30 Minuten bei 68°C hinzugefügt wurden. Der Nachweis der gebundenen cDNA-Probe wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem *Digoxigenin Detection System* (Roche) durchgeführt. Hierbei kommt es in den Bereichen auf dem Array gebundener, markierter cDNA-Sonden zur Chemilumineszenz. Durch Inkubation mit speziellen, für Chemilumineszenz empfindlichen Filmen wird ein exaktes Abbild des Arrays auf dem Film erzeugt. Durch die anschließende Entwicklung der Filme wird das Abbild des Arrays und damit die enthaltene Information dauerhaft haltbar gemacht.

3.5 Analyse der Daten der cDNA-Arrays

Die entwickelten Filme wurden mit einem kalibrierbaren Scanner eingescannt und mit der *array vision™* Software (Imaging Research Inc.) ausgewertet. Der Hintergrund wurde subtrahiert und die Hybridisierungssignale wurden auf die Signalintensität der neun Housekeeping-Gene, die sich auf jedem Filter befanden, normalisiert. Hierbei bekam die durchschnittliche Signalintensität der Housekeeping-Gene einen numerischen Wert von eins und der Hintergrund einen numerischen Wert von Null. Eine relative Signalintensität von $\geq 0,05$ im mittleren Durchschnitt der Hybridisierungssignale einer Gruppe wurde als positives

Signal gewertet, da man diese Signale mittels genspezifischer PCR bestätigen konnte. Unterschiede im medianen Expressionsniveau zwischen den verschiedenen Kulturkonditionen von $\geq 2,5$ -fach wurden weiter statistisch analysiert.

3.6 Validierung der cDNA-Daten mittels genspezifischer PCR

Eine Auswahl an differentiell exprimierten Genen wurde durch eine genspezifische PCR weiter validiert. Die Amplifizierung wurde mit 2,5 ng einer jeden cDNA in einem Reaktionsvolumen von 25 μ l mit PCR Puffer (Sigma), 200 μ M dNTPs, 0,1 μ M eines jeden Primers und 0.75 U Taq Polymerase (Sigma) durchgeführt. Die Primer mit einer Länge von 22-24 bp wurden mit Hilfe der Software Vector NTI 7 (Informax Inc.) erstellt. Die mit diesen Primern erhaltenen PCR-Produkte wiesen eine Länge von 170-300 Basenpaaren auf. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,5 μ g/mL) elektrophoretisch getrennt. Digitale Bilder der Gele mit einer Auflösung von 28 Pixel/cm wurden ebenfalls mit *array vision*TM Software (Imaging Research Inc.) ausgewertet. Hierbei erhielt der Hintergrund einen numerischen Wert von Null und die mittlere Signalintensität des ‚house –keeping‘ Gens beta-Actin einen Wert von Eins.

3.7 Morphometrische Analyse

Für die morphometrischen und immunhistochemischen Analysen wurden die Arteriensegmente in 4% Formaldehyd (pH 7,0) fixiert und in Paraffin eingebettet. Für die morphometrischen Untersuchungen wurden deparaffinisierte Schnitte der einzelnen kultivierten Segmente mit einer modifizierten Elastica-van-Giesson-Färbung (Chroma, Köngen, Germany) angefärbt. Für die Berechnung der mittleren Gefäßwanddicke nach Ballonangioplastie wurden die Schnitte der einzelnen Segmente jeweils drei Mal mit einem computerisierten digitalen Bildanalysegerät (Bioquant TM System 4 R+M Biometrics, Bilancy Consulting, Düsseldorf, Germany) ausgewertet. Hiermit wurden jeweils drei Flächen in mm² bestimmt:

Fläche A: Lumenfläche

Fläche B: Lumenfläche zuzüglich der neointimalen Fläche

Fläche C: Gesamte Fläche innerhalb der Lamina elastica externa, bestehend aus Media, Plaque-Neointima, Neointima und Lumen

Nach Ballonangioplastie konnten die einzelnen Flächen weiterhin bestimmt werden, die neu entstandene Fläche wurde als Neointima bezeichnet. Die Fläche der Neointima wurde wie folgt berechnet: Fläche B - Fläche A.

Um die unterschiedlichen Lumina der einzelnen Segmente mitzubersichtigen, wurde die relative Neointimastärke in Prozent wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Neointimafläche (Fläche B - Fläche A)} \times 100}{\text{Media, Plaque-Neointima, Neointima und Lumen (Fläche C)}}$$

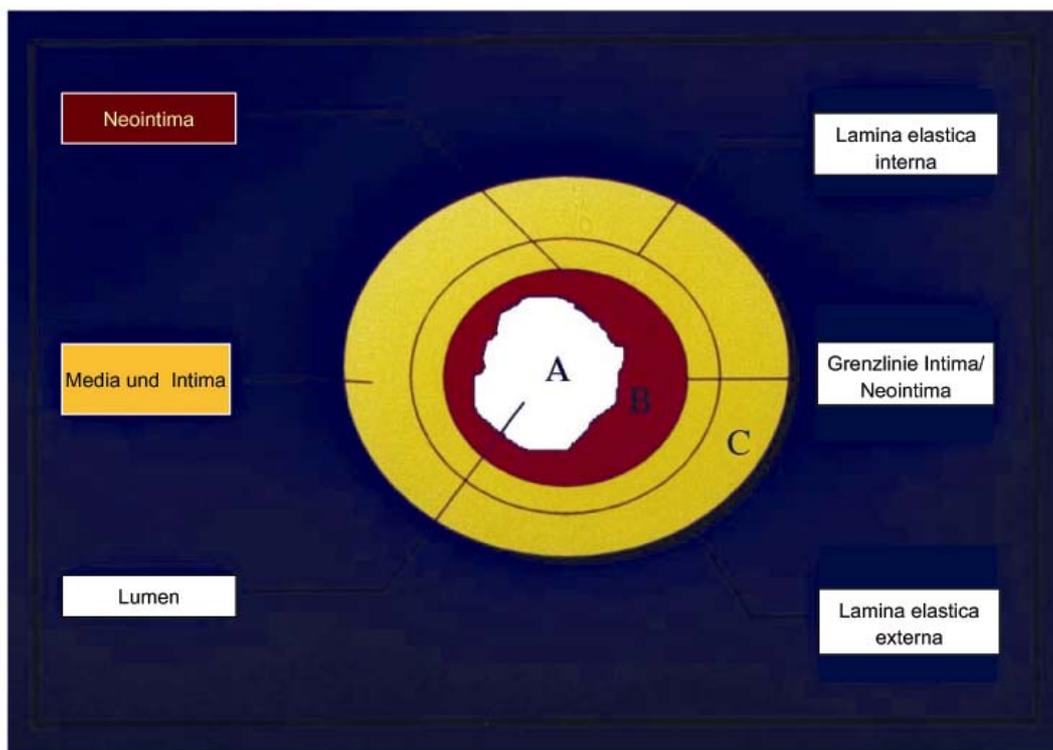


Abbildung 2: Schematische Darstellung der morphometrischen Analyse (adaptiert von Voisard et. al.)

3.8 Immunhistochemische Analyse

Für die Immunhistochemie wurden Paraffinschnitte mit einer Dicke von 4µm ebenfalls entparaffinisiert, dehydriert und zur Antigendarstellung für vier Minuten in Citratpuffer (10 mM, pH 6.0) druckerhitzt. Anschließend wurde die endogene Peroxidase (1% H₂O₂/methanol; 15 Minuten) geblockt und die Schnitte mit 4% dried skim milk in Antibody Diluent (Dako) präinkubiert. Zur Immunfärbung wurde die Streptavidin-horseradish-

peroxidase Technik (Dako ChemMate Detection Kit) mit einem sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper benutzt. Als primärer Antikörper wurde ein Antikörper gegen β -Thromboglobulin in einer Verdünnung von 1:200 benutzt. Dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. E.Brandt (Forschungszentrum Borstel, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

3.9 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse sind als mediane Expressionswerte der einzelnen Gruppen dargestellt, alle anderen Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Signifikanz der differentiellen Expression über den Zeitverlauf (Kontrolle, 8 Stunden, 21 und 56 Tage) wurde im Kruskal-Wallis-Test untersucht. Der Einfluss einer Behandlung mit Rapamycin wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Ein P-Wert $<0,05$ wurde als signifikant erachtet. In allen Experimenten wurden nur solche Gene als differentiell exprimiert akzeptiert, wenn das mediane Expressionsniveau zwischen den untersuchten Gruppen einen mehr als $\geq 2,5$ -fachen Unterschied zeigte und gleichzeitig der P-Wert $<0,05$ war. Des Weiteren musste der Unterschied in der medianen Expression mindestens 0,1 betragen, um möglichst nur Gene zu erhalten, die sich mittels gen-spezifischer PCR validieren liessen.

Die hierarchische Clusteranalyse erfolgte mit der Software aus der Arbeitsgruppe von M.Eisen (Gene Cluster/Treeview, Stanford University)¹⁷. Hier wurde ein Clustering der mittleren Verknüpfungen mit einer zentrierten metrischen Korrelation benutzt.

Für die Daten der densitometrischen Auswertung der verschiedenen PCR-Reaktionen wurden die gleichen statistischen Tests angewandt wie in der Genexpressionsanalyse. Alle statistischen Analysen wurden mit dem SPSS Statistikpaket (Versionen 8.0-11.0) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Morphometrische Analyse der Neointimaformation im humanen Orkankulturmodell im Zeitverlauf und unter Einfluss von Rapamycin

Wie Voisard et al. bereits zeigen konnten⁹⁵, kann die in den kultivierten Nierenarteriensegmenten nach Angioplastie entstehende Neointima morphometrisch analysiert werden. 21 Tage nach Angioplastie betrug die Dicke der Neointima $1,44\% \pm 2,27\%$ (\pm Standardabweichung) des Gefäßlumens. Nach 56 Tagen konnte eine weitere Zunahme auf $6,11\% \pm 3,81\%$ des Gefäßlumens beobachtet werden. Die Behandlung der Organkulturen mit Rapamycin führte zu einer kompletten Hemmung der Neointimaformation nach 21 Tagen und zu einer Reduktion der Neointimaformation um 31% nach 56 Tagen. So betrug die neointimale Fläche nach Behandlung mit Rapamycin $4,20\% \pm 4,25\%$ des Gefäßlumens anstelle von $6,11\% \pm 3,81\%$ in der unbehandelten Gruppe. Nach dem morphometrischen Nachweis einer Neointimaformation und der Wirksamkeit von Rapamycin im Organkulturmodell wurden nach den gleichen Kriterien behandelte Proben für die Genexpressionsanalyse verwendet.

4.2 Genexpressionsanalyse im humanen Organkulturmodell mittels cDNA Array Analyse

4.2.1 Vergleichende Genexpressionsanalyse

Zunächst wurde bei allen Proben mittels magnetischer Poly-A Beads (Dynabeads) die enthaltene mRNA extrahiert. Um einen Verlust der sehr empfindlichen mRNA zu verhindern, wurde direkt anschliessend die cDNA-Synthese mittels reverser Transkription durchgeführt. Die erhaltene cDNA wurde danach global amplifiziert, um eine für die Hybridisierung auf cDNA-Arrays ausreichende Menge an cDNA zu erhalten.

Das von Dr. Christoph A. Klein entwickelte Verfahren³⁷ enthält vier wesentliche Elemente, welche eine globale im Verhältnis gleichmässige Amplifizierung gewährleisten:

- 1) Erhalt der Poly-A-mRNA mittels Oligo-dT-beschichteter magnetischer Mikropartikel,
- 2) Verwendung eines eine 5'-Oligo-dC flankierende Region enthaltenden Random-Primers zur cDNA-Synthese,

- 3) eine Tailing-Reaktion mit dGTP am 3'-Ende, wodurch eine 3'-Oligo-dG flankierende Region entsteht,
- 4) und nachfolgende Sequenz-unabhängige, semi-quantitative Amplifizierung mittels eines Poly-dC Primers.

Um die erfolgreiche mRNA-Präparation und cDNA-Synthese mit anschließender globaler cDNA-Amplifizierung zu überprüfen, wurde bei allen erhaltenen cDNAs eine Kontroll-PCR mit Primern für die Housekeeping-Gene β -Aktin, EF-1 α und α -Aktin, als Marker für glatte Muskelzellen, durchgeführt. Eine cDNA-Synthese wurde als erfolgreich angesehen, wenn die PCR-Reaktion zu deutlichen Banden bei allen drei Genen führte. (Abb. 3). Dies war bei allen 27 Proben der Fall und unterstreicht die Robustheit unserer Methode der cDNA-Synthese.

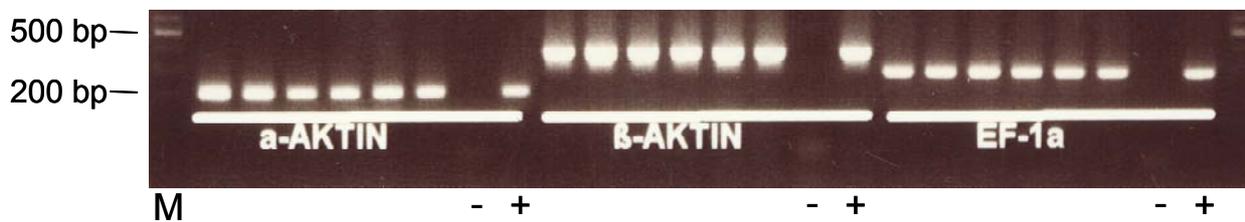


Abbildung 3: Kontroll-PCR von 6 Proben aus dem Organkulturmodell mit genspezifischen Primern für α -Aktin (links), β -Aktin (mittig) und für den Elongationsfaktor-1 α (rechts). (-) Negativkontrolle, (+) Positivkontrolle, (M) Marker, (bp) Basenpaar.

Der Ablauf der cDNA-Synthese aus den einzelnen Proben ist in Abbildung 4 noch einmal schematisch dargestellt.

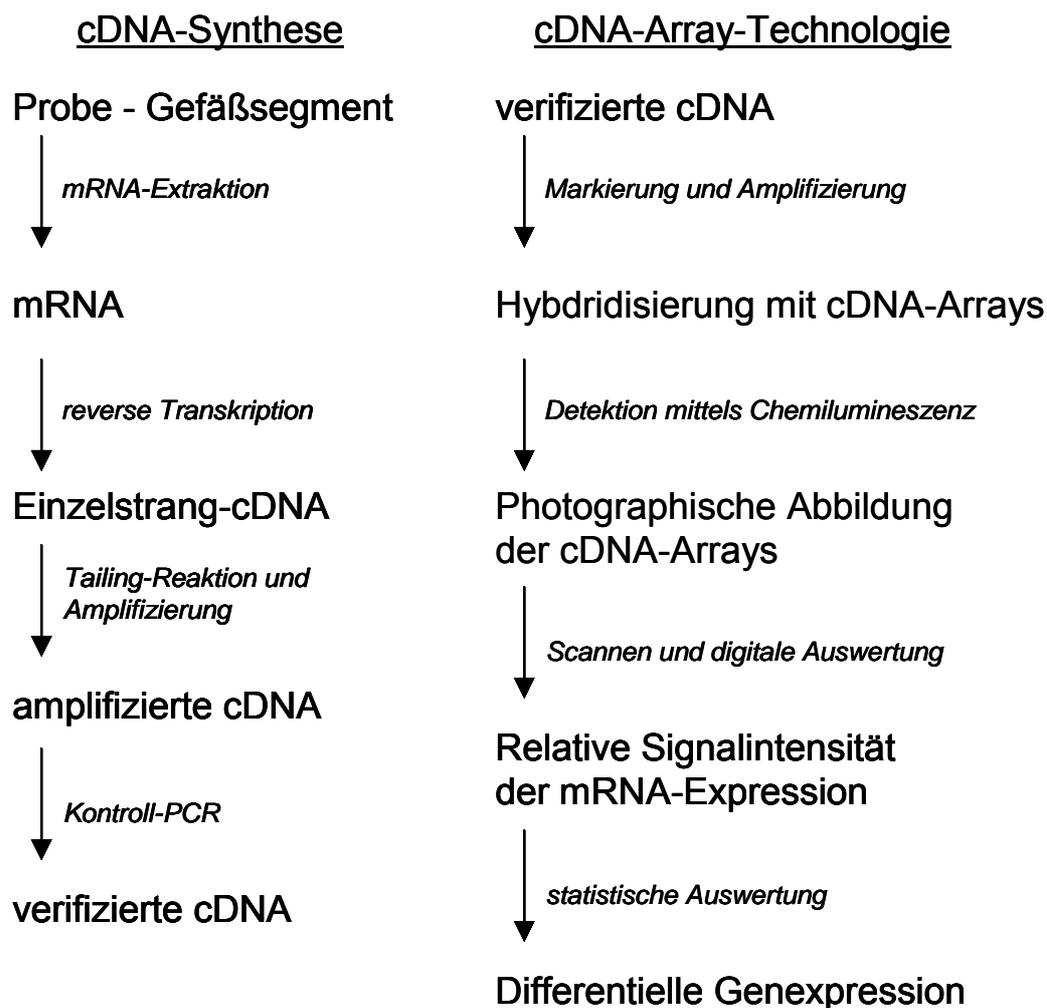


Abbildung 4: Vom Gefäß zur differentiellen Genexpression: Schematischer Ablauf der cDNA-Synthese (linke Hälfte) und der Genexpressionsanalyse mittels cDNA-Technologie (rechte Hälfte)

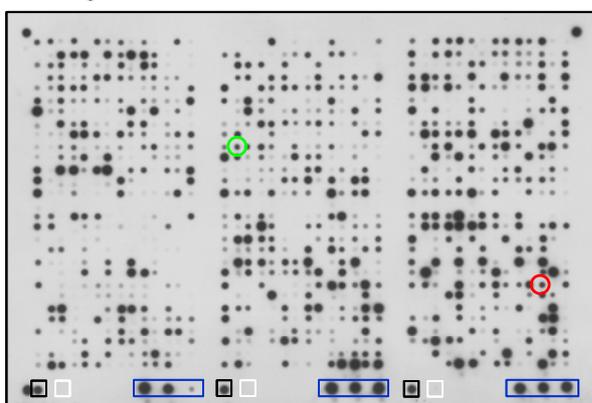
Die verifizierten cDNAs wurden im Anschluß nach Markierung und Amplifizierung mit Digoxigenin-dUTP auf cDNA Arrays hybridisiert. In Abbildung 4 ist der Ablauf der Genexpressionsanalyse schematisch dargestellt. Jede Probe der folgenden Gruppen wurde auf drei cDNA Arrays der Firma Clontech hybridisiert, um die Expression von 2.435 Genen mit bekannter Funktion zu untersuchen.:

- Kontrolle (n=5)
- 0-15 Minuten nach Dilatation (n=6)
- 21 Tage nach Dilatation (n=4)
- 21 Tage nach Dilatation mit Rapamycinbehandlung (n=3)

- 56 Tage nach Dilatation (n=5)
- 56 Tage nach Dilatation mit Rapamycinbehandlung (n=4)

Insgesamt wurden also 81 einzelne Hybridisierungen ausgewertet. Das Ergebnis einer solchen Hybridisierung ist in Abbildung 5 repräsentativ dargestellt. Spots der humanen genomischen DNA, die als Positivkontrolle auf den Filtern aufgebracht sind, zeigten durchweg sehr starke Signalintensitäten, ähnlich wie die 9 *Housekeeping*-Gene, die am unteren Rand des Filters angebracht sind (Abb. 5). Dagegen ergaben die 3 Negativkontrollen in keiner der analysierten Proben ein Signal.

21 Tage nach Ballondilatation



21 Tage nach Ballondilatation + Rapamycin

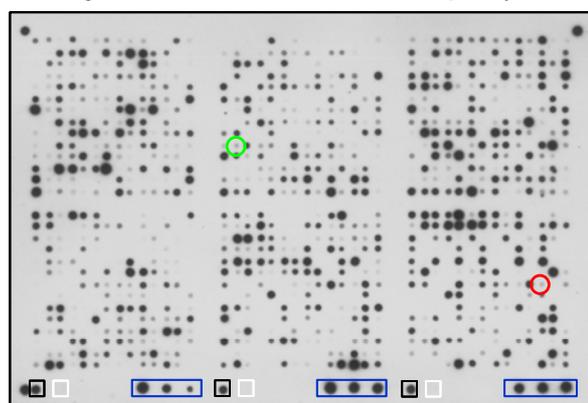


Abbildung 5: Repräsentatives Ergebnis einer Hybridisierung eines cDNA-Arrays (Human 1.2, Clontech) mit einer cDNA nach 21 Tagen Organkultur (links) oder nach 21 Tagen Organkultur und Rapamycinbehandlung (rechts). Der cDNA-Array enthält 1188 Gene inklusive drei Negativkontrollen (weiß umrandet) und 9 Housekeeping Gene (blau umrandet). Genomische DNA (schwarz umrandet) ist als zusätzliche Positivkontrolle am unteren Rand der Membran aufgetragen. Zwei zwischen den beiden Proben differentiell exprimierte Gene sind markiert (rot, GCP-2; grün, JAK1).

4.2.2 Differentielle Genexpression im zeitlichen Verlauf nach Angioplastie

Mit den drei verwendeten Arrays (Cardiovascular, Human1.2, Cancer1.2, Fa. Clontech) wurden insgesamt 2.312 verschiedene Gene auf ihre Expression untersucht. Um unter diesen die im Zeitverlauf regulierten Gene herauszufiltern, wurden folgende Kriterien angewandt:

1. Der Unterschied im medianen Expressionsniveau zwischen den verschiedenen Zeitpunkten mußte mindestens 2,5-fach sein.
2. Der deskriptive P-Wert mußte im Kruskal-Wallis-Test kleiner 0,05 sein.
3. Der Unterschied in der medianen Signalintensität mußte einen Wert grösser 0,1 erreichen, da Signale dieser Intensität noch mittels PCR validierbar waren.

Dieser Algorithmus wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe⁸⁵ und anderen³⁶ zur Auswertung von Genexpressionsanalysen angewandt.

Nach diesen Kriterien waren 264 Gene im Zeitverlauf differentiell exprimiert. Eine zweidimensionale hierarchische Clusteranalyse (Abb. 6) zeigte, dass von diesen die Mehrheit -in Zahlen 212 Gene oder 77%- heraufreguliert war (Abb. 6, Gruppen A-D). 44 Gene (19%) waren über den Zeitverlauf der Neointimaformation dauerhaft herunterreguliert (Abb. 6 Gruppe E). Acht Gene waren differentiell reguliert ohne konsistenten Trend im Zeitverlauf. Bei den übrigen Genen war eine eindeutige Zuordnung über den Zeitverlauf möglich. Im Einzelnen kam es bereits direkt nach Ballonangioplastie zu einer signifikanten Heraufregulation von 65 Genen. Hiervon war ein kleiner Teil (16 Gene) ausschliesslich kurz nach Angioplastie exprimiert (Abb. 6, Gruppe E). 21 Tage nach Ballondilatation zeigten 133 weitere Gene eine gesteigerte Expression. Nach 56 Tagen waren nur noch wenige Gene (n=14) erstmalig vermehrt exprimiert (Abb. 6). Somit war der Einfluss der Gefässverletzung auf die Genexpression 21 Tage nach Ballondilatation am stärksten.

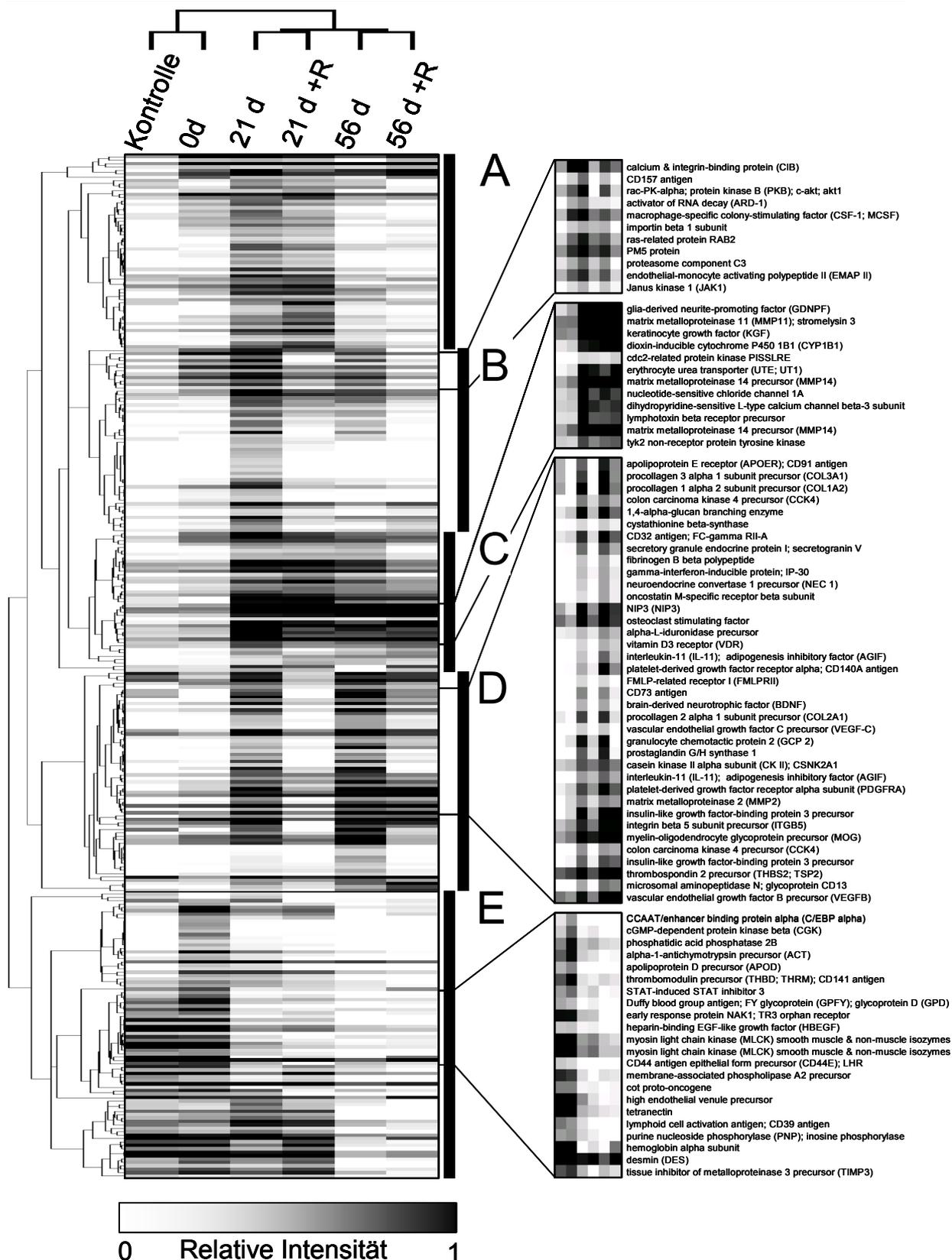


Abbildung 6: Hierarchische Clusteranalyse der zeitabhängigen Genexpression nach Ballonangioplastie. Jedes Gen ist durch eine einzelne Zeile dargestellt, jeder Zeitpunkt durch eine

einzelne Säule. Der dargestellte Grauwert entspricht dem Median der normalisierten mRNA-Expression der einzelnen Proben. Auf der linken Seite ist das Cluster aller 264 differentiell exprimierten Gene abgebildet. Die Gruppen A bis D umfassen die heraufregulierten Gene: A) Heraufregulation nach 21 Tagen, kein Effekt durch die Rapamycinbehandlung. B) Heraufregulation nach 21 Tagen, durch Rapamycinbehandlung unterdrückt. C) Dauerhafte Heraufregulation, kein Effekt durch die Rapamycinbehandlung. D) Dauerhafte Heraufregulation, durch Rapamycinbehandlung unterdrückt. E) Herunterregulierte und transient exprimierte Gene. Auf der rechten Seite sind beispielhaft vergrößerte Gencluster aus jeder Gruppe abgebildet.

4.2.3 Vergleich der Genexpression des humanen Organkulturmodells mit derjenigen humaner Neointima aus In-Stent-Restenosen

In früheren Studien aus unserer Arbeitsgruppe^{96,98} wurde das Genexpressionsprofil humaner Neointima mittels cDNA-Array-Technologie untersucht. Das Material hierfür wurde durch ein Helix-Cutter-Atherektomie-Gerät aus In-Stent-Restenosen drei bis acht Monate nach Stentimplantation gewonnen. Um die Ähnlichkeit der Genexpression der humanen, nativen und der humanen Neointima im Organkulturmodell abschätzen zu können, verglichen wir die Genexpressionsprofile beider Studien direkt miteinander. Es zeigte sich, dass 36 Gene eine kongruente Regulierung aufwiesen, wovon 30 Gene eine vermehrte Expression aufwiesen wie zum Beispiel die Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9), die Macrophage-related Proteine 8 & 14 (MRP 8&14), der Leukozytenmarker CD13, und die pro-inflammatorischen Gene Cyclooxygenase 1 (COX-1) oder β -Thromboglobulin (Tabelle 1, oberer Teil). Die übrigen sechs Gene, darunter Desmin und frizzled-related Protein (FrzB), wiesen nach Angioplastie *in vivo* und *ex vivo* eine reduzierte Expression auf. (Tabelle 1, unterer Teil).

| Genbank accession no. | Name | Native Kontrolle | Native Neointima | OCM Kontrolle | OCM 21 Tage | OCM 56 Tage | x-fache Ratio in nativem Gewebe | Maximale x-fache Ratio in OCM |
|-----------------------|--|------------------|------------------|---------------|-------------|-------------|---------------------------------|-------------------------------|
| A | | | | | | | | |
| S83171 | BCL-2 binding athanogene-1 (BAG-1) | 0,007 | 0,150 | 0,138 | 0,289 | 0,000 | ↑ 20,1 | ↑ 2,1 |
| M54995 | beta thromboglobulin; neutrophil activating peptide 2 (NAP2) | 0,085 | 1,147 | 0,000 | 0,817 | 0,331 | ↑ 13,4 | ↑ 818,5 |
| U85611 | calcium & integrin-binding protein (CIB) | 0,141 | 0,505 | 0,265 | 0,837 | 0,554 | ↑ 3,6 | ↑ 3,1 |
| X06234 | calgranulin A; (MRP8) | 0,055 | 1,054 | 0,000 | 0,133 | 0,348 | ↑ 18,7 | ↑ 349,0 |
| X06233 | calgranulin B; (MRP14) | 0,313 | 1,137 | 0,065 | 0,904 | 0,613 | ↑ 3,6 | ↑ 13,7 |
| # M31932 | CD32 antigen; FC-gamma RII-A | 0,000 | 0,457 | 0,071 | 0,586 | 0,742 | ↑ 457,9 | ↑ 10,3 |
| M34570 | collagen 6 alpha 2 subunit (COL6A2) | 0,010 | 0,363 | 0,000 | 0,136 | 0,000 | ↑ 33,5 | ↑ 137,0 |
| # X59932 | c-src kinase (CSK); protein-tyrosine kinase cyt | 0,098 | 0,634 | 0,127 | 0,474 | 0,398 | ↑ 6,4 | ↑ 3,7 |
| # AF019562 | DNAX activation protein 12 | 0,054 | 0,695 | 0,089 | 0,697 | 0,350 | ↑ 12,6 | ↑ 7,8 |
| U14188 | ephrin A4 precursor (EFNA4) | 0,014 | 0,608 | 0,000 | 0,428 | 0,108 | ↑ 41,0 | ↑ 428,5 |
| U35735 | erythrocyte urea transporter (UTE) | 0,202 | 0,548 | 0,029 | 0,705 | 0,488 | ↑ 2,7 | ↑ 23,8 |
| Z36715 | ets domain protein elk-3 | 0,000 | 0,262 | 0,041 | 0,326 | 0,441 | ↑ 263,1 | ↑ 10,6 |
| M76673 | FMLP-related receptor I (FMLPRII) | 0,009 | 0,182 | 0,000 | 0,116 | 0,107 | ↑ 18,4 | ↑ 117,0 |
| J03909 | gamma-interferon-inducible protein; IP-30 | 0,033 | 0,224 | 0,000 | 0,176 | 0,251 | ↑ 6,6 | ↑ 252,0 |
| # M62880 | integrin beta 7 subunit precursor (ITGB7) | 0,067 | 0,297 | 0,000 | 0,175 | 0,004 | ↑ 4,4 | ↑ 175,6 |
| U05875 | interferon-gamma (IFN-gamma) receptor beta | 0,037 | 0,290 | 0,079 | 0,387 | 0,276 | ↑ 7,6 | ↑ 4,9 |
| # J05070 | matrix metalloproteinase 9 (MMP9) | 0,012 | 0,191 | 0,020 | 0,368 | 0,057 | ↑ 15,0 | ↑ 17,3 |
| # M22324 | microsomal aminopeptidase N; glycoprotein CD13 | 0,009 | 0,367 | 0,000 | 0,239 | 0,402 | ↑ 36,8 | ↑ 403,0 |
| M25665 | neutrophil NADPH oxidase factor 1; p47-PHOX | 0,059 | 0,764 | 0,000 | 0,187 | 0,017 | ↑ 12,7 | ↑ 187,5 |
| U63717 | osteoclast stimulating factor | 0,032 | 0,519 | 0,404 | 0,721 | 0,825 | ↑ 16,0 | ↑ 2,0 |
| # M86400 | phospholipase A2 | 0,064 | 0,665 | 0,208 | 0,647 | 0,472 | ↑ 10,3 | ↑ 3,1 |
| # X54936 | placenta growth factors 1 + 2 (PLGF1 + PLGF2) | 0,032 | 0,177 | 0,117 | 0,642 | 0,233 | ↑ 5,4 | ↑ 5,5 |
| M63193 | platelet- derived endothelial cell growth factor | 0,106 | 0,906 | 0,139 | 0,583 | 0,514 | ↑ 8,5 | ↑ 4,2 |
| M59979 | prostaglandin G/H synthase 1, COX-1 | 0,028 | 0,549 | 0,000 | 0,450 | 0,632 | ↑ 18,8 | ↑ 633,0 |
| M63488 | replication protein A 70-kDa subunit (RPA70) | 0,021 | 0,386 | 0,000 | 0,169 | 0,074 | ↑ 17,4 | ↑ 170,0 |
| U85625 | ribonuclease 6 precursor | 0,002 | 0,274 | 0,000 | 0,100 | 0,000 | ↑ 93,8 | ↑ 100,5 |
| X85106 | ribosomal protein S6 kinase II alpha 2 | 0,009 | 0,306 | 0,000 | 0,040 | 0,143 | ↑ 31,6 | ↑ 41,0 |
| # J03040 | secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) | 0,374 | 0,999 | 0,284 | 0,783 | 0,666 | ↑ 2,7 | ↑ 2,7 |
| M32313 | steroid 5-alpha reductase 1 (SRD5A1) | 0,013 | 0,149 | 0,070 | 0,202 | 0,126 | ↑ 10,4 | ↑ 2,9 |
| X14787 | thrombospondin 1 precursor (THBS1; TSP1) | 0,012 | 0,126 | 0,405 | 0,477 | 1,088 | ↑ 9,8 | ↑ 2,7 |
| B | | | | | | | | |
| # U59167 | desmin (DES) | 1,179 | 0,100 | 1,078 | 0,653 | 0,454 | ↓ 0,1 | ↓ 0,4 |
| X97335 | dual-specificity A-kinase anchoring protein 1 | 0,119 | 0,000 | 0,137 | 0,099 | 0,000 | ↓ 0,0 | ↓ 0,0 |
| U24163 | frizzled-related FrzB (FRITZ) | 0,199 | 0,000 | 0,243 | 0,373 | 0,000 | ↓ 0,0 | ↓ 0,0 |
| # V00568 | c-myc oncogene | 0,121 | 0,000 | 0,635 | 0,132 | 0,131 | ↓ 0,0 | ↓ 0,2 |
| L24564 | GTP-binding protein ras associated with diabetes (RAD1) | 0,308 | 0,083 | 0,866 | 0,386 | 0,060 | ↓ 0,3 | ↓ 0,1 |
| # J03161 | serum response factor (SRF) | 0,325 | 0,095 | 0,335 | 0,188 | 0,000 | ↓ 0,3 | ↓ 0,0 |

Tabelle 1: In humaner Neointima aus In-Stent-Restenosen und im Organkulturmodell kongruent regulierte Gene. Teil A: Heraufregulierte Gene, Teil B: Herunterregulierte Gene. Für die mit einem Rautenzeichen (#) versehenen Gene ist eine Assoziation mit hämatopoetischen Vorläuferzellen beschrieben worden.

4.2.4 Funktionelle Zuordnung der nach Angioplastie regulierten Gene

Um die genauen Mechanismen der Neointimaformation in unserem Organkulturmodell besser zu verstehen, führten wir eine funktionelle Zuordnung der 264 differentiell exprimierten Gene durch. Hierfür teilten wir diese sechs funktionellen Gruppen zu. Im Einzelnen waren dies folgende Bereiche:

- 1) Transkription
- 2) Inflammation
- 3) Proliferation und Apoptose
- 4) Signaltransduktion
- 5) Extrazelluläre Matrix, Zytoskelett und Zelladhäsion sowie
- 6) Zellmetabolismus.

In den Tabellen auf Seite 30 und 31 sind alle Gene der einzelnen Gruppen übersichtshalber aufgeführt (Tabelle 2).

Transkription

- ↔ arginine/serine-rich splicing factor 7
- ↑ basic transcription factor 62-kDa subunit (BTF2)
- ↑ CCAAT transcription binding factor gamma subunit
- ↑ chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1 (CHD1)
- ↑ DNA excision repair protein ERCC1
- ↑ DNA polymerase gamma (POLG)
- ↑ DNA topoisomerase I (TOP1)
- ↑ DNA topoisomerase II beta (TOP2B)
- ↓ DNA-binding protein inhibitor ID-1
- ↑ muscle-specific DNase I-like precursor
- ↑ replication protein A 70-kDa subunit
- ↑ transcription factor AREB6
- ↑ transcription factor ZFM1
- ↑ transcription intermediary factor 1 beta (TIF1B)
- ↑ transcriptional repressor NF-X1

Inflammation

- ↑ beta thromboglobulin; neutrophil activating peptide 2 (NAP2)
- ↑ calgranulin A; (MRP8)
- ↑ calgranulin B; (MRP14)
- ↓ calvasculin; S100 calcium-binding protein A4
- ↑ CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha)
- ↑ CD147 antigen; collagenase stimulatory factor; EMMPRIN
- ↑ CD32 antigen; FC-gamma RII-A
- ↑ CD32 antigen; FC-gamma RII-B
- ↓ CD44 antigen epithelial form precursor (CD44E); LHR
- ↓ CD44 antigen hematopoietic form precursor (CD44H); LHR
- ↑ CD47 antigen; integrin-associated protein (IAP)
- ↑ CD73 antigen; 5'-nucleotidase precursor
- ↑ cytochrome P450 IB1 (CYP1B1)
- ↑ DNAX activation protein 12
- ↑ endothelial-monocyte activating polypeptide II (EMAP II)
- ↑ FMLP-related receptor 1 (FMLPR1)
- ↑ gamma-interferon-inducible protein; IP-30
- ↓ Gem; induced immediate early protein
- ↑ glutaredoxin
- ↑ granulocyte chemotactic protein 2 (GCP 2)
- ↑ heat shock protein 60 (HSP-60)
- ↓ high endothelial venule precursor
- ↓ interferon regulatory factor 1 (IRF1)
- ↑ interferon-gamma (IFN-gamma) receptor beta
- ↑ interferon-inducible protein 1-8D + 1-8U
- ↑ interleukin enhancer-binding factor (ILF)
- ↑ interleukin-1 beta precursor (IL1B)
- ↑ interleukin-11 (IL-11); adipogenesis inhibitory factor (AGIF)
- ↑ interleukin-8 (IL-8); neutrophil-activating protein 1 (NAP1)
- ↑ leukocyte interferon-inducible peptide
- ↓ linker for activation of T-cells (LAT)
- ↓ lymphoid cell activation antigen; CD39 antigen
- ↑ lymphotoxin beta receptor precursor
- ↑ macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC1)
- ↑ macrophage-specific colony-stimulating factor (MCSF)
- ↑ macrophage-stimulating protein (MSP), MST1
- ↓ membrane-associated phospholipase A2 precursor
- ↑ neutrophil NADPH oxidase factor 1; p47-PHOX
- ↑ phospholipase A2
- ↑ prostaglandin G/H synthase 1
- ↑ proteasome component C3
- ↑ proteasome component C9
- ↑ putative T1/ST2 receptor-binding protein precursor
- ↑ TNF-alpha converting enzyme (TACEA)
- ↑ tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1); CD120A antigen

Signaltransduktion

- ↔ 14-3-3 protein beta/alpha
- ↓ 58-kDa inhibitor of the RNA-activated protein kinase
- ↑ ASIC3 proton gated cation channel
- ↑ cAMP-dependent protein kinase type I beta regulatory subunit
- ↑ cGMP-dependent protein kinase beta (CGK)
- ↑ cytoplasmic antipeptidase 2 (CAP2)
- ↑ endopeptidase CLP
- ↑ GAP-associated protein
- ↑ GTPase-activating protein (GAP)
- ↑ GTP-binding protein G(i)/G(s)/G(t) beta subunit 3
- ↑ human immunodeficiency virus type 1 enhancer-binding protein 2
- ↑ neuroendocrine convertase 1 precursor (NEC 1)
- ↑ presynaptic density protein 95 (PSD95)
- ↓ putative serine/threonine protein kinase PRK
- ↓ Ral A; GTP-binding protein
- ↑ ras-related protein RAB3B
- ↑ regulator of G protein signaling 4 (RGS4)
- ↑ ribonuclease/angiogenesis inhibitor (RAI)
- ↓ serine/threonine protein kinase SGK
- ↓ serine/threonine-protein kinase PCTAIRE 1 (PCTK1)
- ↑ tyk2 non-receptor protein tyrosine kinase

Proliferation / Apoptose

- ↑ activating transcription factor 1
- ↑ ADA3-like protein
- ↑ adenosine A1 receptor (ADORA1)
- ↑ apolipoprotein E receptor (APOER); CD91 antigen
- ↑ apoptotic protease activating factor 1 (APAF1)
- ↑ ataxia telangiectasia (ATM)
- ↑ ATL-derived PMA-responsive peptide (APR)
- ↑ BAD protein
- ↑ basic fibroblast growth factor (BFGF; FGF; FGF2)
- ↓ BCL-2 binding athanogene-1 (BAG-1)
- ↔ bcl2 homologous antagonist/killer (BAK)
- ↑ BDNF/NT-3 growth factors receptor precursor
- ↑ B-myb
- ↑ bone proteoglycan II precursor (PGS2); decorin (DCN)
- ↑ bone-derived growth factor 1 (BPGF1)
- ↑ brain-derived neurotrophic factor (BDNF)
- ↑ casein kinase II alpha subunit (CK II); CSNK2A1
- ↑ caspase & rip adaptor with death domain (CRADD)
- ↑ caspase-4 precursor (CASP4)
- ↑ CC3 (CC3)
- ↑ CD157 antigen; bone marrow stromal antigen 1 (BST-1)
- ↑ CDC25B; CDC25HU2; M-phase inducer phosphatase 2
- ↑ cdc2-related protein kinase PISLRE
- ↑ cell division protein kinase 5 (CDK5)
- ↑ cellular nucleic acid binding protein (CNBP)
- ↑ c-fos proto-oncogene; G0S7 protein
- ↓ c-myc oncogene
- ↑ colon carcinoma kinase 4 precursor (CCK4)
- ↓ cot proto-oncogene
- ↑ c-src kinase (CSK); protein-tyrosine kinase c-yl
- ↑ cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)
- ↑ damage-specific DNA binding protein p48
- ↑ dishevelled 1 (DVL1)
- ↑ DNA excision repair protein ERCC2
- ↑ DNA excision repair protein ERCC3
- ↑ DNA fragmentation factor 45 (DFF45)
- ↑ DNA-repair protein complementing XP-A cells
- ↑ early growth response alpha (EGR alpha)
- ↑ early response protein NAK1; TR3 orphan receptor
- ↔ EB1 protein
- ↑ ets domain protein elk-3
- ↑ FAN protein
- ↔ Fas-activated serine/threonine (FAST) kinase
- ↔ GADD153; C/EBP homologous protein
- ↓ growth arrest & DNA-damage-inducible protein (GADD45)
- ↓ GTP-binding protein ras associated with diabetes (RAD1)
- ↓ heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF)
- ↑ importin beta 1 subunit
- ↑ induced myeloid leukemia cell differentiation protein MCL-1
- ↑ inhibitor of apoptosis protein 3 (IAP3)
- ↑ insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3)
- ↑ Janus kinase 1 (JAK1)
- ↓ jun-B
- ↑ keratinocyte growth factor (KGF); fibroblast growth factor 7 (FGF7)
- ↑ leptin precursor
- ↑ leukemia inhibitory factor precursor (LIF)
- ↑ NIP3 (NIP3)
- ↑ octamer-binding transcription factor 2 (oct-2; OTF2)
- ↓ oncostatin M-specific receptor beta subunit
- ↓ p33ING1
- ↑ p53 cellular tumor antigen
- ↑ p53-associated mdm2 protein
- ↑ p55CDC
- ↑ PI3-kinase P85-alpha
- ↑ placenta growth factors 1 + 2 (PLGF1 + PLGF2)
- ↑ platelet-derived endothelial cell growth factor
- ↑ platelet-derived growth factor B (PDGFB)
- ↑ platelet-derived growth factor receptor alpha; CD140A
- ↑ proliferating cyclic nuclear antigen (PCNA); cyclin
- ↑ protein phosphatase PP2A B alpha isoform; alpha-PR55
- ↑ rac-PK-alpha; protein kinase B (PKB); c-akt; akt1
- ↑ RBQ1 retinoplastoma binding protein
- ↑ RCL growth-related c-myc-responsive gene
- ↑ receptor interacting protein; cell death protein RIP
- ↑ related to receptor tyrosine kinase (RYK)
- ↑ replication factor C 40-kDa subunit (RFC40); RFC2
- ↑ ribosomal protein S6 kinase II alpha 2
- ↑ serine/threonine protein phosphatase PP2A-alpha catalytic subunit
- ↓ serum response factor (SRF)
- ↓ STAT-induced STAT inhibitor 3
- ↑ Ste20-like kinase (SLK)
- ↑ stromal cell derived factor 1 precursor (SDF1)
- ↑ survival of motor neuron (hSMN)
- ↑ thrombin receptor (TR); F2R; PAR1
- ↑ thrombospondin 1 precursor (THBS1; TSP1)
- ↑ TNFR1-associated death domain protein; TRADD
- ↑ TRAP3
- ↓ TSG101 tumor susceptibility protein
- ↑ tyrosine kinase receptor tie-1 precursor
- ↑ vascular endothelial cell growth factor 165 receptor
- ↑ vascular endothelial growth factor B precursor (VEGFB)
- ↑ vascular endothelial growth factor C precursor (VEGF-C)
- ↑ vascular endothelial growth factor receptor 3
- ↑ vitamin D3 receptor (VDR)
- ↑ Wnt-8B

Adhäsion/Zytoskelett/ECM

↑ adducin gamma subunit
 ↓ alpha-1-antichymotrypsin precursor (ACT)
 ↓ apolipoprotein D precursor (APOD)
 ↓ bone morphogenetic protein 4 (BMP4)
 ↑ calcium & integrin-binding protein (CIB)
 ↓ cardiac phospholamban (PLB)
 ↑ cartilage-specific proteoglycan core protein (CSPCP)
 ↑ collagen 6 alpha 1 subunit (COL6A1)
 ↑ collagen 6 alpha 2 subunit (COL6A2)
 ↑ collagen 6 alpha 3 subunit (COL6A3)
 ↑ cytokeratin 19 (CK19)
 ↓ desmin (DES)
 ↓ Duffy blood group antigen; FY glycoprotein (GPFY)
 ↑ ephrin A4 precursor (EFNA4)
 ↑ ephrin type-A receptor 1 precursor
 ↑ ER-Golgi intermediate compartment 53-kDa protein
 ↑ erythrocyte adducin alpha subunit
 ↑ fibrinogen B beta polypeptide
 ↑ frizzled-related FrzB (FRITZ) + FrzB precursor + frezzled (FRE)
 ↑ glia-derived neurite-promoting factor (GDNPF)
 ↓ hemoglobin alpha subunit
 ↑ integrin alpha 9 (ITGA9); integrin alpha-RLC
 ↑ integrin beta 5 subunit precursor (ITGB5)
 ↑ integrin beta 7 precursor (ITGB7)
 ↓ junction plakoglobin (JUP); desmoplakin III (DP3)
 ↑ LIM domain kinase 1 (LIMK-1)
 ↑ matrix metalloproteinase 11 (MMP11); stromelysin 3
 ↑ matrix metalloproteinase 14 precursor (MMP14)
 ↑ matrix metalloproteinase 2 (MMP2)
 ↑ matrix metalloproteinase 9 (MMP9)
 ↑ microsomal aminopeptidase N; glycoprotein CD13
 ↑ mitogen-responsive phosphoprotein DOC2
 ↓ MLCK smooth muscle & non-muscle isozymes
 ↑ myelin-oligodendrocyte glycoprotein precursor (MOG)
 ↑ osteoclast stimulating factor
 ↑ PM5 protein
 ↑ procollagen 1 alpha 2 subunit precursor (COL1A2)
 ↑ procollagen 2 alpha 1 subunit precursor (COL2A1)
 ↑ procollagen 3 alpha 1 subunit precursor (COL3A1)
 ↑ proenkephalin A precursor
 ↑ ras-related protein RAB2
 ↑ ras-related protein RAB4A
 ↑ ras-related protein RAB6
 ↑ ras-related protein RAP-1B; GTP-binding protein SMG p21B
 ↓ rho6 protein
 ↑ secreted protein acidic and rich in cysteine precursor (SPARC)
 ↑ secretory granule endocrine protein I; secretogranin V
 ↓ tetranectin
 ↓ thrombomodulin precursor (THBD; THRM); CD141 antigen
 ↑ thrombospondin 2 precursor (THBS2; TSP2)
 ↓ tissue inhibitor of metalloproteinase 3 precursor (TIMP3)
 ↑ tyrosine-protein kinase ack

Metabolismus

↑ 1,4-alpha-glucan branching enzyme
 ↑ 2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit precursor
 ↑ 6-O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)
 ↑ activator of RNA decay (ARD-1)
 ↑ adenine phosphoribosyltransferase (APRT)
 ↓ adenylosuccinate lyase (ASL)
 ↑ aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2)
 ↑ alpha-L-iduronidase precursor
 ↑ aminoacylase 1 (ACY1)
 ↑ apolipoprotein A-I precursor (APOAI)
 ↑ chloride conductance regulatory protein ICLN
 ↑ clone PO2ST9 (brain striatum)
 ↑ cystathionine beta-synthase
 ↔ cytochrome P450 reductase
 ↑ dihydropyridine-sensitive L-type Ca channel beta-3 subunit
 ↓ diphosphomevalonate decarboxylase
 ↓ dual-specificity A-kinase anchoring protein 1
 ↑ erythrocyte urea transporter (UTE; UT1)
 ↑ estrogen sulfotransferase (STE; EST1)
 ↑ glutathione synthetase (GSH synthetase)
 ↑ glutathione-S-transferase (GST) homolog
 ↓ lipoprotein(A) precursor (APO(A))
 ↑ membrane-bound & soluble catechol-O-methyltransferase (COMT)
 ↑ microsomal glutathione S-transferase II
 ↑ monocarboxylate transporter 1 (MCT1)
 ↑ NAD(P)H dehydrogenase; quinone reductase
 ↓ phosphatidic acid phosphatase 2B
 ↓ phosphoribosyl pyrophosphate synthetase subunit I
 ↑ purine nucleoside phosphorylase (PNP)
 ↑ ribonuclease 6 precursor
 ↑ sodium- & chloride-dependent glycine transporter 1 (GLYT-1)
 ↑ sodium/potassium-transporting ATPase alpha 1
 ↑ steroid 5-alpha reductase 1 (SRD5A1)
 ↑ thymidylate kinase
 ↑ tripeptidyl aminopeptidase
 ↔ ubiquitin thiolesterase X-linked fat facets protein related (FAF-X)

Tabelle 2: Übersicht aller im Organkulturmodell differentiell exprimierten Gene. Alle 212 konsistent heraufregulierten Gene sind mit (↑), die 44 konsistent herunterregulierten Gene entsprechenderweise mit (↓) gekennzeichnet. Die acht mit ↔ bezeichneten Gene wiesen in ihrer Regulation keinen konsistenten Trend über den Zeitverlauf auf.

Den für die Neointimaformation wesentlichen Bereichen der Inflammation, Proliferation und Apoptose sowie extrazelluläre Matrixproduktion und Zelladhäsion konnten 192 der insgesamt 264 differentiell exprimierten Gene zugeordnet werden. Dies entspricht einem Anteil von 72,7% und bestätigt die Bedeutung dieser Prozesse in unserem Organkulturmodell. Nachdem diese drei Bereiche die wesentlichen Mechanismen der Neointimaformation umfassen, soll im Weiteren nur auf diese eingegangen werden.

Betrachtet man die Genregulation in diesen drei Bereichen im Zeitverlauf, so kann eine relative gleichmäßige Aktivierung von 56 Genen aus allen drei Bereichen bereits direkt nach Ballonangioplastie festgestellt werden (Abb. 7, linke Balkengruppe). 114 Gene (Abb. 7, mittlere Balkengruppe) waren zusätzlich nach 21 Tagen reguliert. Dies unterstreicht erneut, dass in unserem Organkulturmodell die größten Veränderungen in der Genexpression zu diesem Zeitpunkt auftreten.

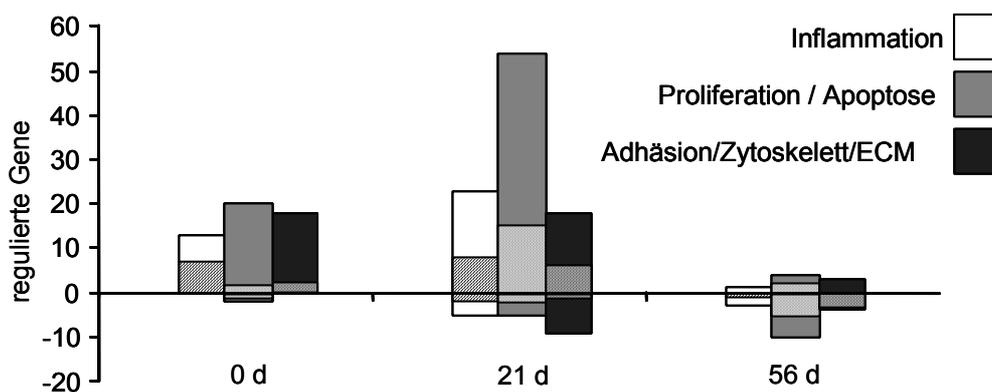


Abbildung 7: Zeitabhängige Herauf- oder Herunterregulation der differentiell exprimierten und den funktionellen Gruppen der Inflammation (jeweils linke Säulen), der Proliferation/Apoptose (mittlere Säulen) und der Adhäsion/Zytoskeleton/ECM (rechte Säulen) zugeordneten Gene. Der Wert der vertikalen Achse zeigt die Zahl der regulierten Gene an; der Anteil der Gene, welcher in HPC oder anderen immaturren Zellen des Knochenmarks vorbeschrieben wurde, ist durch den schraffierten Bereich innerhalb der Säulen dargestellt.

4.2.5 Regulation proliferations- und apoptose-assoziiierter Gene

Interessanterweise kam nach 21 Tagen die Mehrheit der zusätzlich differentiell exprimierten Gene aus dem Bereich der Proliferation. So waren für die Zellzyklusregulation wesentliche Zykline wie PCNA (proliferating cyclic nuclear antigen) und Zyklin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*; CDK) wie CDK4 und CDK5 reguliert. Des weiteren zeigte sich

eine vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF-B (Vascular Endothelial Growth Factor B), VEGF-C, PDGFB (platelet derived growth factor B) und Bone-derived Growth Factor 1 (Abbildung 8 A). Nachdem nach 56 Tagen in allen drei funktionellen Bereichen nur noch geringe Veränderungen auftraten (Abbildung 7, rechte Balkengruppe), deutet dies auf eine vorherrschende Rolle der Proliferation und Apoptose vor allem in den späteren Zeitpunkten des Organkulturmodells hin.

Auch aus dem Bereich des programmierten Zelltodes (Apoptose) waren 21 Tage nach Angioplastie sowohl pro- als auch anti-apoptotische Gene vermehrt exprimiert, wie z.B. die pro-apoptotische Caspase-4, der DNA Fragmentation Factor 45 und der Tumorsuppressor p53 und das mit diesem assoziierte mdm2 Protein, oder die anti-apoptotischen Gene BCL-2 Binding Athanogene (BAG-1) und BCL2 Antagonist of Cell Death (BAD) (Abbildung 8 A).

4.2.6 Regulation von Genen aus dem Bereich des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix und der Adhäsionsmoleküle

Im Pathomechanismus der Neointimaformation spielen neben der Proliferation glatter Muskelzellen auch deren Entdifferenzierung und Phänotypänderung eine wichtige Rolle. Die glatten Muskelzellen der humanen Neointima liegen in einem entdifferenzierten, synthetisierenden und proliferierenden Phänotyp vor, der große Mengen an extrazellulärer Matrix freisetzt, während die glatten Muskelzellen gesunder Arterien einem ruhenden, kontraktilen Phänotyp entsprechen³. Diese phänotypischen Veränderungen sind im Organkulturmodell nachvollziehbar (Abbildung 8B). So zeigte sich eine verminderte Expression zytoskelettärer Komponenten wie Desmin, der Myosin Light Chain Kinase (MLCK), Tetranectin und Cardiac Phospholamban (PLB).

Zudem fand sich eine veränderte Transkription von Genen, die für extrazelluläre Matrixproteine kodieren. So kam es zu einer vermehrten Expression verschiedener Kollagensubtypen wie COL1A2, COL2A1 und COL3A1 sowie mehrerer Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) wie MMP-2, MMP-9, MMP-11 und MMP-14. Matrix-Metalloproteinasen spielen eine wesentliche Rolle beim Abbau extrazellulärer Matrixproteine wie zum Beispiel Kollagenen, können aber auch die Freisetzung membranständiger Zytokine bewirken und besitzen somit auch immunmodulatorische Eigenschaften.

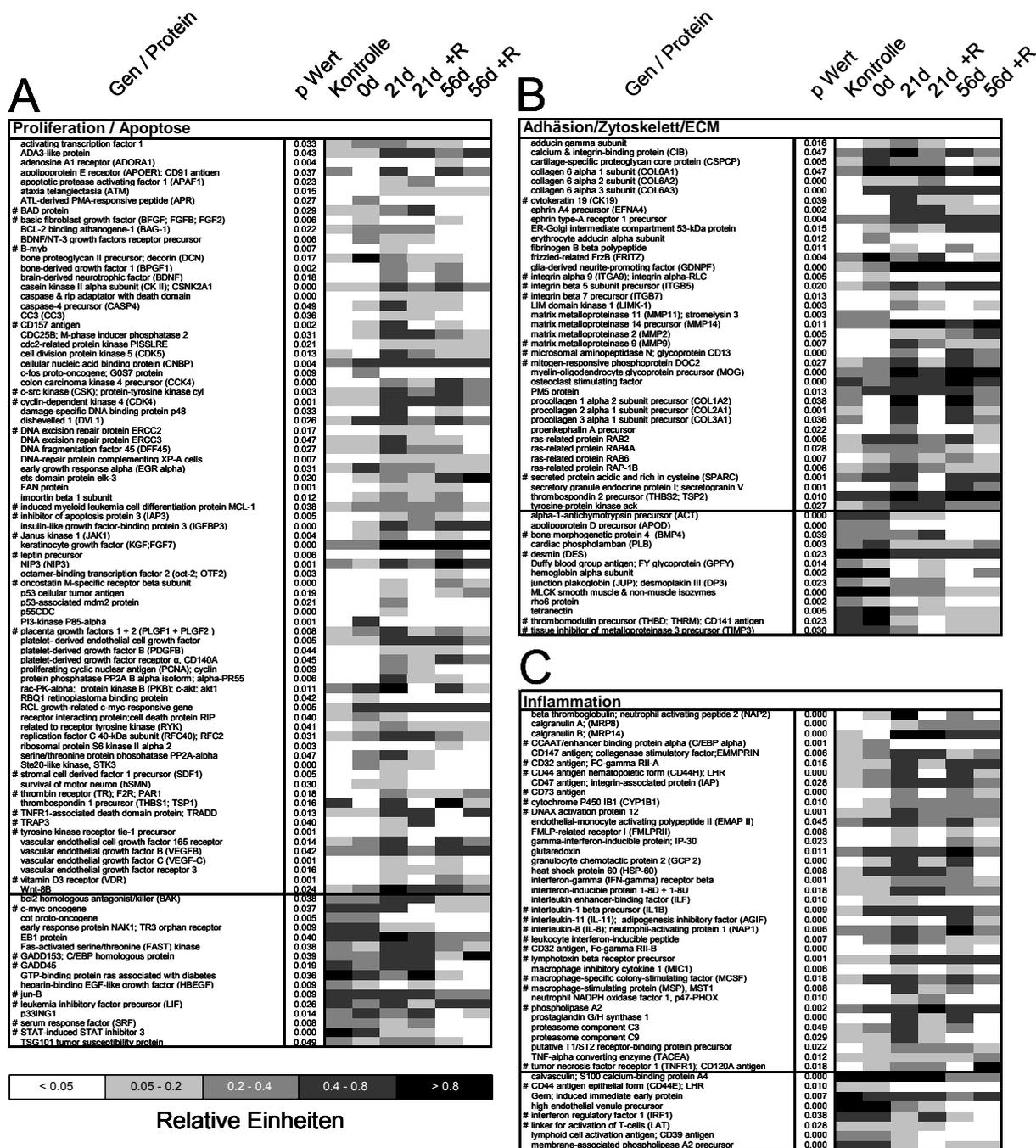


Abbildung 8: Funktionelle Clusteranalyse der differentiell expimierten Gene, welche mit Proliferation/Apoptose (A), Adhäsion/Zytoskelett/ECM (B) und Inflammation (C) assoziiert sind. Die Expression der einzelnen Gene ist wie in Abbildung 6 beschrieben dargestellt. Für die mit einem Rautenzeichen (#) versehenen Gene ist eine Assoziation mit hämatopoetischen Vorläuferzellen beschrieben worden.

4.2.7 Ausbildung eines pro-inflammatorischen Genexpressionsmusters

Allerdings zeigen die Daten aus dem Organkulturmodell auch, dass die frühe Aktivierung inflammatorischer Prozesse einen wesentlichen Schritt in der Pathophysiologie nach Ballonangioplastie darstellt. So kam es im Bereich der Inflammation einerseits zur Induktion von Genen, für die bereits eine Beteiligung in der Neointimaformation nachgewiesen wurde, wie zum Beispiel Interleukin-1 beta (IL-1 β), Interleukin-8 (IL-8) oder Cyclooxygenase-1 (COX-1 oder auch Prostaglandin G/H Synthase 1). Andererseits waren auch entzündungsassoziierte Gene vermehrt exprimiert, für die eine Bedeutung in der Pathophysiologie nach Gefäßwandverletzung bisher nicht bekannt war (Abbildung 8 C).

So zeigte sich eine Induktion von Endothelial-Monocyte-Activating-Peptide-II (EMAP-II), einem pro-inflammatorischem und pro-koagulatorischen Zytokin, welches ursprünglich aus einer Fibrosarkomzelllinie isoliert wurde³³.

Des Weiteren fand sich eine vermehrte Expression des Chemokins β -Thromboglobulin (β -TG). Dieses Molekül tritt in verschiedenen molekularen Varianten auf, die durch limitierte Proteolyse der Präkursoren PBP (basisches Plättchenprotein) und CTAP-III (Bindegewebe aktivierendes Peptid III) entstehen. Eine N-terminale Verkürzung dieser Präkursoren durch monozytäre Proteasen führt zur Bildung des aktiven Chemokins NAP-2 (CXCL7; Neutrophile aktivierendes Peptid 2)⁹⁰, das über Interaktion mit den Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2 die Rekrutierung und funktionelle Aktivierung von neutrophilen Granulozyten bewirkt⁶⁷.

4.2.8 Regulation stammzell- und knochenmarks-assoziiierter Gene

Unabhängig von der Zuordnung der regulierten Gene zu den drei Gruppen Proliferation und Apoptose, Inflammation sowie extrazelluläre Matrixproduktion und Zelladhäsion zeigte sich, dass die Expression vieler dieser Gene auch schon in hämatopoetischen Vorläuferzellen oder anderen unreifen Knochenmarkszellen beschrieben wurde. Nach einer in der größten bio-medizinischen Datenbank (Pubmed) durchgeführten Literaturrecherche waren 57 der 192 differentiellen Gene entweder stammzell-assoziiert oder von Bedeutung für die Hämatopoese. Deren Anteil an den funktionellen Gruppen in Abbildung 7 ist schraffiert dargestellt und in Abbildung 8 sind diese mit einem Rautenzeichen (#) gekennzeichnet.

So fand sich beispielsweise eine Heraufregulation von Stromal Derived Factor-1 (SDF-1), MMP-9, CD157, auch bekannt als Bone Marrow Stromal Antigen 1 (BST-1), Janus Kinase 1 (JAK1) und dem Oncostatin M Rezeptor beta (OSMRB).

4.3 Effekt von Rapamycin auf das Genexpressionsmuster im humanen Organkulturmodell nach 21 und 56 Tagen

Wie eingangs beschrieben, konnte in verschiedenen Studien eine beeindruckende Reduktion der Restenoserate im Patienten durch die Verwendung Rapamycin-freisetzender Stents belegt werden^{41,48,81}. Nachdem die Mechanismen, über die Rapamycin diese Wirkung erzielt, bislang nur teilweise verstanden sind, lag ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit in der Analyse der Effekte von Rapamycin auf das Genexpressionsprofil nach Ballonangioplastie. Hierfür wurde das Genexpressionsprofil nach Gefäßverletzung mit demjenigen ebenfalls verletzter, aber darüber hinaus für die jeweiligen Zeitpunkte mit Rapamycin behandelte Nierenarteriensegmente verglichen. Nach den oben beschriebenen Kriterien der differentiellen Expression erbrachte dieser Vergleich 117 Gene, deren Expression durch Rapamycin im Organkulturmodell signifikant vermindert wurde. In hoher Übereinstimmung mit einer früheren Untersuchung aus unserer Arbeitsgruppe gab es keine Gene, die nach Rapamycinbehandlung eine vermehrte Expression aufwiesen⁹⁷. Von den durch Rapamycin regulierten Genen waren im Organkulturmodell 39 Gene im Zeitverlauf nach Angioplastie ebenfalls signifikant reguliert (Abbildung 9 B). Der überwiegende Teil der durch Rapamycin regulierten Gene zeigte jedoch keine unterschiedliche Expression nach Ballondilatation (Abbildung 9 C).

Die funktionelle Zuordnung dieser Gene zu den Gruppen Inflammation, Proliferation/Apoptose, Signaltransduktion, Extrazelluläre Matrix/Zytoskelett/Zelladhäsion sowie Zellmetabolismus ist in Abbildung 8 A dargestellt. Es fällt auf, dass die Behandlung der Nierenarteriensegmente mit Rapamycin im wesentlichen zu Veränderungen in den drei Bereichen Proliferation/Apoptose, Extrazelluläre Matrix/Zytoskelett/Zelladhäsion und Inflammation führte. Da diese die wesentlichen Mechanismen der Neointimaformation umfassen, soll im Folgenden nur auf diese drei funktionellen Gruppen eingegangen werden.

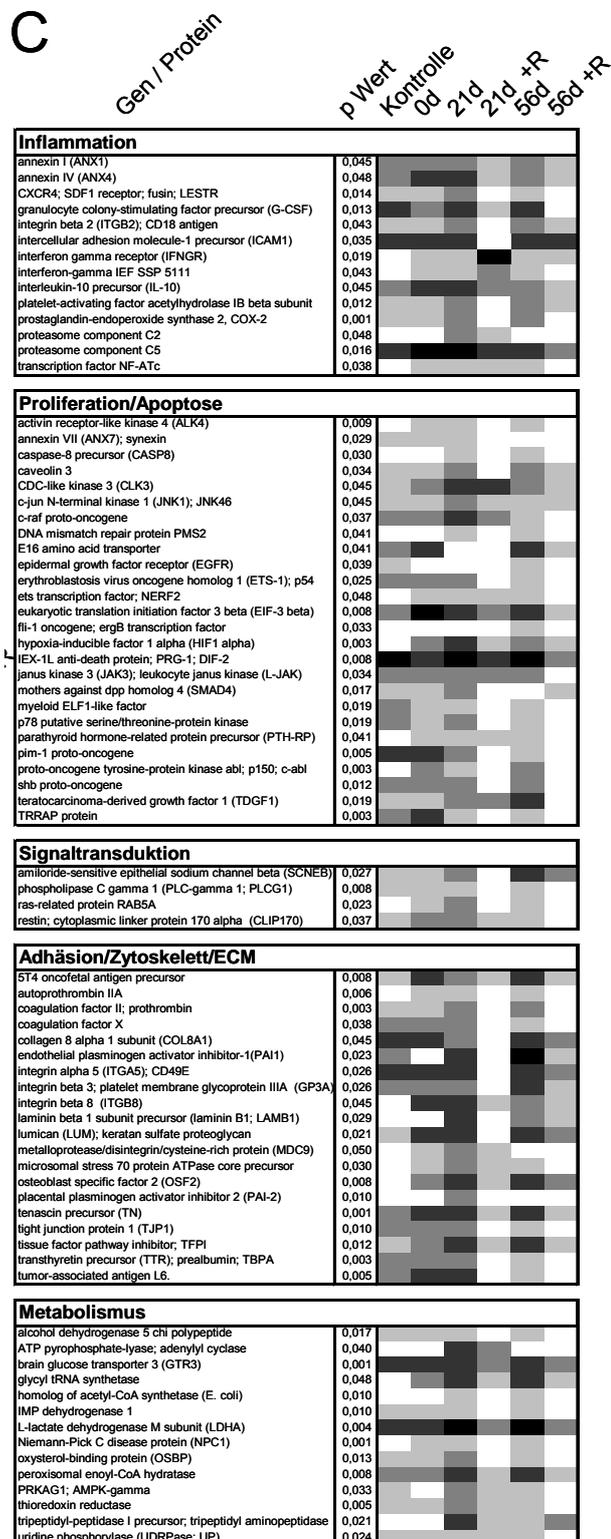
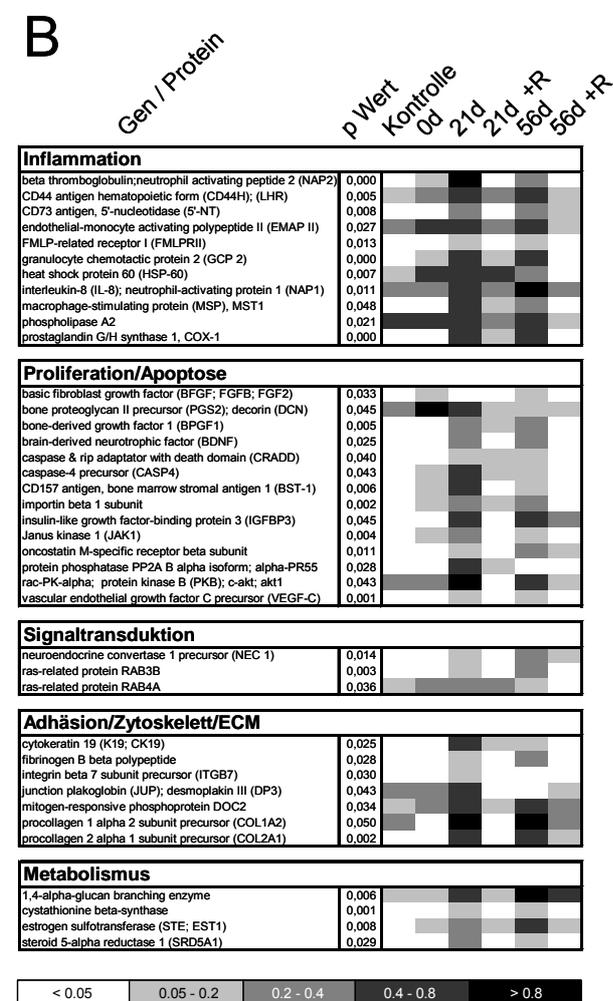
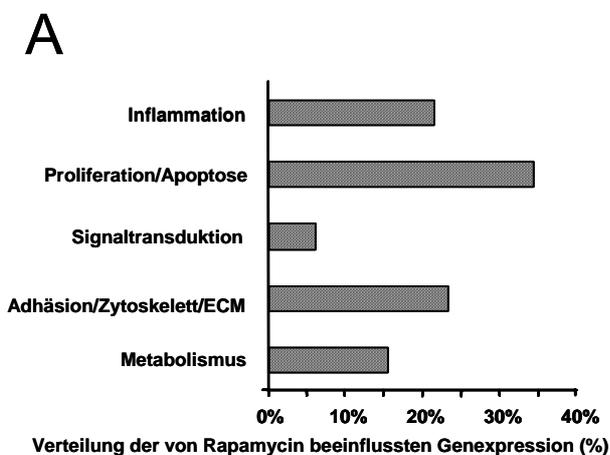


Abbildung 9: Einfluss der Rapamycinbehandlung auf die Genexpression. (A) Prozentuale Verteilung der verschiedenen, durch die Rapamycinbehandlung beeinflussten funktionellen Gruppen. (B) Funktionelle Clusterdarstellung derjenigen Gene, die sowohl im Organkulturmodell nach Angioplastie als auch durch die Rapamycinbehandlung signifikant reguliert waren. (C) Funktionelle Clusterdarstellung der Gene, welche nur durch die Rapamycinbehandlung signifikant beeinflusst waren, nicht jedoch durch die Angioplastie. Das Expressionsmuster jedes Gens ist horizontal dargestellt. Jede Säule repräsentiert einen einzelnen Zeitpunkt. Die dargestellte Expression ist der Median des normalisierten mRNA-Niveaus der einzelnen Arterien und ist durch einen Grauton entsprechend der Skala in der Abbildung wiedergegeben.

4.3.1 Hemmung proliferations- und apoptose-assoziiierter Gene

Entsprechend den bereits bekannten anti-proliferativen Eigenschaften von Rapamycin waren etwa 35% der 117 herunterregulierten Gene proliferations- oder apoptose-assoziiert. Diese 40 Gene sind einzeln in Abbildung 9 B und 9 C unter Proliferation/Apoptose aufgeführt. Hierunter waren einerseits Wachstumsfaktoren wie VEGF-C, Basic Fibroblast Growth Factor (BFGF) und Bone Derived Growth Factor 1, andererseits für die Proliferation wichtige Kinasen wie JAK1 oder AKT1 (Abbildung 8 B). Auch auf mehrere wachstums-assoziierte Oncogene wie c-raf, fli-1, pim-1, c-abl und shb Proto-Oncogene hatte Rapamycin einen hemmenden Einfluss (Abbildung 9 C). Des Weiteren fand sich eine Hemmung von für die Apoptose wesentlichen Caspasen wie Caspase-4 und Caspase-8 (Abbildung 9 B und 9 C).

4.3.2 Hemmung von Genen aus dem Bereich des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix und der Adhäsionsmoleküle

Die Behandlung der dilatierten Gefäße mit Rapamycin führte auch zu einer verminderten Induktion vieler Gene aus dem Bereich des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix und der Zelladhäsion. So wurde durch Rapamycinbehandlung die vermehrte Expression verschiedener Kollagensubtypen wie COL1A2 and COL2A1 verhindert. Daneben zeigte sich eine verminderte Transkription verschiedener Faktoren des Gerinnungssystems wie Fibrinogen Beta und der Koagulationsfaktoren II und X (Abbildung 9B und 9C, Adhäsion/Zytoskelett/ECM).

4.3.3 Hemmung der Ausbildung eines pro-inflammatorischen Genexpressionsmusters

Der dritte durch Rapamycin deutlich beeinflusste Bereich umfasste Gene aus dem Bereich der Inflammation, wie zum Beispiel β -Thromboglobulin (NAP-2), IL-8 (NAP-1), Cyclooxygenase-1 (COX-1) oder EMAP-II (Abbildung 9 B, Inflammation). Darüber hinaus

kam es auch zu einer verminderten Transkription einiger Gene, die in den Nierenarteriensegmenten vor Dilatation konstitutionell exprimiert waren. Diese Gene sind in Abbildung 9 C, Teil Inflammation aufgeführt, darunter die für die Leukozytenadhäsion wesentlichen Gene Intercellular Adhesion Molecule1 (ICAM1) und Integrin-beta 2 (CD18).

4.3.4 Hemmung stammzell- und knochenmarks-assoziiierter Gene

Unabhängig von der Einteilung in die oben erwähnten funktionellen Gruppen wurde deutlich, dass die Behandlung mit Rapamycin auch zu einer Verminderung eines Teils der unter 4.2.8 erwähnten stammzell- und knochenmarksassoziierten Gene führte. So konnte die Induktion von CD157 oder dem Oncostatin M Rezeptor beta deutlich vermindert werden (Abbildung 9 B, Proliferation/Apoptose). Interessanterweise kam es auch zu einer deutlich verminderten Expression der bereits basal vorhandenen Stammzellmarker CXCR4 und 5T4 Oncofetal Antigen (Abbildung 9 C, Inflammation und Adhäsion/Zytoskelett/ECM).

4.4 Validierung der Daten der cDNA Array-Analyse mittels genspezifischer PCR

Zur weiteren Validierung der Daten aus der Genexpressionsanalyse wurde eine genspezifische PCR durchgeführt. Hierfür wurden 11 Gene ausgewählt, die einerseits eine pro-inflammatorische Rolle spielen wie β -Thromboglobulin (NAP-2) und COX-1 oder andererseits mit hämatopoetischen Vorläuferzellen assoziiert sind wie JAK1, der Oncostatin M Rezeptor beta, MMP-9 und SDF-1. Drei repräsentative PCR-Gele sind in Abbildung 10 A dargestellt, die Ergebnisse der densitometrischen und statistischen Analyse in den Abbildungen 10 B und 10 C. Betrachtet man die 225 einzelnen PCR-Banden der genspezifischen PCR und vergleicht diese mit den Hybridisierungssignalen der cDNA-Array Analyse, so zeigt sich, dass 179 der 225 Signale in Bezug auf die Signalintensität übereinstimmen. Dies entspricht einer 80%igen Zuverlässigkeit („fidelity“) der Hybridisierungssignale der cDNA-Array Analyse.

4.5 Nachweis einer differentiellen Proteinexpression im Organkulturmodell am Beispiel von beta-Thromboglobulin

Um die Relevanz der unterschiedlichen mRNA-Expression auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurde eine Immunhistochemie der Organkulturen mit einem Antikörper gegen β -Thromboglobulin durchgeführt. Nach Angioplastie konnte eine deutliche Proteinexpression im Organkulturmodell nachgewiesen werden (Abbildung 10 D, linkes Bild). Die

Behandlung mit Rapamycin reduzierte die Intensität der β -Thromboglobulin-Färbung im Organkultumodell deutlich (Abbildung 10 D, rechtes Bild).

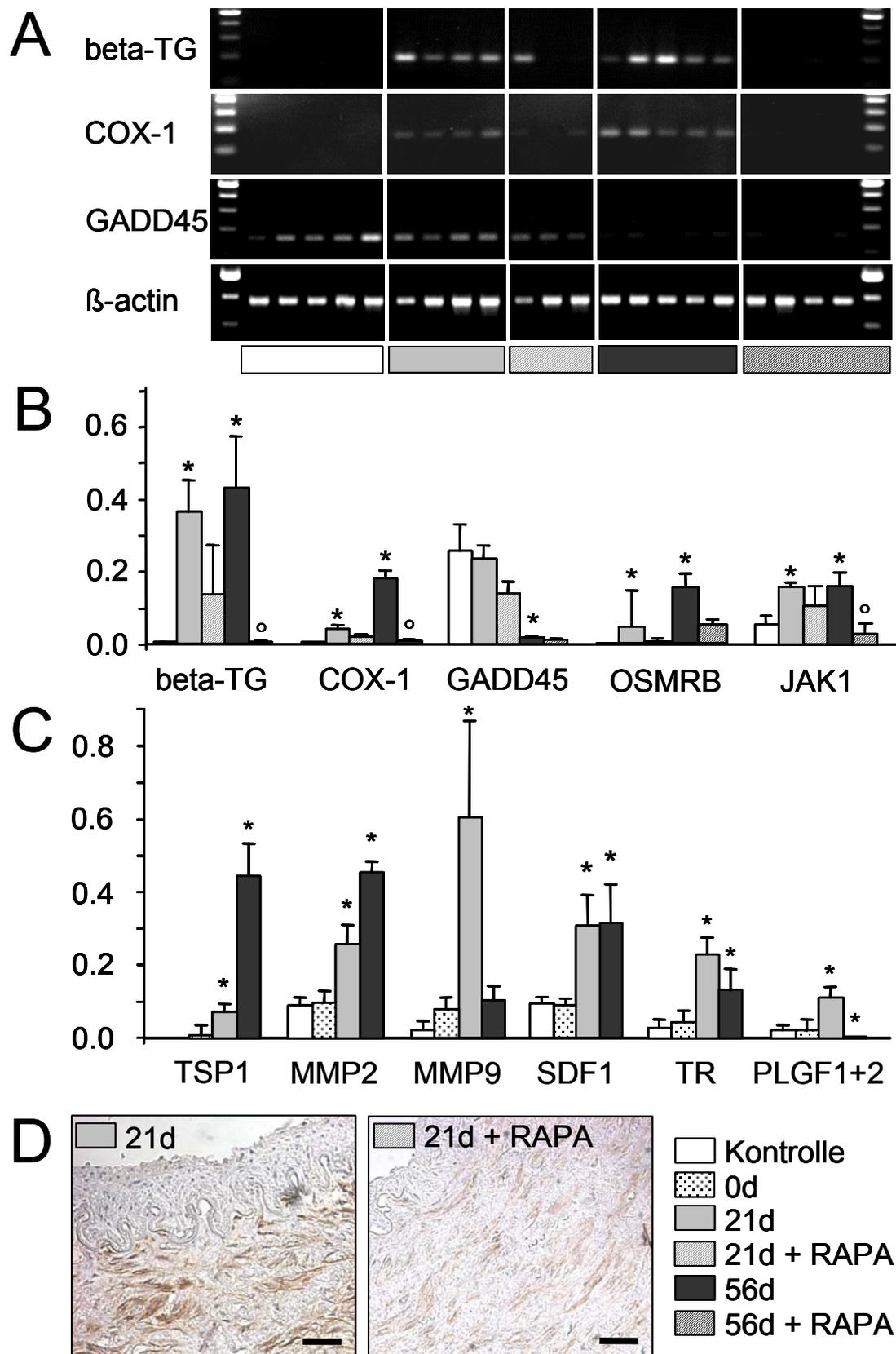


Abbildung 10: Validierung der mittels Array-Technologie erhaltenen Daten durch PCR und Immunhistochemie. A) Nachweis der veränderten mRNA-Expression nach Angioplastie durch genspezifische PCR für β -Thromboglobulin, COX-1 und GADD45. Die durch Rapamycin bewirkte Reduzierung der mRNA-Transkription ist für β -Thromboglobulin und COX-1 dargestellt. B) Densitometrische Analyse der mRNA-Expression \pm SEM für β -Thromboglobulin, COX-1, GADD45, OSMBR und JAK1. * $p < 0.05$ über den Zeitverlauf, $^{\circ}p < 0.05$ zwischen unbehandelten und Rapamycin-behandelten Gruppen. C) Densitometrische Analyse der mRNA-Expression \pm SEM für Thrombospondin-1, MMP-2, MMP-9, SDF-1, den Thrombin Rezeptor und PLGF1+2. * $p < 0.05$ über den Zeitverlauf. D) Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen β -Thromboglobulin: Im Organkulturmodell wird die β -Thromboglobulin Proteinexpression nach Angioplastie (linke Seite) durch Rapamycinbehandlung reduziert (rechte Seite).

5. Diskussion

Die Fortschritte der interventionellen Kardiologie, insbesondere die Einführung und Weiterentwicklung der Stentimplantation, haben dazu geführt, dass der überwiegende Teil der therapiebedürftigen Koronarstenosen im Katheterlabor behandelt werden kann. Eines der schwerwiegenden, bisher ungelösten Probleme der interventionellen Kardiologie ist bislang die Restenose. Obwohl die Stentimplantation die Rate der Restenosen im Vergleich zu anderen Interventionsverfahren deutlich senkt, tritt sie auch nach koronarer Stentimplantation mit einer Häufigkeit von 20 bis 30% auf³⁵. Erst in den letzten Jahren konnte durch die Verwendung medikamenten-freisetzender Stents (Drug-eluting-stent = DES) eine weitere Reduktion der In-Stent-Restenose erreicht werden.

Die genauen molekularen Mechanismen der Neointimabildung und deren Beeinflussung durch medikamenten-freisetzende Stents sind trotz dieser Erfolge weiterhin nicht vollständig verstanden. Die genaue Kenntnis dieser Regulierungsmechanismen ist aber zur Aufklärung der Pathophysiologie der Neointimaformation und zur Identifizierung weiterer therapeutischer Ansatzpunkte wesentlich. Thema der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung von molekularen Mechanismen, die der Neointimabildung im Menschen zugrunde liegen und deren therapeutische Beeinflussung durch Rapamycin.

Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass (1) die Behandlung mit Rapamycin die Neointimaformation im humanen Organkulturmodell reduzierte, (2) Veränderungen in der Genexpression einem bestimmten Zeitverlauf unterliegen einhergehend mit maximalen Veränderungen 21 Tage nach Angioplastie, (3) ein Grossteil der regulierten Gene den Bereichen der Proliferation und Apoptose, der extrazellulären Matrix und Zelladhäsion sowie der Inflammation zugeordnet werden kann, (4) die Ballonangioplastie ein Genexpressionsprofil induziert, welches die Rekrutierung und Aktivierung sowohl inflammatorischer als auch hämatopoetischer Vorläuferzellen begünstigt, (5) Rapamycin im Organkulturmodell die Induktion eines pro-adhäsiven und pro-inflammatorischen Genexpressionsmusters verhindert.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten, die zum einen erstmals eine zeitabhängige Genregulation in humanem Gewebe nach Angioplastie belegen und zum anderen einen wesentlichen Einfluss von Rapamycin auf die Genexpression zeigen, bieten somit eine

Erklärung für die hohe therapeutische Effizienz von Rapamycin, da Rapamycin als Immunsuppressivum neben seinen anti-proliferativen und anti-adhäsiven Eigenschaften auch noch die Aktivierung inflammatorischer sowie hämatopoetischer Vorläuferzellen hemmen könnte.

5.1 Die Neointimaformation im Organkulturmodell und deren Hemmung durch Rapamycin

Wie bereits Voisard et al. zeigen konnten⁸⁹, kann im Organkulturmodell die Ausbildung einer Neointima erst zu späteren Zeitpunkten wie nach 28 und 56 Tagen beobachtet werden. Passend zu den Vorergebnissen war auch in den hier untersuchten Nierenarteriensegmenten nach 21 Tagen nur eine sehr geringe Neointimabildung von 1,44% des Gefässlumens zu beobachten, gefolgt von einer Zunahme auf etwa 6% nach 56 Tagen. Für diese morphologisch eher geringen Veränderungen lassen sich vor allem zwei Gründe anführen:

Einerseits entspricht dieser Zeitverlauf der Neointimaformation auch den aus den humanen Studien bekannten Daten^{18,34,38}. So kommt es erst nach Abschluss der akuten Heilungsphase nach etwa vier Wochen zur überschüssigen Bildung extrazellulärer Matrix⁵³, welches meist erst nach mehreren Monaten in einer klinisch relevanten Restenose resultiert. Andererseits könnte die Abwesenheit von Leukozyten im Organkulturmodell das relative geringe Ausmass an neointimalem Gewebe erklären. Diese Annahme unterstreicht erneut die Wichtigkeit infiltrierender Leukozyten und hämatopoetischer Vorläuferzellen für eine verstärkte Neointimaformation.

Des Weiteren konnte durch die morphometrische Auswertung die Wirksamkeit der Rapamycinbehandlung auf die -wenn auch geringe- Neointimaformation belegt werden. So war nach 21 Tagen Rapamycinbehandlung überhaupt keine Neointima und nach 56 Tagen eine um 31% reduzierte neointimale Fläche zu beobachten.

5.2 Neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie der Neointimaformation durch Genexpressionsanalyse im Organkulturmodell

5.2.1 Zeitabhängige Regulation der Genexpression nach Ballonangioplastie

Eine Genexpressionsanalyse humaner Arterien im zeitlichen Verlauf nach Ballonangioplastie ist bislang nicht beschrieben worden. In dieser Arbeit wurde die Genexpression direkt, 21 Tage und 56 Tage nach Ballondilatation mit Hilfe der cDNA-Array-Technologie systematisch untersucht. In einer Vorarbeit dieser Arbeitsgruppe⁹⁸ konnte gezeigt werden, dass in der humanen Neointima im Vergleich zu nicht-atherosklerotischen Koronarien die überwiegende Mehrheit der Gene heraufreguliert war. Wie erwartet, waren auch in dieser Arbeit deutlich mehr Gene (n=212) heraufreguliert im Vergleich zu den 44 dauerhaft herunterregulierten Genen.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Genexpression in beispielsweise Abbildung 6, so ist es eindeutig, dass die Veränderungen einem zeitlichen Verlauf folgen. Eine grosse Gruppe von Genen war nur nach 21 Tagen heraufreguliert (Abbildung 6A, 6B), wohingegen andere Gene eine dauerhafte Heraufregulation aufwiesen (Abbildung 6C, 6D).

Nachdem nur einige wenige Gene ausschliesslich nach 56 Tagen reguliert waren, lässt sich schlussfolgern, dass für die Pathophysiologie der Neointimabildung wesentliche Änderungen in der Genexpression vor allem im frühen Stadium nach Gefäßverletzung stattfinden. Rapamycin-freisetzende Stents setzen etwa 80 Prozent der gesamten Medikamentendosis innerhalb der ersten 30 Tage nach Implantation frei und können somit die frühen Mechanismen der arteriellen Wundheilung optimal beeinflussen, wie die beeindruckende Reduktion der In-Stent-Restenose unterstreicht⁴¹. Es ist unwahrscheinlich, dass die Restenose auf späten Effekten beruht, da in diesen Stents auch im Langzeitverlauf keine vermehrte Restenose beobachtet werden konnte⁴¹.

5.2.2 Gemeinsamkeiten mit nativer Neointima aus In-Stent-Restenosen

Zur Validierung der Daten aus dem Organkulturmodell erschien es zunächst sinnvoll, die im Organkulturmodell gewonnenen Genexpressiondaten mit denen nativer, humaner Neointima zu vergleichen. Hierfür wurden die in beiden Studien differentiell exprimierten Gene abgeglichen. So konnten 36 Gene mit kongruenter Regulierung identifiziert werden. Entsprechend den beiden zugrundeliegenden Studien waren auch in dieser Schnittmenge mit

30 Genen die deutliche Mehrheit heraufreguliert, so zum Beispiel MMP-2, MMP-9, CD13, COX-1, Thrombospondin-1, der Interferon- γ -Rezeptor beta oder VEGF. Die relativ niedrige Anzahl von in der nativen Neointima und im Organkulturmodell kongruent regulierten Genen mag überraschen, kann jedoch mehrere Ursachen haben, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

Obgleich in dieser Arbeit erstmals eine detaillierte Analyse der durch Angioplastie vermittelten Veränderungen in der Genexpression beschrieben wird, lässt sich nicht ausschliessen, dass es möglicherweise konstitutionelle Unterschiede zwischen Nierenarterien wie im Organkulturmodell verwendet- und Koronararterien gibt.

Des weiteren stellen beide Gruppen unterschiedliche Zeitpunkte der Neointimaformation dar. Während im Organkulturmodell die frühen Mechanismen der Neointimaformation untersucht wurden, konnte das Gewebe der In-Stent-Restenose aus humanen Koronararterien erst 6-8 Monate nach Angioplastie gewonnen werden und spiegelt somit die späte und chronische Phase des pathophysiologischen Geschehens wieder. Darüberhinaus kann der Einfluss infiltrierender, zuvor zirkulierender Blutzellen im Organkulturmodell nicht abgeschätzt werden, wohingegen die Proben der nativen Neointima eine höhere Diversität von Zellen aufwiesen. Generell kann jedoch angenommen werden, dass die durch diesen Vergleich aufgefundenen Gene eine Rolle sowohl in der frühen als auch chronischen Phase nach Gefässverletzung spielen und somit möglicherweise von essentieller Bedeutung für die Neointimaformation sind.

Beispielsweise konnte in einer Vorarbeit⁹⁸ die Bedeutung des Interferon- γ -Rezeptors für die proliferative Antwort nach Gefässverletzung belegt werden. So kam es im Vergleich zum Wildtyp in Interferon- γ -Rezeptor^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Neointima- und Mediafläche. Interessant ist aber v.a. auch die vermehrte Expression von Thrombospondin-1 in beiden Modellen, da Thrombospondin-1 eine Rolle in der Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen spielt⁷¹. Die Bedeutung von Thrombospondin-1 nach Gefässverletzung wurde von Chen et al.¹¹ untersucht. Eine Blockade von Thrombospondin-1 durch einen inhibierenden Antikörper führte in den behandelten Ratten zu einer früheren Reendothelialisierung und zu einer verminderten Neointimaformation.

5.2.3 *Regulation von Proliferation und Apoptose nach Ballonangioplastie*

Die Regulation vieler proliferations-assoziiierter Gene im Organkulturmodell unterstreicht die bereits bekannte Bedeutung der Proliferation glatter Muskelzellen für die Neointimaformation. Die beobachteten maximalen Veränderungen nach 21 Tagen und die im weiteren Verlauf geringen Veränderungen nach 56 Tagen entsprechen den von Voisard et al.⁸⁹ erhobenen Daten. Diese wiesen eine maximale proliferative Aktivität nach 21 Tagen und deren Abwesenheit nach 56 Tagen nach. Des Weiteren konnten Chung et al.¹² zeigen, dass der Pathomechanismus der Proliferation auch in den späteren Phasen der Neointimaformation keine wesentliche Rolle mehr spielt. In Proben koronarer In-Stent-Restenosen, welche im Durchschnitt 5,7 Monate nach Stentimplantation mittels direkter koronarer Arterektomie gewonnen wurden, fand diese Arbeitsgruppe nur noch 0-4% proliferierende Zellen. Somit ist es faktisch nicht möglich, eine exakte Aussage über das zeit-abhängige Ausmass der Proliferation *in vivo* zu treffen. Folglich können die Daten aus dem Organkulturmodell das Verständnis zellulärer Mechanismen der frühen Phase nach Gefäßverletzung deutlich erleichtern.

Zunächst spiegelt die gesteigerte Expression einiger Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel VEGF-B, VEGF-C, PDGFB und Bone Derived Growth Factor 1 ein wachstumsförderndes Milieu wieder. Interessanterweise konnte bereits gezeigt werden, dass mechanischer Stress zur Induktion von VEGF⁵⁸ und PDGF⁴³ in glatten Muskelzellen führt. Diesen Stimuli folgend fand sich im Organkulturmodell die Aktivierung mehrerer für die Zellzyklusregulation wichtiger Gene wie beispielsweise PCNA (Proliferating Cyclic Nuclear Antigen).

Eine zeitabhängige Aktivierung von PCNA nach Angioplastie wurde bereits von Carter et al.⁸ in der experimentellen Neointimaformation des Hausschweines beschrieben. In diesem Modell trat eine maximale Proliferation jedoch bereits nach 7 Tagen auf und nach 18 Tagen war diese kaum mehr nachweisbar. Hinsichtlich der zellulären Funktion von PCNA als nukleäres, mit einem proliferativen Zellstatus korrelierendes Protein wurden erst kürzlich von Bowman et al.⁴ neue Daten veröffentlicht. So ist PCNA in einem Hybridkomplex mit dem Replikationsfaktor C (RFC) verbunden und scheint eine optimale DNA-Replikation zu gewährleisten. Erwähnenswert erscheint dies deshalb, da auch die RFC-Untereinheit 2 im Organkulturmodell kongruent mit PCNA heraufreguliert war und sich somit neu entdeckte, grundlegende zelluläre Mechanismen auch in humaner Vaskulatur nachweisen lassen.

Nachdem die prinzipielle Bedeutung der Proliferation für die Neointimaformation bereits bekannt ist und der Schwerpunkt dieser Arbeit nicht auf deren detailliertere Untersuchung abzielte, soll von einer weiteren Darlegung bereits beschriebener Mechanismen wie zum Beispiel der Regulierung der Zyklin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK5 abgesehen werden.

Neben einer kontrollierten Proliferation hängt das zelluläre Gleichgewicht eines Gewebes von der Regulation des programmierten Zelltodes, der Apoptose, ab. Die Apoptose glatter Muskelzellen scheint während der Neointimaformation pathogenetisch bedeutsam zu sein²⁸. Funktionell kann dies so gedeutet werden, dass in einem Gewebe mit hohen Proliferationsraten, wie sie in der Gefässwand nach Angioplastie auftreten, eine hohe Apoptoserate eine regulatorische Funktion einnimmt. In einer Vorarbeit aus dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass IFN- γ die Empfindlichkeit glatter Muskelzellen gegenüber apoptotischen Stimuli vermindert und so deren Überleben fördert. Eine Blockade der IFN- γ -Signaltransduktion in Interferon- γ -Rezeptor^{-/-}-Mäusen führte zu einer geringeren Neointimaformation und könnte indirekt die regulatorische Rolle der Apoptose im Pathomechanismus der Restenose bestätigen⁹⁸.

Die Bedeutung des IFN- γ -Signaltransduktionsweges unterstreichend liess sich im Organkulturmodell nach Angioplastie eine erhöhte Expression des IFN- γ -Rezeptors beobachten. Daneben zeigten sich bei weiteren apoptose-assoziierten Genen profunde Veränderungen im Genexpressionsprofil. Einerseits waren pro-apoptische Gene wie die Caspase-4, der DNA Fragmentation Factor 45 und der Tumorsuppressor p53 und das mit diesem assoziierte mdm2 Protein heraufreguliert, andererseits aber auch die anti-apoptischen Gene BCL-2 Binding Athanogene (BAG-1) und BCL2 Antagonist of Cell Death (BAD).

Da es sich jedoch sowohl um pro- als auch um anti-apoptisch wirksame Genprodukte handelt, kann letztlich der funktionelle Aspekt aus den in dieser Arbeit gewonnenen Daten nicht abgeschätzt werden. Zudem darf die Apoptose nicht als isolierter pathophysiologischer Mechanismus gesehen werden. So konnten Daemen et al.¹³ in einem murinen Ischämie-Reperusionsmodell der Niere zeigen, dass vermehrte Apoptose auch eine vermehrte inflammatorische Antwort der Gefässwand nach sich zieht. Das Ausmass der

Entzündungsreaktion spielt jedoch auch eine entscheidende Rolle in der Neointimaformation, worauf unter 5.2.5 näher eingegangen wird.

5.2.4 Veränderungen in der Expression von Genen des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix

Die Ballonangioplastie führt innerhalb der ersten Tage, Wochen und Monate zu komplexen Reaktionen der verletzten Gefäßwand^{18,88}. In dem in dieser Arbeit verwendeten Organkulturmodell wurden Veränderungen während der ersten 56 Tage nach Angioplastie erforscht. Somit wurde vor allem die akute inflammatorische Phase sowie die Phase der vasoproliferativen Antwort der Gefäßwand untersucht. Hierbei kommt es zur Entdifferenzierung und nachfolgenden Migration glatter Muskelzellen in die Neointima, die dort dann wieder zu α -actin-positiven glatter Muskelzellen redifferenzieren^{3,38}. Auch im Organkulturmodell zeigten sich Veränderungen in zytoskelettären Komponenten. Neben der bereits bekannten verminderten Expression von Desmin kam es Herunterregulation der Myosin Light Chain Kinase und von Cardiac Phospholamban. Da diese alle eine Rolle in der Regulation der Kontraktilität glatter Muskelzellen spielen, könnte dies die Phänotypänderung glatter Muskelzellen von einem kontraktilen Typ zu einem sekretorischen Typ während der Neointimaformation reflektieren.

Diese sekretorischen Zellen bewirken dann die überschüssende Synthese extrazellulärer Matrix, die im Prozess der Restenose wesentlich zum späteren Lumenverlust beiträgt. In der hier durchgeführten Genexpressionsanalyse zeigte sich, dass bereits zu den frühen Zeitpunkten unmittelbar und 21 Tage nach Angioplastie eine Heraufregulation von Genen aus dem Bereich der extrazellulären Matrix eintritt. Dies lässt sich in Abbildung 6 (linke und mittlere Balkengruppe) nachvollziehen. Hierunter fanden sich mehrere Kollagensubtypen (COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL6A1, COL6A1, COL6A3), aber auch Gene von Proteinen wie MMP-9, MMP-14 und MMP-11. Diese Matrixmetalloproteinasen bewirken die Degradation der extrazellulären Matrix und können somit zur Reorganisation des neointimalen Gewebes beitragen.

Die frühe Aktivierung dieser Gene zeigt erneut, dass die einzelnen Phasen der Neointimaformation stark miteinander verbunden sind und nicht als unabhängige Prozesse aufgefasst werden dürfen.

5.2.5 *Nachweis vermehrter Inflammation in Abwesenheit von Leukozyten*

Im Vergleich zu den bereits länger bekannten proliferativen Prozessen während der Neointimaformation ist der Einfluss entzündlicher Prozesse auf das Entstehen einer Restenose erst in jüngerer Zeit deutlich geworden. So wurde zwar das Vorhandensein von Makrophagen in der Neointima bereits 1998 durch Komatsu et al.³⁸ beschrieben, es wurde jedoch kein direkter Bezug zu entzündlichen Prozessen hergestellt. In einer Vorarbeit dieser Arbeitsgruppe konnte ein pro-inflammatorisches Genexpressionsmuster in humaner Neointima nachgewiesen werden, welches durch die Anwesenheit von Markern für Makrophagen und T-Lymphozyten charakterisiert war⁹⁸.

Einen direkten funktionellen Einfluss der Entzündung auf die Neointimaformation konnten Kornowski et al.³⁹ erstmals im porcinen Tiermodell zeigen. So korrelierte sowohl das Ausmass der Gefässverletzung mit dem Ausmass der Entzündung, als auch dieses mit der neointimalen Fläche und der prozentualen Stenose. In humanem Material konnte die Gruppe von Farb und Virmani¹⁹ zeigen, dass eine gesteigerte Entzündungsreaktion in der Gefässwand mit einer höheren Restenoserate einhergeht. Dass eine Blockade der Leukozyteninfiltration von therapeutischer Bedeutung sein könnte, konnten Simon et al.⁷⁶ in Mac-1^{-/-}-Mäusen belegen. Mac1 (auch CD11b/CD18 genannt), ist ein beta2 Integrin, welches für die Leukozytenadhäsion an Thrombozyten und Fibrinogen wesentlich ist. Dementsprechend konnte in Mac-1^{-/-}-Mäusen eine Reduktion der Leukozytenzahlen in der Gefässwand und auch eine Verminderung der Restenose erreicht werden.

Das pro-inflammatorische Genexpressionsmuster in Abbildung 8C stellt eine beeindruckende Rationale für eine massive Rekrutierung von Leukozyten nach Ballonangioplastie dar. Interessanterweise beeinflussen viele der hierunter vertretenen Zytokine vor allem Zellen der myelischen Reihe. Beispielsweise wurde eine Aktivierung und induzierte Migration von Monozyten respektive Makrophagen für EMAP-II³³, Macrophagen-stimulierendes Protein (MSP oder auch MST1)⁷⁷ und M-CSF⁹¹ berichtet. Wie in einer Vorarbeit aus unserer Gruppe gezeigt werden konnte, erhöht EMAP-II auch die Adhäsion monozytärer Zellen an glatten Muskelzellen⁹⁷. Andere Zytokine wie IL-8, β -Thromboglobulin oder GCP-2 waren nach Angioplastie ebenfalls heraufreguliert und verstärken jedes für sich die Migration von Granulozyten^{56,67,78}. Die Macrophage-related Proteine 8 & 14 (Calgranulin A & B), die im Organkulturmodell und auch in der Neointima humaner In-Stent-Restenosen verstärkt

exprimiert waren, haben ebenfalls pro-inflammatorische Eigenschaften und verstärken die Chemotaxis von Neutrophilen und deren Adhäsion⁶⁵. Des Weiteren konnte eine dauerhafte Heraufregulation von CD13 und CD32, beide Marker für Granulozyten, und von β -Thromboglobulin nachgewiesen werden. Eine Spaltung von β -Thromboglobulin durch aus Monozyten stammende Proteasen resultiert in der Bildung von aktivem NAP-2 (neutrophil-activating peptide 2)⁹⁰, welches die Adhäsion und transendotheliale Migration neutrophiler Granulozyten steigert⁶⁷. Die mechanische Aktivierung dieses hier beschriebenen Genexpressionsmusters könnte die Rekrutierung von Leukozyten und eine spätere Restenose begünstigen, da wie oben bereits erwähnt, die Dichte inflammatorischer Zellen in der Neointima mit dem Ausmass der Restenose signifikant korreliert¹⁹. Hierbei scheinen vor allem neutrophile Granulozyten eine wesentliche Rolle zu spielen⁹², welches durch die oben beschriebene Induktion neutrophilen-rekrutierender Zytokine erklärt werden kann.

5.2.6 Regulation zur Rekrutierung und Expansion hämatopoetischer Vorläuferzellen beitragender Gene

Ein überraschendes Ergebnis der Genexpressionsanalyse bestand in der Erkenntnis, dass nach Angioplastie auch in Abwesenheit von Leukozyten eine Regulation von Genen aus dem Bereich hämatopoetischer Vorläuferzellen stattfindet. Im Folgenden soll auf die im Organkulturmodell regulierten Gene eingegangen werden.

Es ist bekannt, dass IL-8 die Mobilisation hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark induziert⁵⁷. Eine verstärkte Freisetzung von Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark kann aber auch durch MMP-9, seinerseits bekanntermassen durch IL-8 induzierbar⁵⁷, als auch durch SDF-1 hervorgerufen werden²⁶. SDF-1 selbst wirkt auch chemotaktisch auf hämatopoetische Vorläuferzellen³⁰. Dass diese Effekte auch eine Rolle auf die Neointimaformation in der Maus haben, konnten Schober et al.⁶⁹ kürzlich zeigen. So konnte durch Blockade von SDF-1 durch einen neutralisierenden monoklonalen Antikörper eine Reduktion der neointimalen Läsion um 44% erreicht werden. Somit ist nachvollziehbar, dass hämatopoetische Vorläuferzellen zu einem gewissen Teil zur zellulären Komponente der Neointima beitragen, wie es von Sata et al.⁶⁶ ebenfalls im Mausmodell beschrieben wurde. Es ist jedoch bisher nicht belegt, dass hämatopoetische Vorläuferzellen auch im Menschen nach Angioplastie eine Rolle spielen. Nachdem IL-8, MMP-9 und SDF-1 im Organkulturmodell

synergistisch heraufreguliert waren, kann postuliert werden, dass diese Mechanismen auch in der humanen Neointimaformation aktiviert werden.

Für CD157, auch bekannt als bone marrow stromal antigen 1 (BST-1), konnten Podesta et al.⁵² zeigen, dass es wesentlich für die Generation zyklischer ADP-Ribose ist, welche dann die Proliferation humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen bewirkt. Ebenso ist Ergebnissen von Tanaka et al.⁸⁵ zufolge der Oncostatin M Rezeptor von Bedeutung für die Stimulation hämatopoetischer und stromaler Vorläuferzellen.

Darüberhinaus fanden sich in diesem Bereich Gene, die sowohl im Organkulturmodell als auch in der humanen Neointima vermehrt exprimiert waren wie zum Beispiel CD13, ITGB7 oder PLGF (Tabelle 1, Abbildung 8). Für diese Gene ist eine Assoziation mit Vorläuferzellen bereits gezeigt worden^{7,24,63}, nicht aber deren Aktivierung in der frühen als auch späten Phase der Neointimaformation.

5.3 Auswirkungen einer Rapamycinbehandlung auf die Genexpression im Organkulturmodell

In verschiedenen klinischen Studien konnte eine dramatische Reduktion der Restenose durch Verwendung Rapamycin-freisetzender Stents nachgewiesen werden^{41,48,81}. Die diesem Effekt zugrunde liegenden exakten Mechanismen sind aber noch immer nur ansatzweise geklärt. Vor allem sind die frühen Effekte von Rapamycin auf humanes Gewebe nach Ballonangioplastie aus Mangel an Material bisher kaum untersucht worden. Das Organkulturmodell bot hier die Möglichkeit, die transkriptionellen Auswirkungen einer Rapamycinbehandlung auf die Gefäßwand nach Ballonangioplastie zu untersuchen.

Es wurde eine Konzentration von 100 ng/ml gewählt, da diese in etwa den durch die Verwendung Rapamycin-beschichteter Stents erreichten Gewebespiegeln entspricht^{48,83}. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass die Effekte von Rapamycin dosisabhängig sind⁹⁷ und dass eine niedrige systemische Konzentration von etwa 10-15 ng/ml keine positiven Auswirkungen auf die primäre Restenoserate hat⁵.

Die Rapamycinbehandlung führte im Organkulturmodell auf genregulatorischer Ebene zur differentiellen Expression von 117 der 2312 untersuchten Gene. Hierbei waren unabhängig von den einzelnen Genen zwei Beobachtungen bemerkenswert:

(1) Einerseits zeigte die funktionelle Verteilung der beeinflussten Gene einen deutlichen Schwerpunkt in den Bereichen der Proliferation und Apoptose, der extrazellulären Matrix und Zelladhäsion sowie der Inflammation. Da diese drei Bereiche wesentliche Pathomechanismen der Neointimaformation darstellen, ist es nachvollziehbar, dass Rapamycin aufgrund seiner pleiotropen Eigenschaften eine derart beeindruckende Wirksamkeit aufweist.

(2) Andererseits war auffällig, dass die Rapamycinbehandlung mehrheitlich eine Reduktion der Expression von Genen zur Folge hatte, welche durch die Ballonangioplastie selbst nicht signifikant beeinflusst wurden. So beeinflusst Rapamycin grundlegend die Eigenschaften des Gefäßes per se durch Unterdrückung konstitutioneller Mechanismen, insbesondere im Bereich der Proliferation. Daher erscheint die Annahme naheliegend, dass unter dem Einfluss von lokal freigesetztem Rapamycin mittels Verwendung medikamentenfreisetzender Stents eine überschüssige Aktivierung dieser basalen Mechanismen, welche ohne Behandlung zur Neointimaformation führt, unterdrückt werden kann.

Nachfolgend soll auf die drei am stärksten beeinflussten Bereiche näher eingegangen werden.

5.3.1 Effekt von Rapamycin auf die Zellzykluskontrolle

Tiefgreifende Veränderungen fanden sich bei Genen, die mit der Regulation der Proliferation, der Zellteilung und des Zellzyklus assoziiert waren. Rapamycin hemmte die transkriptionelle Induktion von Wachstumsfaktoren wie Brain-derived Neurotropic Factor (BDNF1), Basic Fibroblast Growth Factor (BFGF) oder Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGFC) (Abb. 9B). Interessanterweise konnten Donovan et al.¹⁴ bereits eine Induktion von BDNF1 nach Gefäßverletzung im Rattenmodell zeigen. Die Daten aus dem Organkulturmodell belegen, dass diese Induktion auch im Menschen stattfindet und durch Rapamycinbehandlung unterbunden werden kann.

Neben der Hemmung einer vermehrten Expression von wachstumsfördernden Genen konnte durch Rapamycin auch die Expression von apoptose-assoziierten Genen wie Caspase-4, Caspase-8, JNK1 oder Mothers Against Decapentaplegic Homolog (SMAD4) vermindert werden (Abb. 9C). Vor allem aber verminderte die Rapamycinbehandlung die konstitutionelle Expression von proliferations-assoziierten Transkriptionsfaktoren, deren Expression durch die Ballonangioplastie nicht signifikant beeinflusst wurde. Zu diesen zählen unter anderem die ETS Transkriptionsfaktoren ETS-1, fli-1, NERF-2 als auch die Proteinkinasen pim-1 Oncogene und c-abl Oncogene (ebenfalls Abb. 9C).

Es lässt sich schlussfolgern, dass Rapamycin ausgesprochen pleiotrope Effekte auf die Transkription proliferations- und apoptose-assoziiierter Gene hat. Dies könnte zum einen erklären, dass es sowohl anti-proliferative²⁹ als auch in höherer Konzentration anti-apoptotische⁹⁷ Eigenschaften hat. Durch die Kombination dieser Effekte wird möglicherweise eine grundlegende Ruhigstellung der Zellen nach Gefässverletzung erreicht, welche einen raschen und blanden Heilungsprozess ermöglicht.

Auch auf mechanistischer Ebene können diese pleiotropen Eigenschaften die hohe Wirksamkeit von Rapamycin in der Behandlung der In-Stent-Restenose erklären. Aufgrund der nachgewiesenen funktionellen Redundanz in der Regulation von Genen, die für wachstumssteuernde Proteine glatter Muskelzellen kodieren, scheint es, dass die Hemmung einzelner Zielgene durch beispielsweise niedermolekulare Wirkstoffe nicht ausreichend ist, um die vasoproliferative Antwort effektiv zu hemmen, da andere Proteine mit ähnlicher Funktion weiterhin aktiv bleiben. Rapamycin hingegen scheint das Proliferationsverhalten an verschiedensten Ansatzpunkten, d.h. pleiotrop, zu beeinflussen. Neben der oben dargelegten Transkriptionshemmung ist auch die Hemmung der mTOR-Kinase durch den Rapamycin/FKBP-Komplex von grosser Bedeutung, da mTOR ein ausserordentlich zentraler Wachstumsregulator ist⁶⁸. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Rapamycin neben der Proliferation auch die Migration glatter Muskelzellen durch seinen Effekt auf mTOR hemmt⁵⁴. Interessanterweise kommt es nach einer Gefässverletzung zur beständigen Aktivierung von Akt, einem positivem Regulator von mTOR⁹⁵. Dies stimmt mit einer nachfolgend einhergehenden Aktivierung von mTOR in humaner Neointima überein⁹⁷. Rapamycin als mTOR-Inhibitor könnte daher auch die Aktivierung des mTOR-Signaltransduktionsweges, welcher für die Replikation glatter Muskelzellen wichtig ist⁷⁵, verhindern.

5.3.2 Effekt von Rapamycin auf Gene des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix

Wie unter 1.2 und 4.2.4 beschrieben, kommt es während der Neointimaformation nach der proliferativen Phase zur überschüssigen Bildung extrazellulärer Matrix. Wie sich aus Abbildung 9A schliessen lässt, führt die Behandlung der dilatierten Gefässe mit Rapamycin auch zu einer verminderten Expression vieler Gene aus dem Bereich des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix und der Zelladhäsion. Bei den nach Angioplastie induzierten Genen (Abbildung 9B) war auffällig, dass die Induktion der Kollagensubtypen COL1A2 und

COL2A1 durch Rapamycin inhibiert wird. Shi et al.⁷⁴ konnten im Schweinmodell zeigen, dass es nach Ballonangioplastie zu einer dauerhaften Anhäufung von Typ-I Kollagen in der Neointima kommt. Die Daten aus dem Organkulturmodell stimmen somit mit dem Tiermodell überein und geben eine weitere Rationale für die therapeutische Wirksamkeit von Rapamycin. Unter den konstitutionell exprimierten Genen, deren Expression durch Rapamycin reduziert wurde, waren mehrere Faktoren des Gerinnungssystems sowie eine Gruppe verschiedener Integrine (ITGA5, ITGB3, ITGB8), die für die Adhäsion von Fibronectin wesentlich sind. Diese Unterdrückung pro-koagulatorischer Faktoren sowie der Integrine könnte erklären, warum Rapamycin in einer Vorarbeit dieser Arbeitsgruppe die Adhäsivität glatter Muskelzellen für monozytäre Zellen reduzierte⁹⁷. Dazu passend konnten Molossi et al.⁴⁷ im Kaninchenmodell der Transplantatvaskulopathie zeigen, dass eine gezielte Blockade des CS1-Peptides von Fibronectin zu einer verminderten Zunahme der Intimadicke -einhergehend mit einer verminderten Ansammlung von T-Zellen und Fibronectin sowie einer verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen- führt.

5.3.3 Reduktion der Expression pro-inflammatorischer Gene

Wie in den vorangegangenen Abschnitten bereits erkennbar ist, verfügt Rapamycin über pleiotrope Eigenschaften. Um seine anti-inflammatorischen Effekte nach Angioplastie besser zu verstehen, erscheint es sinnvoll, im folgenden kurz auf andere vaso-okklusive Erkrankungen wie die Transplantatvaskulopathie und die hypercholesterolämisch bedingte Atherosklerose einzugehen, da diese pathophysiologische Gemeinsamkeiten mit der Restenose nach Angioplastie aufweisen.

Beispielsweise konnten Sata et al.⁶⁶ in allen drei verschiedenen Modellen zeigen, dass aus dem Knochenmark stammende Zellen einen grossen Teil der zum arteriellen „Remodeling“ beitragenden glatten Muskelzellen ausmachen. Vor allem aber spielt in allen drei Vaskulopathien die Inflammation eine wichtige Rolle^{1,19,64}.

Nachdem Rapamycin sowohl die Transplantatvaskulopathie im Menschen verlangsamt⁴⁴ als auch das Voranschreiten der Atherosklerose in der hypercholesterinämischen ApoE^{-/-}-Maus⁹, könnte sein Wirkmechanismus in diesen Krankheiten auch von Bedeutung für seine beeindruckende Effektivität in der Reduktion der Restenose nach Angioplastie sein.

So verringerte Rapamycin in einem Modell der allogenen Herztransplantation an der Ratte die IL-8-Expression und senkte deutlich die Infiltration der Gefässwand mit Neutrophilen⁹³. Auch

im Organkulturmodell kam es zur vermehrten Expression von IL-8, welche durch die Behandlung mit Rapamycin vollständig inhibiert wurde. Beeindruckenderweise verringerte die Rapamycinbehandlung darüberhinaus die Expression der CXC Chemokine 6-8 (GCP-2, β -Thromboglobulin, IL-8) und von CD73 und EMAP-II. Diese spielen alle eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Migration zirkulierender Granulozyten und Monozyten.

Betreffend der atheroprotektiven Wirkung von Rapamycin in der ApoE^{-/-}-Maus konnten Castro et al.⁹ zeigen, dass dieser anti-inflammatorische Effekt von Rapamycin nicht über den Zellzyklusinhibitor p27(Kip1) vermittelt wird. So hatte eine Behandlung von ApoE^{-/-}-p27(Kip1)^{-/-}-Mäusen mit Rapamycin den nahezu gleichen atheroprotektiven Effekt wie in ApoE^{-/-}-p27(Kip1)^{+/+}-Mäusen. Diese Daten legen nahe, dass Rapamycin neben den über eine Induktion von p27(Kip1) vermittelten anti-proliferativen und anti-migratorischen Effekten⁶² weitere bislang unbekannte Signaltransduktionswege beeinflusst. Die im Organkulturmodell beobachtete synergistische Hemmung der CXC Chemokine 6-8 könnte hier ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen darstellen.

Auch bei den konstitutionell im Gefäß exprimierten Genen führte eine Rapamycinbehandlung zu einer Verminderung der Expression einer Vielzahl von Inflammations-assoziierten Genen. So wurde beispielsweise die Expression der für die Leukozytenadhäsion wichtigen Gene integrin beta 2 (CD18) und ICAM1 reduziert. Auch die Expression von CXCR4, eines auf Vorläuferzellen exprimierten Chemokinrezeptors als auch des Interferon-gamma Rezeptors wurde vermindert. Diese Veränderungen könnten zum einen zusätzlich zu den unter 5.3.2 beschriebenen Einflüssen zu den anti-adhäsiven Eigenschaften von Rapamycin beitragen und zum anderen eine generelle Abschwächung der Ausprägung eines pro-inflammatorischen Milieus nach Ballondilatation bedeuten.

5.3.4 Hemmung Stammzell-assoziiierter Gene

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Wirkungen konnten Jayaraman et al.²⁹ belegen, dass Rapamycin in einer myogenen Zelllinie eine Differenzierung der Zellen induziert. Dazu passend verminderte Rapamycin im Organkulturmodell die Expression mehrerer Gene, die das Wachstum immaturer, sich noch differenzierender Zellen fördern. So ist CD157, auch bekannt als bone marrow stromal antigen 1, wesentlich für die Bildung von zyklischer ADP-ribose, welche selbst wiederum das Wachstum humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen stimuliert⁵². Ferner reduzierte Rapamycin die Expression des Oncostatin M Rezeptors beta

(OSMRB), der für die Stimulation hämatopoetischer und stromaler Vorläuferzellen notwendig ist⁸⁵. Interessanterweise verstärkt eine Ko-Expression von JAK1 die OSMRB-Expression⁵⁹. Die Rapamycinbehandlung hemmt die Induktion von JAK1 nach Angioplastie und könnte so eine über eine vermehrte OSMRB-Expression induzierte Stimulation hämatopoetischer und stromaler Vorläuferzellen verhindern.

Daneben verhinderte die Rapamycinbehandlung die Heraufregulation von IL-8 und MMP-9, die wie unter 5.2.6 beschrieben, zur Mobilisierung hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark beitragen. Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Daten lässt sich jedoch nicht abschätzen, ob die Unterdrückung einer lokalen Freisetzung dieser Zytokine mittels eines medikamentenfreisetzenden Stents *in vivo* einen Einfluss auf die systemische Mobilisierung der Vorläuferzellen hat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Rapamycin ausgeprägte inhibitorische Effekte auf das pro-inflammatorische Genexpressionsmuster und auf Promotoren hämatopoetischer Vorläuferzellen nach Gefässverletzung hat. Nachdem es bislang kaum Arbeiten gibt, die eine Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen in der humanen Vaskulatur belegen, liefert die vorliegende Arbeit weitere Theorien wie Rapamycin im Menschen die Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen in die Gefässwand verhindern könnte. Dies könnte auch - vor allem unter der Perspektive, dass die Menge der rekrutierten Leukozyten mit dem Ausmass der Neointimaformation korreliert¹⁹ - die hohe Effektivität von Rapamycin in der Behandlung der In-Stent-Restenose erklären.

Um die Signifikanz der einzelnen transkriptionellen Veränderungen hinsichtlich des späteren Auftretens der Restenose abschätzen zu können, bedarf es noch weiterer *in vivo* und *in vitro* Arbeiten. In jedem Falle stellt das Organkulturmodell aber eine gute Methode dar, neue Medikamente zur Behandlung der Restenose hinsichtlich ihrer molekularen Wirkungen zu untersuchen. Gemäss den hier erhobenen Daten werden für jeden neuen Wirkstoff pleiotrope Eigenschaften unentbehrlich sein, um in einen berechtigten Wettbewerb mit Rapamycin -dem bislang effektivsten Medikament in der Behandlung der Restenose- eintreten zu können.

6. Zusammenfassung

Hintergrund und Fragestellung

Eines der schwerwiegenden Probleme der interventionellen Kardiologie stellte bislang die koronare Restenose im Stent dar. Erst durch die Einführung eines Rapamycin-freisetzenden-Stents konnte die Restenoserate erheblich gesenkt werden^{41,48,80}. Trotz dieses therapeutischen Erfolges sind die transkriptionellen pathophysiologischen Mechanismen der Neointimahyperplasie, die zu über 90% für den Lumenverlust nach koronarer Stentimplantation verantwortlich ist, sowie deren Beeinflussung durch Rapamycin nur teilweise verstanden.

Methodik

Die vorliegende Arbeit untersuchte deshalb in einem humanen Organkulturmodell auf genregulatorischer Ebene die molekularen Mechanismen, die der Neointimaformation im Menschen zu Grunde liegen, sowie die Beeinflussung dieser Mechanismen durch eine Behandlung mit Rapamycin.

Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass (1) die Veränderungen in der Genexpression einem zeitlichen Muster folgen mit maximalen Veränderungen 21 Tage nach Ballondilatation; (2) die inflammatorische Komponente zu den frühen Zeitpunkten eine wichtigere Rolle spielt während Proliferation und Apoptose die späteren Veränderungen in der Genexpression dominieren; (3) die Ballonangioplastie ein Genexpressionsprofil induziert, welches die Rekrutierung und Aktivierung sowohl inflammatorischer als auch hämatopoetischer Vorläuferzellen erleichtert; (4) Rapamycin die Induktion eines solchen pro-adhäsiven, pro-inflammatorischen Genexpressionsmusters als auch die Induktion von HPC-stimulierenden Genen verhindert.

Diskussion

Eine zeitlich gestaffelte Genexpressionsanalyse menschlicher Arterien nach Ballonangioplastie ist bisher nicht veröffentlicht worden. In dieser Arbeit zeigte sich, dass die Veränderungen in der Genexpression einem zeitlichen Muster folgen mit einer maximalen Alteration nach 21 Tagen und nur wenigen ausschließlich nach 56 Tagen regulierten Genen. Somit lässt sich schlussfolgern, dass eine spätere Restenose die Folge einer frühen, gestörten

Wundheilung ist. Diese Auffassung wird durch die beeindruckende Verminderung der In-Stent-Restenose durch Rapamycin-freisetzende Stents unterstützt, da diese Stents etwa 80 Prozent der totalen Medikamentendosis innerhalb der ersten 30 Tage freisetzen^{48,80}.

Während die Proliferation bekanntermassen eine wichtige Rolle für die Neointimaformation spielt, wurde die Bedeutung inflammatorischer Prozesse, welche zur Rekrutierung von Leukozyten und hämatopoetischen Vorläuferzellen führen, erst später vermehrt beschrieben^{16,18,19,27,60,76,80,88}. Die koordinierte Induktion eines in dieser Arbeit nachgewiesenen pro-inflammatorischen Genexpressionsmusters stellt eine beeindruckende Rationale für eine umfangreiche Rekrutierung von Leukozyten nach Ballondilatation dar. Zytokine wie IL-8, EMAP-II, NAP-2 oder GCP-2 waren nach Angioplastie vermehrt exprimiert und verstärken die Migration von Granulozyten. Die mechanisch induzierte Aktivierung dieses Genexpressionsmusters begünstigt somit die Leukozytenrekrutierung und dadurch auch die Restenose, da die Dichte inflammatorischer Zellen in der Neointima mit dem Ausmass der Restenose korreliert¹⁹.

Als weiterer Mechanismus der Neointimaformation wurde kürzlich die Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen im Tiermodell nachgewiesen^{66,69}. Es war jedoch bisher nicht bekannt, ob sich diese Beobachtungen auf den Menschen übertragen lassen. Im Organkulturmodell zeigte sich nach Angioplastie die vermehrte Expression von einigen mit hämatopoetischen Vorläuferzellen assoziierten Genen. Dies weist daraufhin, dass diese Mechanismen auch im Menschen eine Rolle spielen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss des Makrolidantibiotikums Rapamycin auf die transkriptionellen Mechanismen nach Ballonangioplastie untersucht.

Zunächst spiegelten sich die bekannten antiproliferativen Effekte von Rapamycin in einer deutlich verminderten Expression von wachstumsassoziierten Genen wie verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Kinasen wie JAK1 oder AKT1 wieder. Darüberhinaus führte die Rapamycinbehandlung zu einer koordinierten Hemmung der CXC Chemokine 6-8 (GCP-2, β -Thromboglobulin, IL-8) und von EMAP-II, welche alle eine wichtige Rolle in der Adhäsion, der Migration und der Aktivierung von Neutrophilen und Monozyten spielen. Folglich könnte eine durch Rapamycin verminderte Rekrutierung und Aktivierung dieser Zellen ein wesentlicher Mechanismus in der Reduktion der Neointimaformation sein. Zusätzlich unterstützt diese Arbeit die Hypothese, dass Rapamycin auch direkte Effekte auf

hämatopoetische Vorläuferzellen hat. Im Organkulturmodell führte eine Rapamycinbehandlung zur verminderten Expression verschiedener Gene wie des Oncostatin M Rezeptors beta und JAK1, welche das Wachstum immaturer, noch differenzierender Zellen in der Gefäßwand fördern.

Es lässt sich zusammenfassen, dass Rapamycin neben seiner anti-proliferativen Wirkung nach Ballonangioplastie tiefgreifende hemmende Effekte auf das pro-inflammatorische Genexpressionsmuster und auf Promotoren hämatopoetischer Vorläuferzellen verübt. Somit zeigt diese Arbeit erstmals eine Rationale auf, wie Rapamycin auch im Menschen die Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen in die Gefäßwand verhindern könnte. Dies vermag möglicherweise seine hohe Effektivität in der Reduzierung der Restenose erklären.

7. Literaturverzeichnis

1. Ardehali,A. *et al.* Experimental cardiac allograft vasculopathy in mice. *J. Heart Lung Transplant.* **12**, 730-735 (1993).
2. Arjomand,H., Turi,Z.G., McCormick,D. & Goldberg,S. Percutaneous coronary intervention: historical perspectives, current status, and future directions. *Am. Heart J.* **146**, 787-796 (2003).
3. Bai,H. *et al.* Neointima formation after vascular stent implantation. Spatial and chronological distribution of smooth muscle cell proliferation and phenotypic modulation. *Arterioscler. Thromb.* **14**, 1846-1853 (1994).
4. Bowman,G.D., O'Donnell,M. & Kuriyan,J. Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. *Nature* **429**, 724-730 (2004).
5. Brara,P.S. *et al.* Pilot trial of oral rapamycin for recalcitrant restenosis. *Circulation* **107**, 1722-1724 (2003).
6. Braunwald,E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1360-1369 (1997).
7. Carmeliet,P. *et al.* Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* **7**, 575-583 (2001).
8. Carter,A.J. *et al.* Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model. *J. Am. Coll. Cardiol.* **24**, 1398-1405 (1994).
9. Castro,C. *et al.* Rapamycin attenuates atherosclerosis induced by dietary cholesterol in apolipoprotein-deficient mice through a p27 Kip1 -independent pathway. *Atherosclerosis* **172**, 31-38 (2004).
10. Cha,K.S. *et al.* Comparison between a sustained administration of carvedilol versus atenolol to reduce restenosis after coronary stenting. *Am. Heart J.* **147**, E7 (2004).
11. Chen,D. *et al.* Antibody blockade of thrombospondin accelerates reendothelialization and reduces neointima formation in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* **100**, 849-854 (1999).
12. Chung,I.M. *et al.* Enhanced extracellular matrix accumulation in restenosis of coronary arteries after stent deployment. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**, 2072-2081 (2002).
13. Daemen,M.A. *et al.* Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J. Clin. Invest* **104**, 541-549 (1999).
14. Donovan,M.J. *et al.* Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am. J. Pathol.* **147**, 309-324 (1995).
15. Dunder,Y., Hill,R.A., Bakhai,A., Dickson,R. & Walley,T. Angioplasty and stents in coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. *Scand. Cardiovasc. J.* **38**, 200-210 (2004).
16. Egashira,K. *et al.* Importance of monocyte chemoattractant protein-1 pathway in neointimal hyperplasia after periarterial injury in mice and monkeys. *Circ. Res.* **90**, 1167-1172 (2002).
17. Eisen,M.B., Spellman,P.T., Brown,P.O. & Botstein,D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 14863-14868 (1998).

18. Farb,A. *et al.* Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation* **99**, 44-52 (1999).
19. Farb,A., Weber,D.K., Kolodgie,F.D., Burke,A.P. & Virmani,R. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation* **105**, 2974-2980 (2002).
20. Ferns,G.A. *et al.* Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* **253**, 1129-1132 (1991).
21. Fischman,D.L. *et al.* A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* **331**, 496-501 (1994).
22. Gallo,R. *et al.* Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation* **99**, 2164-2170 (1999).
23. Gruntzig,A.R., Senning,A. & Siegenthaler,W.E. Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N. Engl. J. Med.* **301**, 61-68 (1979).
24. Gurish,M.F. *et al.* Intestinal mast cell progenitors require CD49beta7 (alpha4beta7 integrin) for tissue-specific homing. *J. Exp. Med.* **194**, 1243-1252 (2001).
25. Hausleiter,J. *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral sirolimus for restenosis prevention in patients with in-stent restenosis: the Oral Sirolimus to Inhibit Recurrent In-stent Stenosis (OSIRIS) trial. *Circulation* **110**, 790-795 (2004).
26. Heissig,B. *et al.* Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* **109**, 625-637 (2002).
27. Horvath,C., Welt,F.G., Nedelman,M., Rao,P. & Rogers,C. Targeting CCR2 or CD18 inhibits experimental in-stent restenosis in primates: inhibitory potential depends on type of injury and leukocytes targeted. *Circ. Res.* **90**, 488-494 (2002).
28. Isner,J.M., Kearney,M., Bortman,S. & Passeri,J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* **91**, 2703-2711 (1995).
29. Jayaraman,T. & Marks,A.R. Rapamycin-FKBP12 blocks proliferation, induces differentiation, and inhibits cdc2 kinase activity in a myogenic cell line. *J. Biol. Chem.* **268**, 25385-25388 (1993).
30. Jo,D.Y., Rafii,S., Hamada,T. & Moore,M.A. Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1. *J. Clin. Invest* **105**, 101-111 (2000).
31. Johnson,D.G., Ohtani,K. & Nevins,J.R. Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression. *Genes Dev.* **8**, 1514-1525 (1994).
32. Kang,H.J. *et al.* Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* **363**, 751-756 (2004).
33. Kao,J. *et al.* Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J. Biol. Chem.* **267**, 20239-20247 (1992).
34. Kastrati,A., Schömig,A., Dietz,R., Neumann,F.J. & Richardt,G. Time course of restenosis during the first year after emergency coronary stenting. *Circulation* **87**, 1498-1505 (1993).
35. Kastrati,A. *et al.* Prognostic value of the modified american college of Cardiology/American heart association stenosis morphology classification for long-term angiographic and clinical outcome after coronary stent placement. *Circulation* **100**, 1285-1290 (1999).

36. Kearney, M. *et al.* Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* **95**, 1998-2002 (1997).
37. Klein, C.A. *et al.* Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat. Biotechnol.* **20**, 387-392 (2002).
38. Komatsu, R., Ueda, M., Naruko, T., Kojima, A. & Becker, A.E. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation* **98**, 224-233 (1998).
39. Kornowski, R. *et al.* In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J. Am. Coll. Cardiol.* **31**, 224-230 (1998).
40. Kumar, A., Hoover, J.L., Simmons, C.A., Lindner, V. & Shebuski, R.J. Remodeling and neointimal formation in the carotid artery of normal and P-selectin-deficient mice. *Circulation* **96**, 4333-4342 (1997).
41. Lemos, P.A. *et al.* Unrestricted utilization of sirolimus-eluting stents compared with conventional bare stent implantation in the "real world": the Rapamycin-Eluting Stent Evaluated At Rotterdam Cardiology Hospital (RESEARCH) registry. *Circulation* **109**, 190-195 (2004).
42. Liistro, F. *et al.* First clinical experience with a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system implantation for in-stent restenosis: immediate and long-term clinical and angiographic outcome. *Circulation* **105**, 1883-1886 (2002).
43. Ma, Y.H., Ling, S. & Ives, H.E. Mechanical strain increases PDGF-B and PDGF beta receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 606-610 (1999).
44. Mancini, D. *et al.* Use of rapamycin slows progression of cardiac transplantation vasculopathy. *Circulation* **108**, 48-53 (2003).
45. Marx, S.O. & Marks, A.R. Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis. *Circulation* **104**, 852-855 (2001).
46. Mintz, G.S. *et al.* Intravascular ultrasound to discern device-specific effects and mechanisms of restenosis. *Am. J. Cardiol.* **78**, 18-22 (1996).
47. Molossi, S. *et al.* Blockade of very late antigen-4 integrin binding to fibronectin with connecting segment-1 peptide reduces accelerated coronary arteriopathy in rabbit cardiac allografts. *J. Clin. Invest* **95**, 2601-2610 (1995).
48. Moses, J.W. *et al.* Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1315-1323 (2003).
49. O'Keefe, J.H., Jr. *et al.* Ineffectiveness of colchicine for the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.* **19**, 1597-1600 (1992).
50. Patel, M.K., Chan, P., Betteridge, L.J., Schachter, M. & Sever, P.S. Inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by the novel multiple-action antihypertensive agent carvedilol. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **25**, 652-657 (1995).
51. Pearson, R.B. & Thomas, G. Regulation of p70s6k/p85s6k and its role in the cell cycle. *Prog. Cell Cycle Res.* **1**, 21-32 (1995).
52. Podesta, M. *et al.* Extracellular cyclic ADP-ribose increases intracellular free calcium concentration and stimulates proliferation of human hemopoietic progenitors. *FASEB J.* **14**, 680-690 (2000).

-
53. Poon,M., Badimon,J.J. & Fuster,V. Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality. *Lancet* **359**, 619-622 (2002).
 54. Poon,M. *et al.* Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J. Clin. Invest* **98**, 2277-2283 (1996).
 55. Poston,R.S. *et al.* Rapamycin reverses chronic graft vascular disease in a novel cardiac allograft model. *Circulation* **100**, 67-74 (1999).
 56. Proost,P. *et al.* Identification of a novel granulocyte chemotactic protein (GCP-2) from human tumor cells. In vitro and in vivo comparison with natural forms of GRO, IP-10, and IL-8. *J. Immunol.* **150**, 1000-1010 (1993).
 57. Pruijt,J.F. *et al.* Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 10863-10868 (1999).
 58. Quinn,T.P., Schlueter,M., Soifer,S.J. & Gutierrez,J.A. Cyclic mechanical stretch induces VEGF and FGF-2 expression in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **282**, L897-L903 (2002).
 59. Radtke,S. *et al.* Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 11297-11305 (2002).
 60. Rogers,C., Edelman,E.R. & Simon,D.I. A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 10134-10139 (1998).
 61. Rogers,C., Welt,F.G., Karnovsky,M.J. & Edelman,E.R. Monocyte recruitment and neointimal hyperplasia in rabbits. Coupled inhibitory effects of heparin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 1312-1318 (1996).
 62. Roque,M. *et al.* Effect of p27 deficiency and rapamycin on intimal hyperplasia: in vivo and in vitro studies using a p27 knockout mouse model. *Lab Invest* **81**, 895-903 (2001).
 63. Rosenzweig,M., Tailleux,L. & Gluckman,J.C. CD13/N-aminopeptidase is involved in the development of dendritic cells and macrophages from cord blood CD34(+) cells. *Blood* **95**, 453-460 (2000).
 64. Ross,R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115-126 (1999).
 65. Ryckman,C., Vandal,K., Rouleau,P., Talbot,M. & Tessier,P.A. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J. Immunol.* **170**, 3233-3242 (2003).
 66. Sata,M. *et al.* Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat. Med.* **8**, 403-409 (2002).
 67. Schenk,B.I., Petersen,F., Flad,H.D. & Brandt,E. Platelet-derived chemokines CXC chemokine ligand (CXCL)7, connective tissue-activating peptide III, and CXCL4 differentially affect and cross-regulate neutrophil adhesion and transendothelial migration. *J. Immunol.* **169**, 2602-2610 (2002).
 68. Schmelzle,T. & Hall,M.N. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**, 253-262 (2000).
 69. Schober,A., Knarren,S., Lietz,M., Lin,E.A. & Weber,C. Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **108**, 2491-2497 (2003).

-
70. Schwartz,R.S. Animal Models of Human Coronary Restenosis. In *Textbook of Interventional Cardiology*, E.J. Topol, Ed. (Philadelphia, W.B.Saunders Company). 358-378. 1999.
Ref Type: Generic
 71. Scott-Burden,T., Resink,T.J., Baur,U., Burgin,M. & Buhler,F.R. Activation of S6 kinase in cultured vascular smooth muscle cells by submitogenic levels of thrombospondin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**, 278-286 (1988).
 72. Sehgal,S.N., Baker,H. & Vezina,C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **28**, 727-732 (1975).
 73. Serruys,P.W. *et al.* A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N. Engl. J. Med.* **331**, 489-495 (1994).
 74. Shi,Y. *et al.* Origin of extracellular matrix synthesis during coronary repair. *Circulation* **95**, 997-1006 (1997).
 75. Shigematsu,K., Koyama,H., Olson,N.E., Cho,A. & Reidy,M.A. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling is important for smooth muscle cell replication after arterial injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2373-2378 (2000).
 76. Simon,D.I. *et al.* Decreased neointimal formation in Mac-1(-/-) mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty. *J. Clin. Invest* **105**, 293-300 (2000).
 77. Skeel,A. *et al.* Macrophage stimulating protein: purification, partial amino acid sequence, and cellular activity. *J. Exp. Med.* **173**, 1227-1234 (1991).
 78. Smith,W.B., Gamble,J.R., Clark-Lewis,I. & Vadas,M.A. Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology* **72**, 65-72 (1991).
 79. Sousa,J.E. *et al.* Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation* **103**, 192-195 (2001).
 80. Sousa,J.E. *et al.* Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation* **104**, 2007-2011 (2001).
 81. Sousa,J.E. *et al.* Two-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up after implantation of sirolimus-eluting stents in human coronary arteries. *Circulation* **107**, 381-383 (2003).
 82. Stone,G.W. *et al.* One-year clinical results with the slow-release, polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS stent: the TAXUS-IV trial. *Circulation* **109**, 1942-1947 (2004).
 83. Suzuki,T. *et al.* Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* **104**, 1188-1193 (2001).
 84. Tanaka,K., Sata,M., Hirata,Y. & Nagai,R. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circ. Res.* **93**, 783-790 (2003).
 85. Tanaka,M. *et al.* Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* **102**, 3154-3162 (2003).
 86. Teirstein,P.S. & Kuntz,R.E. New frontiers in interventional cardiology: intravascular radiation to prevent restenosis. *Circulation* **104**, 2620-2626 (2001).

-
87. Vezina,C., Kudelski,A. & Sehgal,S.N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot. (Tokyo)* **28**, 721-726 (1975).
 88. Virmani,R. & Farb,A. Pathology of in-stent restenosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **10**, 499-506 (1999).
 89. Voisard,R. *et al.* A human arterial organ culture model of postangioplasty restenosis: results up to 56 days after ballooning. *Atherosclerosis* **144**, 123-134 (1999).
 90. Walz,A. & Baggiolini,M. Generation of the neutrophil-activating peptide NAP-2 from platelet basic protein or connective tissue-activating peptide III through monocyte proteases. *J. Exp. Med.* **171**, 449-454 (1990).
 91. Wang,J.M., Griffin,J.D., Rambaldi,A., Chen,Z.G. & Mantovani,A. Induction of monocyte migration by recombinant macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* **141**, 575-579 (1988).
 92. Welt,F.G., Edelman,E.R., Simon,D.I. & Rogers,C. Neutrophil, not macrophage, infiltration precedes neointimal thickening in balloon-injured arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2553-2558 (2000).
 93. Wieder,K.J. *et al.* Rapamycin treatment depresses intragraft expression of KC/MIP-2, granzyme B, and IFN-gamma in rat recipients of cardiac allografts. *J. Immunol.* **151**, 1158-1166 (1993).
 94. Yasukawa,H., Imaizumi,T., Matsuoka,H., Nakashima,A. & Morimatsu,M. Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury by antibodies to intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1. *Circulation* **95**, 1515-1522 (1997).
 95. Zhou,R.H. *et al.* Stent implantation activates Akt in the vessel wall: role of mechanical stretch in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 2015-2020 (2003).
 96. Zohlhöfer,D. *et al.* Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: Detection of FK506-binding protein 12 upregulation. *Circulation* **103**, 1396-1402 (2001).
 97. Zohlhöfer,D. *et al.* Rapamycin effects transcriptional programs in smooth muscle cells controlling proliferative and inflammatory properties. *Mol. Pharmacol.* **65**, 880-889 (2004).
 98. Zohlhöfer,D. *et al.* Transcriptome analysis reveals a role of interferon-gamma in human neointima formation. *Mol. Cell* **7**, 1059-1069 (2001).

8. Danksagung

Ganz herzlich danken möchte ich Frau PD Dr. Dietlind Zohlhöfer, die mir den Einstieg in die Grundlagenforschung und die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit gegeben hat. Ohne Ihre langjährige, beständige Betreuung und Unterstützung wäre die Fertigstellung dieses Projektes nicht denkbar gewesen.

Herrn Professor Patrick A. Baeuerle danke ich außerordentlich für die Schaffung idealer Arbeitsbedingungen bei der Micromet AG, München, unter denen der Grundstein und der grösste Teil der vorliegenden Arbeit entstanden ist. Auch für die Möglichkeit zum Besuch internationaler Kongresse möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Herrn PD Dr. Rainer Voisard möchte ich ausserordentlich danken für die gute Zusammenarbeit und das Bereitstellen der kultivierten Arteriensegmente.

Meinen Mitdoktoranden Frau Katja Denker, Frau Stefanie Jellinghaus und Frau Pamela Frank möchte ich für ihre kollegiale Zusammenarbeit und die gemeinsam erlebte Zeit danken. Auch gilt mein besonderer Dank den wissenschaftlichen Mitarbeitern Herrn Alexander Murr und Herrn Falko Sorge für deren labortechnische Anleitung und Hilfestellung.

Meinen Eltern und meinen Brüdern danke ich von ganzem Herzen für ihre Anteilnahme und ihre Unterstützung.

9. Lebenslauf

Name: Thomas Georg Nührenberg

Adresse: Kufsteiner Str. 16 b
85521 Riemerling

Geburtsdatum: 22. Mai 1976 in München

Schulische Ausbildung

1982 – **Grundschule Riemerling**
1986
1986 – **Gymnasium Ottobrunn**
1995 Abitur im neusprachlichem Zweig (Note 1,5)

Zivildienst

09/1995 – **Friedel-Eder-Schule für seelenpflegebedürftige Kinder**
10/1996 München - Engelschalking

Akademische Ausbildung

10/1996-11/2002 **Studium der Humanmedizin**
an der Technischen Universität München
08/1998 **Physikum**
mit der Note „gut“
08/1999 **Erstes Staatsexamen**
mit der Note „sehr gut“
08/2001 **Zweites Staatsexamen**
mit der Note „gut“
11/2002 **Drittes Staatsexamen**
mit der Note „sehr gut“

Berufliche Tätigkeiten

01/2003- **Deutsches Herzzentrum München,**
06/2004 **Klinikum des Freistaates Bayern an der Technischen Universität München**
Arzt im Praktikum
07/2004 - **Jacobi Medical Center, Albert Einstein College of Medicine, New York**
Facharztausbildung in Innerer Medizin (Internal Medicine Residency)

Ehrenamtliche Tätigkeiten – Mitgliedschaften

Seit 1982 **Bund der Pfadfinderinnen und Pfadfinder e.V.**
1994 – 1998 Gruppenleiter und Schatzmeister
1996 – 2000 **Arbeitsgemeinschaft Jugend Ottobrunn, Kassenwart**
1998 – 2001 **Kreisjugendring München-Land; Pullach, Vorstandsmitglied**
seit 1998 **Johanniter - Unfall – Hilfe e.V.; München, Rettungssanitäter**

Interessen

Skifahren, Windsurfen, Reisen, Klavier