

**Atherogenese und arterielles Remodeling der Maus:
Morphologische und molekularbiologische Untersuchungen
an Wildtyp- und Apolipoprotein E-Knockout-Mäusen**

Dissertation

zum Erwerb des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Nicole John
geboren am 13.07.1976 in Bad Frankenhausen

Tag der öffentlichen Disputation: 25.02.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Wetzker, Reinhard, Friedrich-Schiller-Universität Jena

2. Gutachter: PD Dr. Kaiser, Brigitte, Friedrich-Schiller-Universität Jena

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Schrör, Karsten, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Atherosklerose	1
1.2	Arteriellles Remodeling	4
1.2.1	Positives arterielles Remodeling	5
1.2.2	Negatives arterielles Remodeling	5
1.3	Bedeutung innater und adaptiver Immunreaktionen für Atherosklerose und arterielles Remodeling	6
1.4	Die Rolle ECM-degradierender Enzyme bei Atherosklerose und arteriellem Remodeling	11
1.5	Tierexperimentelle Systeme	13
1.6	Zielstellung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Geräte, Reagenzien und Lösungen	16
2.2	Versuchstiere	16
2.2.1	Mauspopulationen	16
2.2.2	Genehmigung der Tierversuche	16
2.2.3	Narkotisierung der Tiere	16
2.3	Untersuchungen an der A. carotis	17
2.3.1	Präparation und intraluminale Schädigung der A. carotis	17
2.3.2	<i>In vivo</i> -Markierung der A. carotis mit Evans Blau	18
2.3.3	<i>Ex vivo</i> -Aufarbeitung der A. carotis für histologische Untersuchungen	18
2.3.4	<i>Ex vivo</i> -Aufarbeitung der A. carotis für molekularbiologische Untersuchungen	19
2.3.5	RNA-Präparation aus der A. carotis	19
2.4	Untersuchungen an der Aorta	20
2.4.1	Präparation der Aorta für molekularbiologische Untersuchungen	20
2.4.2	RNA-Präparation aus der Aorta	20
2.5	Aufarbeitung der RNA-Extrakte der A. carotis und der Aorta	20
2.5.1	Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung	20
2.5.2	Qualitätskontrolle der RNA	21
2.6	Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)-Analysen der A. carotis und der Aorta	21
2.6.1	Reverse Transkription der RNA (RT-PCR)	21
2.6.2	Primerdesign mit Primer 3	21
2.6.3	Primeretablierung mit Blockcycler-PCR	22
2.6.4	Reamplifikation des PCR-Produkts aus der Etablierung	22
2.6.5	Sequenzierung des PCR-Produkts	23
2.6.6	Herstellung der Standards für die qRT-PCR	23
2.6.7	Durchführung der qRT-PCR	23
2.7	Microarrayanalysen der Aorta (Affymetrix™)	24
2.7.1	Prinzipielle Vorgehensweise bei der Aufbereitung der RNA-Proben	24
2.7.2	Mouse Genome 430 2.0 Array	25

2.7.3	Scannen und Auswertung des GeneChip®	25
2.8	Histologische Färbungen	26
2.8.1	Hämatoxylin-Färbung	26
2.8.2	Orcein-Hämatoxylin-Färbung	26
2.8.3	Ölrot O-Hämatoxylin-Färbung	27
2.9	Immunhistochemische Markierungen	27
2.9.1	Immunhistochemie	27
2.9.2	Immunfluoreszenz	28
2.9.3	5-Brom-2'-desoxy-Uridin (BrdU)-Markierung	28
2.10	Auswertung der morphologischen Untersuchungen	28
2.10.1	Auswertung der Hämatoxylin- und BrdU-gefärbten Schnitte	28
2.10.2	Morphometrische Analyse der Orcein-Schnitte	29
2.10.3	Auswertung der Immunfluoreszenzmarkierungen	29
2.11	Statistik	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Untersuchungen zum arteriellen Remodeling an der A. carotis der Maus	30
3.1.1	Etablierung des tierexperimentellen Modells einer mechanischen Endothelschädigung	30
3.1.1.1	Nachweis der Schädigung des Gefäßendothels	30
3.1.1.2	<i>In vivo</i> -Nachweis proliferierender Zellen durch Markierung mit BrdU	32
3.1.2	Morphometrische Analyse von Gefäßschnitten der A. carotis	33
3.1.2.1	Arteriell Remodeling der A. carotis der WT-Maus	33
3.1.2.2	Arteriell Remodeling der A. carotis der ApoE ^{-/-} -Maus	34
3.1.3	Histologische und morphometrische Unterschiede zwischen WT- und ApoE ^{-/-} -Mäusen in der geschädigten A. carotis	36
3.1.4	Nachweis von Makrophagen, Granulozyten sowie B- und T-Lymphozyten nach intraluminaler Schädigung der A. carotis	38
3.1.5	Expression des Stammzellmarkers CD34 in der A. carotis nach Endothelschädigung	40
3.1.6	Genexpressionsanalysen geschädigter und nicht geschädigter Karotisarterien von WT- und ApoE ^{-/-} -Mäusen	41
3.1.6.1	Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren in der A. carotis	41
3.1.6.2	Expression von Osteopontin in der A. carotis der WT- und ApoE ^{-/-} -Maus	44
3.1.6.3	Expression proinflammatorischer Zytokine in der A. carotis nach Endothelschädigung	45
3.1.6.4	Expression von Socs3 und Bcl2A1a in der A. carotis nach Deendothelialisierung	47
3.1.6.5	Expression von ECM-degradierenden Enzymen im Verlauf des arteriellen Remodelings der A. carotis nach Endothelschädigung	49
3.2	Untersuchungen zur Atherosklerose der Maus	51
3.2.1	Genomweite Expressionsstudien der Aorta von WT- und ApoE ^{-/-} -Mäusen	51
3.2.2	Funktionelle Analyse der signifikant regulierten Gene	53
3.2.3	Signalwege in der atherosklerotischen Aorta der ApoE ^{-/-} -Maus	59
3.2.4	Expression von Zytokinen, Chemokinen, Chemokinrezeptoren und ECM-degradierenden Proteinasen in der Aorta von WT- und ApoE ^{-/-} -Mäusen	61

4	Diskussion	63
4.1	Die Maus als Modellsystem für arterielles Remodeling und Atherosklerose.....	64
4.2	Bedeutung des genetischen Hintergrundes für das arterielle Remodeling	66
4.3	Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Atherosklerose.....	68
4.4	Morphologische Charakterisierung der Gefäßveränderungen nach Endothelschädigung.....	69
4.5	Bedeutung immunologischer Reaktionen für arterielles Remodeling und Atherosklerose.....	72
4.6	Arteriell Remodeling, Atherosklerose und ECM-degradierende Proteinase.....	77
4.7	Schlussfolgerungen und Ausblick	82
	Zusammenfassung	83
	Summary	85
	Literaturverzeichnis	87
	Anhang	102
A.1	Abkürzungsverzeichnis	102
A.2	Geräteverzeichnis	103
A.3	Chemikalienverzeichnis	103
A.4	Verbrauchsmaterialien	104
A.5	Gebrauchsfertige Kits.....	105
A.6	Puffer und Lösungen.....	105
A.7	Antikörper	106
A.8	PCR-Primer	107
A.9	Gene, die in der Aorta von ApoE ^{-/-} - gegenüber WT-Mäusen signifikant hochreguliert waren...	108
	Danksagung	124
	Lebenslauf	125
	Publikationen	126
	Eidesstattliche Erklärung	127

1 Einleitung

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems stehen in den industrialisierten Ländern an der Spitze der Morbidität und Mortalität der Bevölkerung. So stellten nach Angaben des Statistischen Bundesamtes Krankheiten des Kreislaufsystems auch im Jahr 2005 mit 44,2 % aller Todesfälle die bei weitem häufigste Todesursache in Deutschland dar, gefolgt von bösartigen Neubildungen mit 25,5 % (Quelle: Statistisches Bundesamt Deutschland 2006; Pressemitteilung vom 15.9.2006). Den meisten kardiovaskulären Erkrankungen liegen atherosklerotische Veränderungen der Gefäße zugrunde, die dann ihrerseits Folgeerkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder periphere arterielle Verschlusskrankheit bedingen können. Es sind zahlreiche Risikofaktoren bekannt, die zur Entwicklung und Progression der Atherosklerose beitragen. Dazu gehören neben Umwelteinflüssen wie Nikotinkonsum, fettreicher Ernährung, körperlicher Inaktivität und daraus resultierendem Übergewicht auch genetische Prädispositionen wie familiäre Hyperlipidämie und Hypertonie. Das Vorhandensein primärer Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus kann die Entstehung der Krankheit begünstigen bzw. fördern. Ebenso können Alter und Geschlecht einen Einfluss auf die Entstehung und Progression der Atherosklerose haben (Lusis 2000).

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehen mit Veränderungen der Morphologie und der strukturellen Integrität der Gefäßwand einher; die im Gefäß stattfindenden Umbauprozesse werden als Remodeling bezeichnet. Arteriell Remodeling kann eine durch das Fortschreiten der Atherosklerose bedingte Verminderung des Gefäßlumens bis zu einem gewissen Grad kompensieren, dadurch aber auch zur Entstehung atherosklerose-assoziiertes Aneurysmen und zur Entstehung instabiler atherosklerotischer Plaques beitragen. Die intimale Hyperplasie nach Behandlung verengter Gefäße mittels perkutaner transluminaler (koronarer) Angioplastie wird ebenfalls durch Remodelingprozesse der Gefäßwand gefördert bzw. ausgelöst (Ward, Pasterkamp et al. 2000; Zubilewicz, Wronski et al. 2001). Atherosklerose und vaskuläres Remodeling sind sehr komplexe multifaktorielle Erkrankungen, deren pathogenetische Mechanismen bisher noch nicht endgültig aufgeklärt werden konnten. Die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die für die Entstehung und Progression der Atherosklerose verantwortlich sind und Remodelingprozesse initiieren bzw. fördern, sind deshalb gegenwärtig verstärkt Gegenstand der Forschung.

1.1 Atherosklerose

Für die Atherogenese sind verschiedene Hypothesen aufgestellt worden wie die „Oxidationshypothese“ (Steinberg and Witztum 2002), die „Immunhypothese“ (Hansson, Jonasson et al. 1989) und die „*response to injury*“-Hypothese (Ross 1999), die jedoch isoliert betrachtet keine ausreichende Erklärung für die Entstehung und das Fortschreiten atherosklerotischer Gefäßveränderungen geben.

Obwohl atherosklerotische Gefäßveränderungen beim Menschen häufig schon im Kindesalter mit Lipidablagerungen in der arteriellen Gefäßwand beginnen, vergehen bis zum Auftreten klinisch relevanter Komplikationen oft Jahrzehnte (Stary, Chandler et al. 1994; Napoli, D'Armiento et al. 1997). Die frühen, makroskopisch noch nicht identifizierbaren Stadien der Atherosklerose sind durch eine Dysfunktion des Endothels charakterisiert, die unter anderem durch die bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren verursacht werden kann. Prädilektionsstellen für funktionelle Veränderungen des Endothels sind insbesondere Gefäßbereiche, die starker mechanischer (hämodynamischer) Beanspruchung und erhöhten Scherkräften ausgesetzt sind wie der Aortenbogen oder Gefäßverzweigungen (Gimbrone 1999; Malek, Alper et al.

1999). Als Folge der endothelialen Dysfunktion kommt es zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels für Lipoproteine, insbesondere den LDL (*low density lipoproteins*), die in den subendothelialen Bereich diffundieren und dort oxidativ modifiziert werden können. Die Aktivierung von Endothelzellen durch oxidierte Phospholipide (Leitinger 2005) und eine erhöhte hämodynamische Beanspruchung führen zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche und damit zur Initiierung einer inflammatorischen Reaktion in der Gefäßwand. Selektine wie P- und E-Selektin vermitteln den Kontakt und das Anhaften inflammatorischer Zellen wie Monozyten und T-Lymphozyten aus dem Blut an das Endothel, das sogenannte *leukocyte rolling* und *leukocyte tethering*. Interzelluläre und vaskuläre Adhäsionsmoleküle wie Icam-1 (*inter-cellular adhesion molecule 1*), Vcam-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) und Integrine sind für die feste Anheftung der inflammatorischen Zellen am Endothel und unter Mitwirkung von Chemokinen wie Mcp-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*, Ccl2) für die transendotheliale Migration dieser Zellen verantwortlich (Blankenberg, Barbaux et al. 2003). Nach der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen im subendothelialen Raum und der Aufnahme von oxidiertem LDL (oxLDL) über Scavenger-Rezeptoren entstehen die für die atherosklerotische Läsion charakteristischen Schaumzellen. Die Differenzierung und Proliferation von Makrophagen werden von Zytokinen wie dem M-Csf (*macrophage colony-stimulating factor*) gesteuert. Gleichzeitig werden Strukturen des angeborenen Immunsystems aktiviert, die Toll-artigen Rezeptoren (*Toll-like receptors*, Tlrs), über die intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst werden, die in Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen (*smooth muscle cells*, SMCs) und Endothelzellen zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie zur Expression von Adhäsionsmolekülen führen (Michelsen, Doherty et al. 2004; Pasterkamp, Van Keulen et al. 2004; Vink, de Kleijn et al. 2004; Raines and Ferri 2005). Von Makrophagen und T-Zellen sezernierte Zytokine und Wachstumsfaktoren sind verantwortlich für die Proliferation der SMCs und deren Migration von der *Lamina media* in die *Lamina intima* sowie für die Produktion von extrazellulärer Matrix (*extracellular matrix*, ECM) (Lusis 2000; Daugherty, Webb et al. 2005). In der atherosklerotischen Läsion akkumulieren Makrophagen und T-Lymphozyten und es kommt zur Apoptose von Zellen; dieser Prozess führt zusammen mit weiterer Lipidaufnahme zur Ausbildung eines nekrotischen Lipidkerns (Abb. 1). Es entsteht ein stabiler atherosklerotischer Plaque, der durch eine fibröse Kappe vom zirkulierenden Blut getrennt ist, die aus SMCs und von SMCs gebildeter ECM besteht. Durch verminderte Bildung bzw. verstärkten Abbau von ECM und damit einhergehender Verdünnung der fibrösen Kappe kann der atherosklerotische Plaque instabil werden. An diesen Prozessen sind das von T-Zellen gebildete IFN γ (Interferon), das die Produktion von ECM durch SMCs inhibiert, oder von Makrophagen sezernierte Matrixmetalloproteinasen (Mmps), die ECM degradieren können, beteiligt (Gough, Gomez et al. 2005). Unter dem Einfluss von Scherkräften bzw. erhöhter mechanischer Beanspruchung kann die dünne fibröse Kappe aufreißen, wodurch es zur Freisetzung thrombogener Materialien aus dem Plaque kommt, insbesondere von Gewebefaktor (*tissue factor*) sowie von Phospholipiden und plättchen-adhäsiven Matrixmolekülen (Abb. 1). Die daraus resultierende Aktivierung des Blutgerinnungssystems führt letztlich zur Bildung nicht-okkludierender oder okkludierender Thromben mit den entsprechenden klinischen Manifestationen einer instabilen Angina pectoris oder eines Myokardinfarktes. Fissuren bzw. Rupturen atherosklerotischer Plaques finden sich gehäuft in deren Randbereich (Schulterregion), in der sich immunhistologisch eine Anreicherung inflammatorischer Zellen wie Makrophagen, T-Lymphozyten und Mastzellen nachweisen lässt (Lusis 2000).

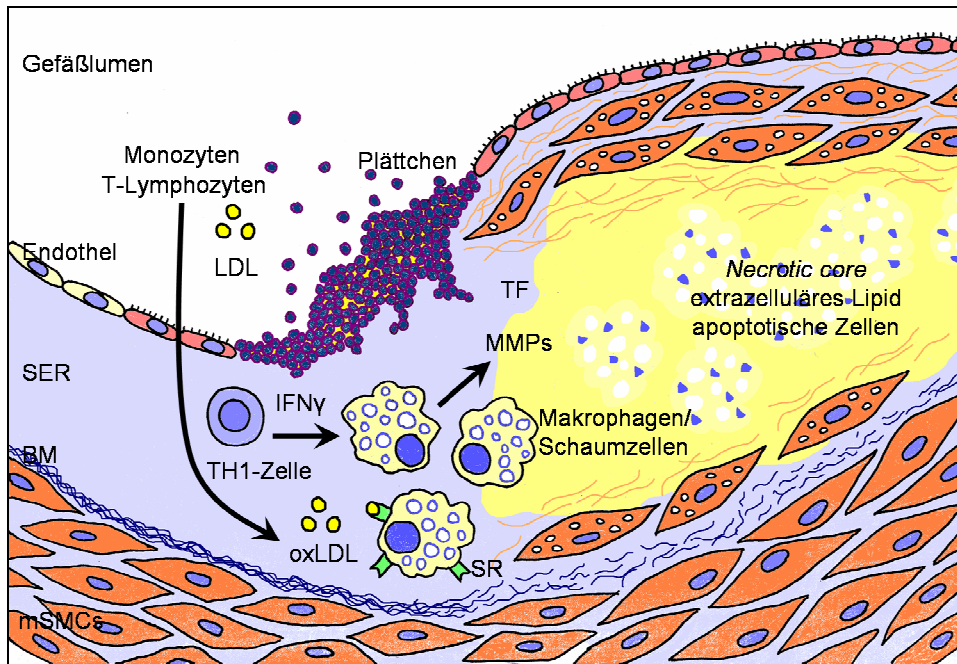


Abb. 1: Schematische Darstellung einer atherosklerotischen Läsion nach (Glass and Witztum 2001); modifiziert.

Dysfunktionales Endothel ermöglicht den Durchtritt von Lipoproteinen (LDL) sowie von Monozyten und Lymphozyten aus dem Blut in den subendothelialen Raum (SER). Dort erfolgt die Modifikation von LDL unter anderem durch oxidative Prozesse und die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen. Die modifizierten Lipoproteine (oxLDL) werden von Scavenger-Rezeptoren (SR) auf der Zelloberfläche von Makrophagen erkannt und endozytotisch in die Zelle aufgenommen, wodurch die Makrophagen zu Schaumzellen differenzieren. Mit fortschreitender Entwicklung der Läsion finden sich im Zentrum apoptotische Zellen und extrazelluläres Lipid sowie eine zunehmende Zerstörung der Basalmembran (BM), die die *Lamina media* vom SER abgrenzt. Von Immunzellen sezernierte Zytokine aktivieren glatte Muskelzellen der *Lamina media* (mSMCs) in den SER zu migrieren. Die SMCs sezernieren extrazelluläre Matrix und bilden eine fibröse Kappe, die die Läsion von der Zirkulation trennt. Immunzellen finden sich vor allem in den Randbereichen, der Schulterregion der Läsion. Durch Zytokine, vor allem IFN γ , welches vor allem von TH1-Zellen sezerniert wird, werden die Makrophagen zur Sekretion von ECM-degradierenden Proteinasen (MMPs) angeregt. Die fibröse Kappe aus SMCs und ECM wird instabil und kann bei mechanischer Belastung reißen. Das thrombogene Material aus dem Plaques (*tissue factor*, TF) kommt mit dem Blut in Kontakt und führt zur Anlagerung von Plättchen und der Auslösung der Gerinnungskaskade.

Eine entscheidende Rolle in der Atherogenese scheint dem oxidativen Stress, das heißt der Bildung freier Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS), zuzukommen. ROS werden unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich gebildet; mögliche toxische Schäden der Zellen durch ROS werden jedoch durch enzymatische und nicht-enzymatische protektive Mechanismen verhindert (Dhalla, Temsah et al. 2000; Madamanchi, Vendrov et al. 2005). Unter pathologischen Bedingungen können vermehrt ROS gebildet werden, so dass die zellulären Antioxidationsysteme nicht mehr in der Lage sind, den oxidativen Stress und damit einhergehende Schäden an Lipiden, Proteinen und DNA zu verhindern (Dhalla, Temsah et al. 2000; Madamanchi, Vendrov et al. 2005). In Versuchen an Mäusen, die Zigarettenrauch oder direktem Nikotinkonsum über die Nahrung ausgesetzt wurden, wurde gezeigt, dass Rauchen, einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung und Progression der Atherosklerose, zur vermehrten Bildung von ROS, zu einer Zunahme von proinflammatorischen Zytokinen und zu einer verstärkten Atherosklerose führte (Traber, van der Vliet et al. 2000; Johnson, Balagurunathan et al. 2003; Tani, Dimayuga et al. 2004; Lau, Li et al. 2006). Eine erhöhte Bildung und Freisetzung von ROS könnte unter anderem eine verstärkte Inaktivierung von Stickstoffmonoxid (NO) nach sich ziehen, ein Effekt, der z.B. in der Aorta von hypercholesterolämischen Apolipoprotein E-Knockout (ApoE^{-/-})-Mäusen nachgewiesen werden konnte

(d'Uscio, Baker et al. 2001). Endotheliales NO stellt durch seine vasodilatatorischen, antiinflammatorischen und antithrombotischen Eigenschaften einen der wichtigsten gefäß-protectiven Mechanismen des Endothels dar. Eine verminderte Aktivität des NO-Signalwegs könnte eine endotheliale Dysfunktion bedingen oder verstärken und somit proatherosklerotisch wirken (d'Uscio, Baker et al. 2001; Ignarro and Napoli 2004; Landmesser, Hornig et al. 2004; Huang and Vita 2006).

1.2 Arteriell Remodeling

Arteriell Remodeling wird bereits seit Beginn der 1990-iger Jahre im Zusammenhang mit Gefäßkrankungen wie Atherosklerose, Gefäßstenosen und Restenosen nach Angioplastien, transplantationsassoziiertes Vaskulopathie und Komplikationen nach Bypass-Operationen diskutiert. Mit arteriellem Remodeling wird die strukturelle und morphologische Veränderung eines arteriellen Gefäßes innerhalb der Lamina elastica externa (*external elastic lamina*, EEL) bezeichnet, dabei werden zwei Hauptformen des arteriellen Remodelings unterschieden (Abb. 2). Das positive arterielle Remodeling (auch bekannt als *outward remodeling*, *compensatory enlargement* oder *expansive remodeling*) geht mit einer Größenzunahme des Gefäßes einher, während das negative arterielle Remodeling (*inward remodeling*, *paradoxical shrinkage* oder *constrictive remodeling*) eine Reduktion der Gefäßgröße beinhaltet (Ward, Pasterkamp et al. 2000).

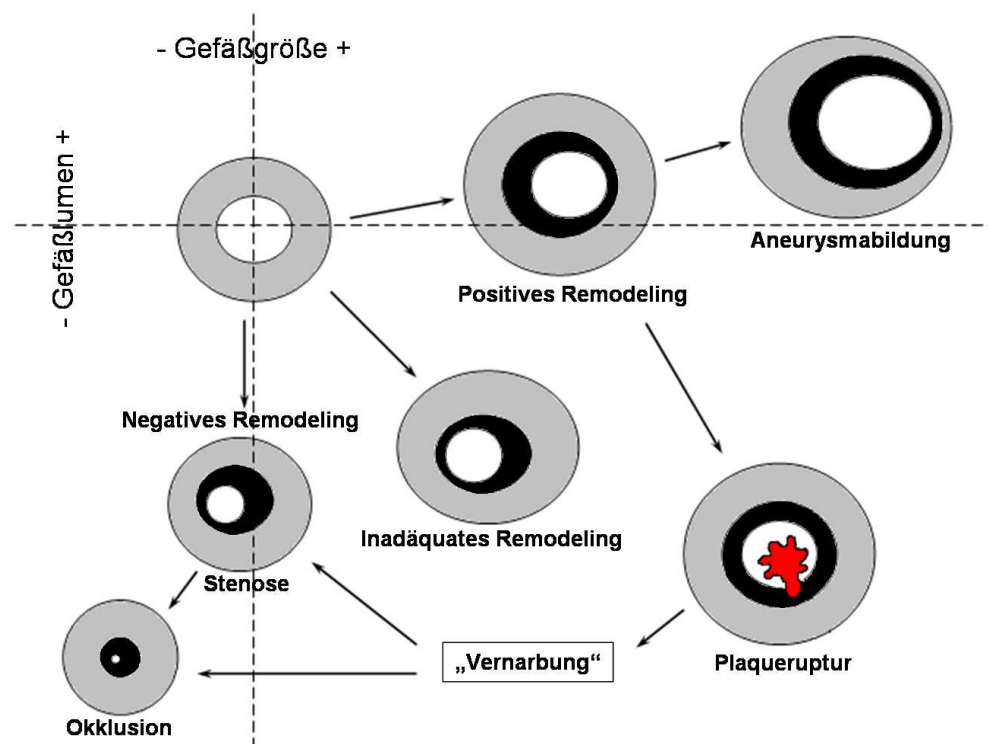


Abb. 2: Formen des arteriellen Remodelings nach (Ward, Pasterkamp et al. 2000); modifiziert.

Die Abbildung zeigt schematisch mögliche Formen des arteriellen Remodelings an einem atherosklerotischen Gefäß. Dabei werden zwei Hauptformen unterschieden: Beim positiven Remodeling (siehe 1.2.1) nimmt der Gefäßquerschnitt zu, da als Folge des Plaquewachstums die eintretende Gefäßstenose durch die Vergrößerung des Gefäßes kompensiert wird. Durch diesen Remodeling-Typ können durch die auf die Arterienwand einwirkenden Scherkräfte Plaquerupturen oder Aneurysmen entstehen. Beim negativen Remodeling (siehe 1.2.2) wird dagegen das Gefäßlumen reduziert, was zur Minderdurchblutung von Organen und dadurch z.B. zum Auftreten einer Angina pectoris führen kann.

1.2.1 Positives arterielles Remodeling

Positives Remodeling bezeichnet die Größenzunahme eines Gefäßes bzw. des Gefäßquerschnitts durch Vasodilatation, aber auch die Anpassung an ein vermindertes Gefäßlumen in Folge pathologischer Prozesse wie Intimaproliferation und die Bildung atherosklerotischer Plaques (Pasterkamp, Galis et al. 2004). Dieser Prozess kann im Extremfall zur Entstehung von Aneurysmen beitragen, da die *Lamina media* in ihrer Dicke abnimmt und an Festigkeit verliert. Mit Zunahme der Plaquegröße und -dicke wurde in der Arteria carotis (A. carotis), der thorakalen Aorta und der abdominalen Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen ein kompensatorisches, positives arterielles Remodeling beobachtet, das verbunden war mit einer Abnahme der Mediadicke und einer Zerstörung der elastischen Fasern der Media im Bereich der atherosklerotischen Läsionen (Lutgens, de Muinck et al. 2001). Auch in atherosklerotischen Gefäßbereichen des Aortenbogens von ApoE^{-/-}-Mäusen wurde ein positives arterielles Remodeling beobachtet (Bentzon, Pasterkamp et al. 2003). Die Gefäßveränderungen in der Aorta waren vom Grad der Atherosklerose abhängig. Ein arterielles Remodeling war in geringem Maß bei 32 Wochen alten Mäusen mit nachweisbaren atherosklerotischen Gefäßveränderungen zu beobachten. Bei einjährigen Tieren, die eine deutliche Atherosklerose der Aorta aufwiesen, war das Remodeling bereits stark ausgeprägt (Moos, John et al. 2005). Choudhury et al. wiesen *in vivo* mittels MRM (*magnetic resonance microscopy*) die individuelle Progression der Atherosklerose in der Aorta von Wildtyp (WT)- und ApoE^{-/-}-Mäusen nach. Die Tiere wurden mit einer atherogenen Diät gefüttert und in regelmäßigen Abständen untersucht. Im Alter von 20 Wochen entstanden in der Abdominalaorta der ApoE^{-/-}-Tiere Plaques im Bereich der arteriellen Gefäßabgänge. Die Progression der Plaques war assoziiert mit einem positiven arteriellen Remodeling ohne Vergrößerung des Gefäßlumens; einem kompensatorischen arteriellen Remodeling (Choudhury, Fayad et al. 2003). Inflammatorische Zellen sind in der Lage, ECM-degradierende Enzyme freizusetzen, wodurch das Remodeling begünstigt bzw. beschleunigt werden kann. Die Aorta von alten ApoE^{-/-}-Mäusen (> 1 Jahr) wies ein extremes positives Remodeling und eine starke Infiltration mit Lymphozyten und Makrophagen auf (Choudhury, Fayad et al. 2003; Moos, John et al. 2005). In der Aorta von alten ApoE^{-/-}-Mäusen konnte die spontane Bildung von Aneurysmen mittels Magnetresonanztomographie nachgewiesen werden (McFadden, Chaabane et al. 2004). Wenn das positive arterielle Remodeling nicht ausreicht, eine bestehende Gefäßstenose zu kompensieren, wird dies als inadäquates positives Remodeling bezeichnet. Inadäquates Remodeling tritt beispielsweise bei fortgeschrittener Atherosklerose mit zirkulären Plaques auf. So wies die A. carotis von alten ApoE^{-/-}-Mäusen trotz eines deutlichen positiven Remodelings eine Stenose von bis zu 70 % auf (Seo, Lombardi et al. 1997; Lutgens, de Muinck et al. 2001).

1.2.2 Negatives arterielles Remodeling

Das negative arterielle Remodeling beschreibt die Reduktion des Gefäßlumens bzw. Gefäßquerschnitts, was bei pathologischen Prozessen bis zum vollständigen Gefäßverschluss führen kann. Als wichtige Pathomechanismen sind hier Intimahypertrophie, Mediahypertrophie oder Thrombusbildung nach Plaqueruptur sowie eine andauernde Vasokonstriktion (z.B. nach Plaqueruptur) zu nennen (Ward, Pasterkamp et al. 2000; Zubilewicz, Wronski et al. 2001). Negatives Remodeling trägt entscheidend zur Lumenverengung bei fortgeschrittenen Gefäßerkrankungen wie z.B. der Transplantatvaskulopathie oder der Restenose nach Angioplastie bei. Die Restenose ist eine der häufigsten Komplikationen nach Eingriffen wie transluminalen Angioplastien, Atherektomien, Bypass-Operationen oder Stentimplantationen. Sie tritt bei

30 bis 50 % aller Patienten auf und schränkt den Langzeiterfolg dieser Behandlungsmethoden erheblich ein. Neben sofortigen thrombotischen Verschlüssen und der Progression der Atherosklerose ist die Entwicklung einer Restenose innerhalb der ersten sechs Folgemonate nach dem Eingriff ein limitierender Faktor für die erfolgreiche Behandlung von Gefäßstenosen. Die intimale Hyperplasie oder Neointimbildung, die als wichtigste Ursache der Restenose gilt, wird initiiert durch die Verletzung der Gefäßwand während des Eingriffs und die dadurch verursachte Freisetzung zellulärer Mediatoren und Wachstumsfaktoren, die eine Migration glatter Muskelzellen von der *Lamina media* in die *Lamina intima* bewirken und ihre Proliferation fördern. Während dieses Vorganges dedifferenzieren die glatten Muskelzellen vom kontraktilen zum synthetisierenden (sekretorischen) Phänotyp, was mit dem Verlust von Markermolekülen der SMCs wie z.B. α -Aktin verbunden ist (Thyberg, Blomgren et al. 1997). Hierbei kommt es unter anderem zur Expression verschiedener zellulärer Rezeptoren sowie von Adhäsionsmolekülen wie Vcam-1 und Icam-1, die bei einer Schädigung der Gefäßwand für die Interaktion von glatten Muskelzellen mit inflammatorischen Zellen und Immunzellen von Bedeutung sind (Moiseeva 2001).

Die in der Neointima vorhandenen SMCs haben ihren Ursprung nicht ausschließlich in der Media des Gefäßes. Sowohl im murinen als auch im humanen System konnten hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark nachgewiesen werden, die nach Verletzung der Gefäßwand im geschädigten Bereich adhären und dort phänotypisch zu glatten Muskelzellen und Endothelzellen differenzieren (Sata, Saiura et al. 2002; Simper, Stalboerger et al. 2002). Humane hämatopoetische mononukleäre Zellen differenzierten *in vitro* nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren zu SMCs (Simper, Stalboerger et al. 2002). Im tierexperimentellen Modell ist die Beteiligung von Progenitorzellen an Heilungsprozessen der Gefäßwand von der Art der Schädigung abhängig. So wurden nach einer intraluminalen Endothelschädigung der A. carotis der Maus deutlich mehr Vorläuferzellen in der Neointima und der *Lamina media* nachgewiesen als nach äußerer Manipulation des Gefäßes durch Ligation oder das Anbringen einer Gefäßmanschette (Han, Campbell et al. 2001; Tanaka, Sata et al. 2003).

1.3 Bedeutung innater und adaptiver Immunreaktionen für Atherosklerose und arterielles Remodeling

In der Atherogenese spielen sowohl Zellen der angeborenen (innaten) als auch der erworbenen (adaptiven) Immunität eine Rolle (Hansson, Libby et al. 2002; Hansson and Libby 2006). Zu den zellulären Mediatoren der angeborenen Immunität zählen Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen, neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und primordiale B-Zellen (B1-Zellen) (Vanderlaan and Reardon 2005; Bobryshev 2006; Whitman and Ramsamy 2006). Die Zellen der innate Immunität verfügen über ein begrenztes Repertoire von Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die konservierte molekulare Muster von Pathogenen, wie z.B. bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder bakterielle DNA, aber auch endogene Liganden, wie z.B. modifizierte Lipoproteine, erkennen können. Die Rezeptoren des innate Immunsystems werden in drei Kategorien unterteilt: i) membranständige Signalrezeptoren, die zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege führen (z.B. Tlrs); ii) membranständige endozytotische Rezeptoren, die für die Aufnahme des Pathogens in die Zelle verantwortlich sind (z.B. Scavenger-Rezeptoren); iii) sezernierte Rezeptoren, zu denen von B1- und B-Zellen der Marginalzone gebildete und freigesetzte Immunglobuline (Ig) wie IgM und IgA (so genannte natürliche Antikörper) gezählt werden (Miller, Chang et al. 2003; Hoebe, Janssen et al. 2004; Iwasaki and Medzhitov 2004; Benaglio, D'Elios et al. 2005; Kobayashi, Lopez et al. 2005). Die Bedeutung dieser Rezeptoren für die Atherosklerose lässt sich z.B. an

Makrophagen demonstrieren, die ein defektes Gen für bestimmte Subtypen der Scavenger-Rezeptoren (MSR-A und CD36) aufweisen. Diese Makrophagen zeigten *in vitro* eine verminderte Aufnahme von modifiziertem LDL, *in vivo* war sowohl in ApoE^{-/-}/MSR-A^{-/-} (Suzuki, Kurihara et al. 1997) als auch in ApoE^{-/-}/CD36^{-/-}-Doppelknockout-Mäusen (Febbraio, Podrez et al. 2000) die Plaquegröße gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren stark vermindert. Andererseits hat der Scavenger-Rezeptor-Subtyp SR-BI mögliche atheroprotektive Eigenschaften, da die atherosklerotischen Läsionen in ApoE^{-/-}/SR-BI^{-/-}-Doppelknockout-Mäusen stärker ausgeprägt waren als in ApoE^{-/-}-Kontrolltieren mit funktionierendem SR-BI-Rezeptor (Zhang, Yancey et al. 2003). IgM-Antikörper gegen oxLDL konnten im Human- und Kaninchenplasma sowie in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden; es ist jedoch noch unklar, ob die Immunreaktion mit einer pro- oder antiatherogenen Wirkung einhergeht (Hulthe 2004; Kobayashi, Lopez et al. 2005). Tlrs scheinen sowohl in die Atherogenese als auch in Remodelingprozesse involviert zu sein, da die *in vivo*-Aktivierung des Tlr2 mit Hilfe eines synthetischen Liganden zu einer verstärkten Neointimabildung in der Femoralarterie nach Anbringen einer Gefäßmanschette führte; die Aktivierung des Tlr2 verstärkte außerdem die Plaquebildung in ApoE^{-/-}-Mäusen (Schoneveld, Oude Nijhuis et al. 2005). Die experimentelle Endothelschädigung in der Femoralarterie durch eine Gefäßmanschette induzierte in Gefäßen von WT-Mäusen ein positives arterielles Remodeling; in der Femoralarterie von Tlr4^{-/-}-Knockout-Mäusen konnte kein derartiges Remodeling beobachtet werden (Hollestelle, De Vries et al. 2004).

Adaptive Immunreaktionen werden durch antigenspezifische T- und B-Lymphozyten, Plasmazellen und NK-Zellen vermittelt. Die Aktivierung erfolgt durch die Interaktion mit antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen sowie durch proinflammatorische Zytokine, die von aktivierten Immunzellen und Endothelzellen sezerniert werden. Innate Immunzellen, die auf ihrer Zelloberfläche Antigene über MHC II (*major histocompatibility complex class II*) präsentieren, stellen die Verbindung zur adaptiven Immunität her. Die meisten T-Zellen in den atherosklerotischen Läsionen sind CD4-positive Zellen; sie gehören größtenteils zum TH1-Subtyp (*T-helper cells*, TH) und sezernieren Zytokine wie IFN γ , Interleukin (IL)-2 sowie TNF (*tumor necrosis factor*) α und β (Lord and Bobryshev 2002). Diese Zytokine aktivieren Makrophagen und vaskuläre Zellen, fördern inflammatorische Reaktionen und sind an der zellulären Immunität beteiligt. Andererseits produzieren Zellen der atherosklerotischen Läsion die TH1-stimulatorischen Zytokine IL-12 und IL-18. TH2-stimulatorische Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-10 sind im Plaque nur in geringer Menge vorhanden (Hansson, Libby et al. 2002). In atherosklerotischen Gefäßen wurden T- und B-Lymphozyten nicht nur in atherosklerotischen Plaques (Zhou and Hansson 1999) sondern auch in der *Lamina adventitia* der Maus (Moos, John et al. 2005) und des Menschen (Bobryshev and Watanabe 1997; Houtkamp, de Boer et al. 2001) nachgewiesen.

Zytokine können sowohl proatherogene als auch antiatherogene Wirkungen haben, wobei TH1-assoziierten Zytokinen wie IFN γ im allgemeinen eine proatherogene Rolle und TH2-assoziierten Zytokinen wie IL-10 eine atheroprotektive Funktion zugeschrieben wird (Young, Libby et al. 2002; Tedgui and Mallat 2006). Untersuchungen an ApoE^{-/-}-Mäusen mit unterschiedlich ausgeprägter Hypercholesterolämie zeigten bei schwerer Hypercholesterolämie eine Zunahme von TH2- und Abnahme von TH1-abhängigen Antikörpern und Zytokinen und somit eine Umschaltung von einer TH1- zu einer TH2-Immunantwort (Zhou, Paulsson et al. 1998; Robertson, Zhou et al. 2004). Eine Hemmung der TH1-Antwort (Mallat, Gojova et al. 2003) bzw. der Differenzierung zu TH1-Zellen (Laurat, Poirier et al. 2001) resultierte in einer Verminderung der Atherosklerose.

IFN γ , das hauptsächlich von aktivierten NK-Zellen und aktivierten T-Lymphozyten, aber auch von Makrophagen, natürlichen Killer T-Zellen und dendritischen Zellen sezerniert wird, beeinflusst nahezu alle wichtigen, an der Plaquentstehung beteiligten Zellen und übt somit einen sehr komplexen Einfluss auf die Entwicklung der Atherosklerose aus (Harvey and Ramji 2005). Hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang vor allem die Stimulation der Antigenpräsentation durch die Expression von MHC I- und MHC II-Molekülen auf der Oberfläche von Makrophagen und T-Zellen, die Stimulation der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine sowie die Rekrutierung von Zellen durch Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen. Die durch IFN γ in Endothelzellen und SMCs induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen wie Vcam-1 und Icam-1 und die daraus resultierende Migration von Immunzellen in den subendothelialen Raum zählt zu den frühesten Ereignissen bei der Ausbildung früher Atherosklerosestadien (*fatty streaks*) in den Gefäßen. Untersuchungen an verschiedenen Mausmodellen deuten auf eine vorwiegend proatherogene Rolle von IFN γ für die Entstehung atherosklerotischer Gefäßveränderungen. So waren in ApoE $^{-/-}$ /IFN $\gamma^{-/-}$ -Doppelknockout-Mäusen die Atherosklerose und die damit verbundene Inflammation und Lipidakkumulation dramatisch reduziert, während der Kollagengehalt im Plaque verstärkt war; der Plaque wies einen stabilen Phänotyp auf (Gupta, Pablo et al. 1997). Die Injektion von rekombinantem IFN γ führte bei ApoE $^{-/-}$ -Mäusen trotz einer Reduktion der Cholesterolverwerte im Serum zu einer Zunahme der Plaqueläche und zur vermehrten Infiltration der atherosklerotischen Läsionen mit T-Lymphozyten und MHC II-positiven Zellen (Whitman, Ravisankar et al. 2000), was auf einen instabilen Plaque-Phänotyp deutet. Die Bedeutung von IFN γ für das arterielle Remodeling nach einer Gefäßwandschädigung wurde an Mäusen demonstriert, die keinen IFN γ -Rezeptor besitzen; die Neointimabildung war in diesen Tieren vermindert (Zohnhofer, Richter et al. 2001).

Bei den Chemokinen ist das als proatherogener Faktor anzusehende Mcp-1, das chemotaktisch auf Monozyten und T-Zellen wirkt und dessen Expression durch IFN γ dramatisch erhöht wird, hervorzuheben. Mcp-1, dessen Bildung durch inflammatorische Zytokine in verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, SMCs oder Monozyten/Makrophagen induziert werden kann, war das erste Chemokin, das in frühen atherosklerotischen Läsionen des Menschen im Endothel und bei fortgeschrittenen Läsionen in SMCs und Makrophagen nachgewiesen wurde (Takeya, Yoshimura et al. 1993). Die Bedeutung von Mcp-1 und seinem Rezeptor Ccr2 für die Atherogenese wurde unter anderem in Untersuchungen mit LDL-Rezeptor (LDL-R) $^{-/-}$ /Mcp-1 $^{-/-}$ (Gu, Okada et al. 1998) und ApoE $^{-/-}$ /Ccr2 $^{-/-}$ -Doppelknockout-Mäusen (Dawson, Kuziel et al. 1999) demonstriert; bei diesen Tieren war die Ausprägung der atherosklerotischen Läsionen im Vergleich zu den LDL-R $^{-/-}$ /Mcp-1 $^{+/+}$ - bzw. ApoE $^{-/-}$ /Ccr2 $^{+/+}$ -Kontrollen deutlich geringer (Peters and Charo 2001). Es wurde auch gezeigt, dass eine Knochenmarktransplantation von transgenen Mcp-1-überexprimierenden Mäusen auf ApoE $^{-/-}$ -Mäuse die Entstehung der Atherosklerose beschleunigte (Aiello, Bourassa et al. 1999). Eine Blockade des Rezeptors Ccr2 und die daraus resultierende Inhibierung des Signalwegs bewirkte bei ApoE $^{-/-}$ -Mäusen mit bereits vorhandenen atherosklerotischen Läsionen sowohl ein langsames Fortschreiten der Atherosklerose als auch eine Entwicklung des Plaques in Richtung eines stabilen Phänotyps mit einem höheren Gehalt an Muskelzellen und einer Reduktion der enthaltenen Lipide; dieser Effekt wurde auf eine Reduktion ECM-degradierender Enzyme und die verminderte Expression inflammatorischer Zytokine zurückgeführt (Reckless, Rubin et al. 1999; Inoue, Egashira et al. 2002; Lutgens, Faber et al. 2005). Eine Bedeutung von Mcp-1 und Ccr2 für die Entwicklung einer Restenose zeigte sich bei experimentellen Untersuchungen zur intimalen Hyperplasie nach periarterieller

Gefäßschädigung an Mäusen und Affen (Egashira, Zhao et al. 2002), nach Ballondilatation an Kaninchen (Mori, Komori et al. 2002) sowie nach intraluminaler Gefäßschädigung an der Maus (Schober, Zerneck et al. 2004); die durch eine intraluminale Gefäßwandschädigung induzierte intimale Hyperplasie in der Femoralarterie war bei Ccr2-Knockout-Mäusen reduziert (Roque, Kim et al. 2002).

Weitere für die Atherogenese bedeutsame Chemokine sind Mip (*macrophage inflammatory protein*) -1 α und -1 β (Ccl3, Ccl4) sowie Cxcl16 (Harvey and Ramji 2005). Mip-1 α und -1 β werden von den meisten reifen hämatopoetischen Zellen exprimiert; dazu gehören insbesondere verschiedene in die Immunantwort involvierte Zellen wie Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen und NK-Zellen, aber auch Fibroblasten, Osteoblasten, Epithelzellen und vaskuläre SMCs. Die Expression von Mip-1 α ist im Ruhezustand gering, nach entsprechender Stimulation, z.B. mit IFN γ , TNF α oder LPS, wurde eine signifikante Zunahme beobachtet (Menten, Wuyts et al. 2002; Maurer and von Stebut 2004). Die biologische Wirkung von Mip-1 α wird über die Reaktion mit spezifischen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermittelt. Mip-1 α ist ein bedeutendes TH1-assoziiertes Chemokin, das über seinen Rezeptor Ccr5 unter anderem die transendotheliale Migration von Monozyten/Makrophagen, dendritischen und NK-Zellen in verletztes Gewebe steuert. Mip-1 α spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen und im Zusammenhang mit Autoimmunreaktionen. Eine Expression von Mip-1 α konnte auch in atherosklerotischen Aorten von ApoE^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden; diese Expression war abhängig vom Alter und der damit verbundenen stärkeren Ausprägung der Atherosklerose (Moos, John et al. 2005).

Durch die Stimulation der Expression des erst seit kurzem bekannten Chemokins Cxcl16 trägt IFN γ zur Bildung von Schaumzellen in humanen atherosklerotischen Läsionen bei. Cxcl16 ist ein transmembranes Molekül, das auch in löslicher Form vorkommt und die Migration aktivierter CD8-positiver-T-Zellen über den Cxcr6-Rezeptor beeinflusst. Cxcl16 ist strukturell identisch zu einem Scavenger-Rezeptor-Subtyp (SR-PSOX), wird in Endothelzellen, SMCs, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und vermittelt unter anderem die Aufnahme von oxLDL in die Zelle. Die Expression von Cxcl16/SR-PSOX und dem zugehörigen Rezeptor Cxcr6 konnte in humanen und murinen atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden. Eine Stimulation mit IFN γ führte sowohl *in vivo* in der Maus als auch *in vitro* in humanen Monozyten/Makrophagen-Zelllinien zu einem Anstieg der Expression von Cxcl16/SR-PSOX und zu einer erhöhten Aufnahme von oxLDL (Wuttge, Zhou et al. 2004). Untersuchungen an LDL-R^{-/-}/Cxcl16^{-/-}-Doppelknockout-Mäusen postulieren eine atheroprotektive Wirkung von Cxcl16, da bei diesen Tieren eine verstärkte und beschleunigte Bildung atherosklerotischer Läsionen im Vergleich zu den LDL-R^{-/-}/Cxcl16^{+/+}-Kontrolltieren beobachtet wurde (Aslanian and Charo 2006).

Eine atheroprotektive Wirkung wird dem TH2-Zytokin IL-10 zugeschrieben. IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, das von T-Zellen und Makrophagen synthetisiert wird und zelluläre Prozesse moduliert, die mit der Entwicklung und der Stabilität atherosklerotischer Plaques interferieren. So entwickelten IL-10^{-/-}-Knockout-Mäuse bei Fütterung einer atherogenen Diät einen signifikanten Anstieg der Lipidakkumulation im Vergleich zu WT-Tieren; atherosklerotische Läsionen von IL-10^{-/-}-Knockout-Mäusen zeigten eine erhöhte T-Zell-Infiltration, eine starke Expression von IFN γ und eine Reduktion des Kollagengehalts (Mallat, Besnard et al. 1999). ApoE^{-/-}/IL-10^{-/-}-Doppelknockout-Mäuse wiesen eine verstärkte Atherosklerose sowie erhöhte LDL- und erniedrigte VLDL (*very low density lipoproteins*)-Plasmaspiegel auf. Außerdem führte die IL-10-Defizienz zu einer verstärkten Aktivität von TH1-Zellen, Mmps und Faktoren

der Blutgerinnung (Caligiuri, Rudling et al. 2003). Eine Knochenmarkstransplantation von IL-10^{-/-}-Knockout-Mäusen in LDL-R^{-/-}-Mäuse führte zu einer Zunahme der Plaques und zur Akkumulation von Lymphozyten und Makrophagen sowie zur Reduktion des Kollagengehalts in den atherosklerotischen Läsionen (Potteaux, Esposito et al. 2004). Dagegen wurde in LDL-R^{-/-}-Mäusen, denen Knochenmark von transgenen, IL-10-überexprimierenden Mäusen transplantiert wurde eine Größenabnahme der Plaques sowie eine Änderung der Plaquezusammensetzung, insbesondere eine Reduktion des Cholesterolgehalts, beobachtet. Die T-Lymphozyten dieser transgenen Mäuse zeigten eine deutliche Verschiebung zum TH2-Phänotyp mit einer verminderten IFN γ -Produktion (Pinderski, Fischbein et al. 2002). Nicht nur für die Atherogenese sondern auch für das arterielle Remodeling nach einer Gefäßschädigung wurde eine Bedeutung von IL-10 nachgewiesen. Die Gabe von IL-10 reduzierte die Neointimabildung nach intraluminaler Schädigung der A. carotis im Vergleich zu Kontrollmäusen, denen kein zusätzliches IL-10 verabreicht wurde; in IL-10^{-/-}-Knockout-Mäusen war die Neointimabildung nach intraluminaler Schädigung der A. carotis verstärkt (Zimmerman, Reznikov et al. 2004). Auch in hypercholesterolämischen IL-10^{-/-}-Knockout-Mäusen war nach Schädigung der A. femoralis mittels einer Gefäßmanschette die Neointimabildung verstärkt, während in hypercholesterolämischen IL-10-überexprimierenden Mäusen die Neointimabildung reduziert war im Vergleich zu den entsprechenden hypercholesterolämischen Kontrollen (Eefting, Schepers et al. 2006).

Während den Zytokinen IL-1, IL-6 und IFN γ eine vorwiegend proatherogene und dem IL-10 eine antiatherogene Wirkung zugeschrieben wird, ist die Bedeutung von TGF β (*transforming growth factor*) für die Atherogenese noch nicht endgültig geklärt. TGF β wird von einer Vielzahl von Zellen einschließlich Endothelzellen, SMCs, Plättchen, T-Zellen und Fibroblasten exprimiert und ist an der Regulation zahlreicher Prozesse wie Zellproliferation und -differenzierung, Adhäsion und Apoptose, Produktion von ECM und Modulation des Immunsystems beteiligt (Singh and Ramji 2006). TGF β und seine Rezeptoren, die in großer Menge in atherosklerotischen Plaques exprimiert werden (Bobik, Agrotis et al. 1999), beeinflussen die Eigenschaften und Funktionen aller im Plaque vorhandenen Zellen. Für eine proatherogene Wirkung von TGF β spricht die Rekrutierung und Förderung der Differenzierung von Monozyten (Wahl, Hunt et al. 1987); andererseits war die Konzentration von TGF β im Serum bei fortgeschrittener Atherosklerose reduziert (Grainger, Kemp et al. 1995; Grainger, Mosedale et al. 2000). Eine Inhibierung des TGF β -Signalwegs in T-Zellen (Gojova, Brun et al. 2003; Robertson, Rudling et al. 2003), durch neutralisierende Antikörper (Mallat, Gojova et al. 2001) oder durch die Injektion eines löslichen TGF β -Rezeptors (Lutgens, Gijbels et al. 2002) gehen mit einer Beschleunigung der Atherosklerose einher und führen zu einem instabilen Plaque-Phänotyp, was auf eine antiatherogene Wirkung von TGF β hinweist. TGF β fördert einen stabilen Plaque-Phänotyp durch Stimulation der Kollagenbiosynthese und Hemmung der T-Zell-Aktivierung (Cipollone, Fazio et al. 2004). Andererseits ist eine erhöhte TGF β -Expression hauptsächlich verantwortlich für die zur Restenose führende exzessive fibrozelluläre Proliferation der Intima (negatives arterielles Remodeling) nach Angioplastie, Stentimplantation oder Atherektomie (Majesky, Lindner et al. 1991; Nabel, Shum et al. 1993; Kanzaki, Tamura et al. 1995; Yamamoto, Morishita et al. 2000; Lindner 2001; Ryan, Kotliansky et al. 2003).

1.4 Die Rolle ECM-degradierender Enzyme bei Atherosklerose und arteriellem Remodeling

Extrazelluläre Matrix besteht vorwiegend aus verschiedenen Proteinen wie Kollagen, Fibrillin und Elastin und aus Kohlenhydraten, den Glykosaminoglykanen, die mit Proteinen zu Proteoglykanen assoziieren. Die Zusammensetzung der ECM variiert je nach Gewebe und den damit verbundenen Aufgaben. Neben der Erhaltung der strukturellen Integrität des jeweiligen Gewebes hat die ECM zahlreiche andere Funktionen, die insbesondere aus der Wechselwirkung mit den sie umgebenden Zellen resultieren. So sind an die ECM inaktive Formen von extrazellulären Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteinasen gebunden, die durch Freisetzung zellulärer Enzyme in ihre aktive Form umgewandelt oder durch zelluläre Mediatoren aktiviert werden können. Sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen erfolgt ein Ab- und Umbau von ECM mittels spezifischer Enzyme zu denen Mmps Serin- und Cysteineproteinasen gehören, die von einer Vielzahl von Zellen einschließlich Immunzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, SMCs und Makrophagen/Schaumzellen exprimiert oder sezerniert werden (Raines 2000; Smeglin and Frishman 2004; Watanabe and Ikeda 2004). ECM-degradierende Proteinase sind an der Entstehung und Progression der Atherosklerose sowie an vaskulären Remodelingprozessen wie der Restenose beteiligt; die Expression von ECM-degradierenden Proteinase wurde in instabilen atherosklerotischen Plaques und nach Endothelschädigung nachgewiesen (Galis and Khatri 2002; Liu, Sukhova et al. 2004; Garcia-Touchard, Henry et al. 2005; Dollery and Libby 2006).

Mmps stellen eine Familie von zinkhaltigen Endopeptidasen dar, die als Proenzyme vorliegen und nach ihrer Aktivierung mittels proteolytischer Spaltung verschiedene Komponenten der ECM wie Kollagene, Elastin, Glykosaminoglykane und Proteoglykane spalten können. Neben ihrer Rolle in physiologischen Remodelingprozessen, wie z.B. während der Embryonalentwicklung, bei der Knochenresorption und der Angiogenese, sind Mmps auch an pathologischen Remodelingprozessen beteiligt (Kuzuya and Iguchi 2003; Newby 2005; Dollery and Libby 2006; Page-McCaw, Ewald et al. 2007). Die Aktivität der Mmps kann durch spezifische Bindung von Proteinen an deren katalytische Zentren gehemmt werden. Diese Inhibitoren (*tissue inhibitor of metalloproteinases*, Timps) modulieren den Ab- und Umbau des Gewebes durch Mmps. Während unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen Mmps und Timps besteht und als Folge davon eine enzymatische Aktivität von Mmps kaum nachweisbar ist, kann es bei pathologischen Prozessen zu einer Störung dieses Gleichgewichts mit einer erhöhten Mmp-Aktivität kommen (Sluijter, de Kleijn et al. 2006). So war in humanen atherosklerotischen Arterien (Galis, Sukhova et al. 1994) sowie in experimentellen Atherosklerose- und Restenosemodellen eine erhöhte Expression und Aktivität von Mmps nachweisbar (Galis, Sukhova et al. 1995; Zaltsman and Newby 1997; Jeng, Chou et al. 1999; Jormsjo, Wuttge et al. 2002; Cheng, Kuzuya et al. 2004; Orni, Sneck et al. 2004; Yasuda, Li et al. 2004). Durch pathologische Prozesse wie mechanische Schädigung oder durch Scherkräfte und oxidativen Stress kann die Expression, Bildung und Aktivierung von Mmps stimuliert werden (Sluijter, de Kleijn et al. 2006). Eine Überexpression von Mmps und eine damit verbundene Degradation von ECM findet vor allem in den Schulterbereichen von humanen atherosklerotischen Plaques statt sowie in den Bereichen einer Läsion, in denen inflammatorische Zellen, vor allem Makrophagen, akkumulieren (Galis, Sukhova et al. 1994; Loftus, Naylor et al. 2002). Die Bedeutung von Mmps für das kompensatorische arterielle Remodeling in atherosklerotischen Gefäßen wurde an ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}/Mmp-9^{-/-}-Doppelknockout-Mäusen demonstriert. Durch Ligation der A. carotis in Kombination mit Fütterung einer

atherogenen Diät wurden atherosklerotische Läsionen mit nachfolgendem arteriellen Remodeling induziert. Dieses kompensatorische Remodeling war in den Doppelknockout-Mäusen deutlich reduziert, was auf die Bedeutung von Mmps für Remodelingprozesse hinweist (Lessner, Martinson et al. 2004). Wurden ApoE^{-/-}-Mäuse mit Timp-1^{-/-}-Knockout-Mäusen gekreuzt, so wurde die in den ApoE^{-/-}-Tieren vorhandene Degradation der Media und die dadurch bedingte Aneurysmabildung verstärkt, was die pathophysiologische Bedeutung von Mmps und Timps für Rupturen der Media und die Bildung von Aneurysmen unterstreicht (Lemaitre, Soloway et al. 2003).

Neben den Mmps sind auch die zu den Cysteinproteinasen gehörenden Cathepsine an atherosklerotischen und nicht-atherosklerotischen Remodelingprozessen beteiligt. Neben ihrer Funktion als ECM-degradierende Enzyme sind Cathepsine auch in den Lipidmetabolismus involviert; sie sind in der Lage LDL zu degradieren und die Bildung von Schaumzellen zu fördern und tragen so zur Progression der Atherosklerose bei (Lutgens, Cleutjens et al. 2007). In atherosklerotischen Plaques von ApoE^{-/-}-Mäusen wurde die Expression der Cathepsine B, D, L und S nachgewiesen; die Expression korrelierte mit dem Vorhandensein von Makrophagen im Plaque (Jormsjo, Wuttge et al. 2002). ApoE^{-/-}/Cathepsin S^{-/-}-Doppelknockout-Mäuse entwickelten unter einer atherogenen Diät deutlich weniger Plaquerupturen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Tieren; die atherosklerotischen Läsionen wurden durch Cathepsin S destabilisiert (Rodgers, Watkins et al. 2006). In LDL-R^{-/-}/Cathepsin S-Doppelknockout-Mäusen wurde eine verminderte Atherosklerose im Vergleich zu LDL-R^{-/-}-Mäusen beobachtet, die atherosklerotischen Läsionen der Doppelknockout-Mäuse zeigten außerdem eine geringere Akkumulation von T-Lymphozyten, Makrophagen und extrazellulären Lipiden sowie von SMCs und Kollagen. Darüber hinaus zeigten die Monozyten der LDL-R^{-/-}/Cathepsin S-Doppelknockout-Mäuse eine verminderte Migration durch die subendotheliale Basalmembran (Sukhova, Zhang et al. 2003). Die Cysteinproteinasen Cathepsin S und K wurden auch in humanen atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen (Sukhova, Shi et al. 1998); nach Ballondilatation der A. carotis in der Ratte wurde eine erhöhte Expression der Cathepsine S und K in der Neointima beobachtet (Cheng, Kuzuya et al. 2004).

Neben ECM-degradierenden Enzymen spielen auch ECM-gebundene Proteine wie das Osteopontin eine Rolle in der Atherogenese, dem arteriellen Remodeling und der Restenose. Osteopontin ist ein lösliches Phosphoprotein (phosphoryliertes Glykoprotein), das wie andere ECM- sowie Serumproteine die charakteristische Tripeptid-Sequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure aufweist. Osteopontin kann als immobilisiertes Molekül an ECM gebunden vorliegen oder als lösliches Zytokin in Körperflüssigkeiten vorkommen. Über die Reaktion mit verschiedenen Rezeptoren aktiviert Osteopontin direkt oder indirekt zelluläre Signalwege und vermittelt Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen. Osteopontin vermittelt sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen. In Osteopontin-defizienten Mäusen war die zelluläre Immunantwort gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen im Vergleich zu WT-Tieren vermindert, verbunden mit einer Reduktion von TH1-stimulatorischen Zytokinen wie IL-12 und IFN γ und einer Zunahme des TH2-stimulatorischen Zytokins IL-10 (Ashkar, Weber et al. 2000). Osteopontin ist chemotaktisch für T-Zellen und Monozyten/Makrophagen und fördert deren Adhäsion, wobei Osteopontin selbst als Adhäsionsmolekül fungieren kann. Osteopontin kann die Migration von Makrophagen und ihren Durchtritt durch die ECM durch Veränderung in der Expression von Matrixmetalloproteinasen erleichtern, was auf eine essentielle Rolle von Osteopontin für die Motilität der Makrophagen hinweist (Denhardt, Noda et al. 2001). Bei transgenen Mäusen mit einer Überexpression von Osteopontin reichert sich das Protein in der Media an; im

Vergleich zu nicht-transgenen Tieren kommt es in der Aorta nach 32 Wochen zur spontanen Verdickung der Media und in der A. femoralis nach Schädigung der Gefäßwand zu einer verstärkten Neointimabildung (Isoda, Nishikawa et al. 2002). Diese Befunde sprechen für eine Beteiligung von Osteopontin *in vivo* bei Prozessen, die mit der Proliferation von SMCs assoziiert sind wie Atherosklerose, vaskuläres Remodeling und Restenose nach Angioplastie. Die Bedeutung von Osteopontin für die Regulation physiologischer vaskulärer Prozesse und für das arterielle Remodeling wird in Untersuchungen mit Osteopontindefizienten Mäusen deutlich. In der A. carotis war nach Endothelschädigung mittels Ligatur des Gefäßes die Adhäsion und Akkumulation von Leukozyten drastisch reduziert, die Neointimabildung vermindert und das konstriktive Remodeling stärker ausgeprägt (Myers, Harmon et al. 2003). Die bei diesen Mäusen im Vergleich zum Wildtyp gemessene Senkung des Blutdrucks in Verbindung mit einer erhöhten Herzfrequenz wird auf den Verlust der strukturellen Integrität der ECM zurückgeführt, die lose organisierte Kollagenfasern aufwies.

1.5 Tierexperimentelle Systeme

Wissenschaftliche Studien am Menschen oder an humanen Material sind unter ethischen und anderen Gesichtspunkten nur eingeschränkt durchführbar; zudem macht die langsame Generationsfolge des Menschen Langzeitbeobachtungen schwierig. Aus diesem Grund wurden zahlreiche tierexperimentelle Modelle entwickelt, wobei es jedoch nicht immer möglich ist, die Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien direkt auf das humane System zu übertragen. Dennoch sind in den letzten Jahren zahlreiche Faktoren beschrieben worden, die für die Entstehung und das Fortschreiten atherosklerotischer Gefäßveränderungen sowohl im Tierexperiment als auch beim Menschen von Bedeutung sein können (Sheikine and Hansson 2004; Kobayashi, Lopez et al. 2005).

Neben Kaninchen, Schweinen und Primaten ist insbesondere die Maus ein geeignetes Tier zur Untersuchung von grundlegenden Mechanismen der Atherosklerose. Der Vorteil dieser Spezies liegt vor allem in der kurzen Generationszeit und, bei vorhandener Atherosklerose-Suszeptibilität, der Ausprägung atherosklerotischer Gefäßveränderungen innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne. Das Genom der Maus ist sehr gut untersucht und es stehen für unterschiedliche experimentelle Fragestellungen zahlreiche verschiedene Inzuchtstämme mit sehr gut charakterisiertem genetischen Hintergrund einschließlich Stämme mit gezielten genetischen Veränderungen zur Verfügung (Jawien, Nastalek et al. 2004). WT-Mäuse sind bei Fütterung einer Standarddiät mit geringem Fett- und Cholesterolgehalt in hohem Maß resistent gegenüber der Entstehung der Atherosklerose, die sich deshalb häufig erst nach Fütterung einer atherogenen Diät mit einem hohen Anteil an Fett und Cholesterol sowie Cholsäure ausbildet, wobei die verschiedenen Mausstämme große Unterschiede in ihrer Empfindlichkeit aufweisen (Paigen, Morrow et al. 1985). Die kurzzeitige Gabe einer atherogenen Diät führt häufig nur zur Ausprägung von primären atherosklerotischen Läsionen, die z.B. beim atherosklerose-suszeptiblen C57BL/6J-Mausstamm ausschließlich in der Aortenwurzel lokalisiert sind (Paigen, Morrow et al. 1987; Nishina, Verstuyft et al. 1990).

Untersuchungen zur Atherogenese werden deshalb häufig an ApoE^{-/-}-Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund durchgeführt (Piedrahita, Zhang et al. 1992; Plump, Smith et al. 1992). Apolipoprotein E ist ein wichtiges Strukturprotein der Chylomikronen, der VLDL und HDL (*high density lipoproteins*) und dient als hochaffiner Ligand für die zelluläre Aufnahme dieser Lipoproteine über LDL-Rezeptoren in die Leber (van Dijk, Hofker et al. 1999; Greenow, Pearce et al. 2005). Durch die Ausschaltung des ApoE-Gens bei Mäusen

entwickeln die Tiere bereits unter Standarddiät eine starke Hyperlipidämie (Piedrahita, Zhang et al. 1992) und daraus resultierende atherosklerotische Plaques (Nakashima, Plump et al. 1994; Reddick, Zhang et al. 1994), die ähnlich der Progression der Atherosklerose beim Menschen in ihrer Ausdehnung mit dem Alter zunehmen und sich morphologisch verändern. LDL-R^{-/-}-Mäuse stellen ein weiteres häufig verwendetes Modell zur Untersuchung der Atherogenese dar; sie weisen bei Fütterung einer Standarddiät etwa zweifach erhöhte Cholesterolverwerte auf. Da diese Konzentrationen jedoch nicht ausreichen, um atherosklerotische Gefäßveränderungen zu induzieren, wird LDL-R^{-/-}-Mäusen zusätzlich eine atherogene Diät wie die Western- oder Paigen-Diät verabreicht. Durch die dadurch erzielte starke Hyperlipidämie bilden sich bei den Tieren atherosklerotische Läsionen in der Aorta, die sich zu charakteristischen atherosklerotischen Plaques entwickeln (Ishibashi, Goldstein et al. 1994).

Obwohl Atherosklerosemodelle der Maus geeignet sind, zahlreiche Fragestellungen zur Entstehung und zur Entwicklung atherosklerotischer Gefäßveränderungen zu untersuchen und Rückschlüsse auf die humane Atherogenese zu ziehen (Daugherty 2002; Jawien, Nastalek et al. 2004), gibt es Unterschiede zwischen der murinen und der humanen Atherosklerose. So entstehen bei der Maus keine instabilen atherosklerotischen Plaques, die zu Plaquerupturen mit nachfolgender Bildung von intravasalen Thromben führen (Getz 2000; Daugherty 2002), während beim Menschen die Thrombenbildung die Hauptursache für die klinischen Komplikationen der Atherosklerose darstellt (Davies 1996; Davies 1996). Bei ApoE^{-/-}-Mäusen verstarben die Tiere in Folge von Plaquerupturen und Thromben in der A. innominata erst nach Fütterung mit einer atherogenen Diät über einen langen Zeitraum von bis zu 14 Monaten (Johnson and Jackson 2001; Williams, Johnson et al. 2002). Histologisch konnten Plaquerupturen in der A. innominata von ApoE^{-/-}-Mäusen jedoch bereits nach 8-wöchiger Fütterung einer sehr fett- und cholesterolreichen Diät nachgewiesen werden; die rupturierten Plaques wurden im Anschluss durch eine fibröse Schicht abgedeckt (Johnson, Carson et al. 2005). In einem anderen Modell konnten bei ApoE^{-/-}-Mäusen unter Standarddiät durch eine vierwöchige Ligatur der A. carotis mit anschließender Einengung des Gefäßes durch eine Manschette Plaquerupturen, Hämorrhagien und die Bildung von Thromben induziert werden (Sasaki, Kuzuya et al. 2006). Ein Myokardinfarkt konnte nur in ApoE^{-/-}/LDL-R^{-/-}-Doppelknockout-Mäusen unter atherogener Diät erreicht werden (Caligiuri, Levy et al. 1999).

Arteriell Remodeling kann im tierexperimentellen Modell durch eine Schädigung des Gefäßendothels induziert werden, wobei vorwiegend die A. carotis oder A. femoralis verwendet werden. Bei der perivaskulären elektrischen Schädigung wird an einem freipräparierten Gefäßabschnitt ein schwacher Strom durch das Gefäß geleitet (Carmeliet, Moons et al. 1997). Eine nicht-invasive Methode ist die photochemische Schädigung. WT-Mäusen unter atherogener Diät wurde über die Schwanzvene eine photoreaktive Substanz injiziert und mittels perkutaner Bestrahlung der A. femoralis mit Licht einer definierten Wellenlänge eine Gefäßwandschädigung und eine daraus resultierende intimale Hyperplasie erzeugt (Trieu, Narla et al. 2000). Durch die Ligation der A. carotis communis proximal der Bifurkation mit einer dauerhaften Unterbrechung des Blutflusses kommt es bei 3 – 4 Monate alten Mäusen nach 4 Wochen sowohl zur Bildung einer Neointima als auch zu irreversiblen Veränderungen in der Struktur der Gefäßwand (negatives arterielles Remodeling); beide Prozesse bewirken eine Abnahme des Gefäßdurchmessers (Kumar and Lindner 1997). Eine weitere Möglichkeit, die Bildung einer Neointima und eine Restenose zu induzieren, ist die intraluminale Schädigung der Gefäßwand, bei der ein Draht oder Katheter in das Gefäßlumen eingeführt wird mit nachfolgender Deendothelialisierung und Schädigung der Media (Lindner, Fingerle et

al. 1993). Es gibt noch weitere Modelle der Endothelschädigung bzw. Varianten und Kombinationen der oben genannten Methoden wie beispielsweise das Anbringen einer perivaskulären Gefäßmanschette (Moroi, Zhang et al. 1998), eine vorübergehende Ligation des Gefäßes mit anschließender intraluminale mechanischer Schädigung (Leidenfrost, Khan et al. 2003) oder eine intraluminale Gefäßschädigung der A. carotis durch starke Dehnung des Gefäßes mit Luft (Simon, Dhen et al. 2000). Alle genannten Modelle führen zu einer Schädigung des Endothels und induzieren ein vaskuläres Remodeling im jeweiligen Gefäß.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Arteriell Remodeling wird in Verbindung mit vaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose und Restenose seit langem sowohl in humanen (Kadar and Bjorkerud 1985; Kerber, McPherson et al. 1989) als auch in murinen Gefäßen beobachtet (Bonhuth, Heistad et al. 1997). Die als Remodeling bezeichneten Umbauprozesse in der Gefäßwand, die zu einer Größen- oder -abnahme des Gefäßes bzw. Gefäßquerschnitts führen, können als Anpassung an veränderte hämodynamische Bedingungen angesehen werden. Trotz intensiver Untersuchungen in den zurückliegenden Jahren sind die am arteriellen Remodeling beteiligten molekularen Prozesse einschließlich der beteiligten Gefäß- und Immunzellen sowie damit einhergehende Veränderungen in der Genexpression noch nicht vollständig aufgeklärt. Das Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit bestand deshalb darin, mittels histologischer, immunhistologischer und molekularbiologischer Methoden Prozesse des arteriellen Remodelings *in vivo* in normalen und atherosklerotisch veränderten Gefäßen der Maus näher zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden Remodelingprozesse in der A. carotis normaler und hyperlipidämischer Mäuse initiiert. Die Untersuchungen wurden am atherosklerose-suszeptiblen C57BL/6J-Mausstamm durchgeführt, wobei sowohl WT-Mäuse als auch ApoE^{-/-}-Mäuse mit C57BL/6J-Hintergrund eingesetzt wurden. Die an diesen Mauspopulationen durchgeführten Studien konzentrierten sich auf verschiedene Schwerpunkte:

a) Zur Untersuchung des arteriellen Remodelings wurde ein tierexperimentelles Modell in der A. carotis der Maus etabliert, bei dem durch eine mechanisch induzierte intraluminale Schädigung der Gefäßwand und die damit verbundene Deendothelialisierung Remodelingprozesse initiiert werden. Die nach der Schädigung auftretenden morphometrischen und morphologischen Veränderungen einschließlich der Proliferation glatter Muskelzellen und der Migration von Makrophagen und anderer Zellen in die Gefäßwand wurden in ihrem zeitlichen Verlauf charakterisiert.

b) Durch molekularbiologische Analysen von geschädigten im Vergleich zu nichtgeschädigten Gefäßen sollten Genexpressionsänderungen, die durch die Schädigung induziert werden, in ihrem zeitlichen Verlauf nach der Deendothelialisierung aufgezeigt werden. Bisher gibt es kaum Untersuchungen, die molekulare Mechanismen von nicht-atherosklerotisch bedingten Remodelingprozessen beschreiben.

c) Ein dritter Untersuchungsschwerpunkt war die Charakterisierung der Atherosklerose und des atherosklerotisch bedingten arteriellen Remodelings in der Mauseorta. Genomweite Expressionsanalysen (Affymetrix™) der atherosklerotischen Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zur nicht-atherosklerotischen Aorta von WT-Mäusen wurden durchgeführt, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, die für die Atherosklerose und das damit assoziierte arterielle Remodeling von Bedeutung sein könnten.

Material und Methoden

2.1 Geräte, Reagenzien und Lösungen

Eine Übersicht der verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Puffer-Lösungen einschließlich der Bezugsquellen befindet sich im Anhang unter A.2 bis A.6.

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Mauspopulationen

Die Untersuchungen wurden an ApoE^{-/-}-Mäusen (Stamm: B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}) und an WT-Mäusen (Stamm: C57BL/6J) durchgeführt. Je 4 Zuchtpaare dieser Mauspopulationen wurden im Jahr 2000 von *The Jackson Laboratory Bar Harbor/USA* bezogen und für die Zucht bzw. den Aufbau der Mauspopulationen verwendet. Die Haltung erfolgte im Institut für Versuchstierkunde (IVTK) des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen auf autoklaviertem Weichholzgranulat bei einer Temperatur von 22°C, einer mittleren Luftfeuchte von 50 % und einer Belichtung von 14 h pro Tag. Die Versorgung erfolgte mit autoklaviertem Standard-Mausfutter der Firma Altromin[®] (Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage/Deutschland) (Katalog-Nummer 1314) und autoklaviertem Wasser ad libitum. Für die Versuche wurden männliche und weibliche Tiere beider Populationen mit einem Gewicht zwischen 24,0 und 34,0 g und einem Alter von 32 ± 3 Wochen verwendet.

2.2.2 Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche wurden entsprechend des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25.05.1998 (BGBl. I Nr. 30 vom 19.05.1998 S. 1105, 1818) nach Genehmigung durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz/Abteilung Gesundheitlicher Verbraucherschutz, Veterinärwesen, Pharmazie unter dem Titel „Experimentelle Untersuchungen zur Beeinflussung der Arteriosklerose durch Hemmung des 5-Lipoxygenase-Systems an der Maus (Reg.-Nr. 02-14/01) sowie unter dem Titel „Untersuchungen zur Bedeutung und zum Zusammenhang von Alterungs-, Entzündungs- und Immunprozessen bei der Arteriosklerose der Maus“ (Reg.-Nr. 02-26/05) durchgeführt.

2.2.3 Narkotisierung der Tiere

Alle operativen Eingriffe wurden an narkotisierten Tieren vorgenommen. Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion eines Narkosemittelgemisches narkotisiert, das wie das Gemisch zur Aufhebung der Narkose vom Institut für Versuchstierkunde bezogen wurde. Folgende Substanzen und Dosierungen wurden zur Narkotisierung eingesetzt: Medetomidin (Domitor[®], Chemie Technik Pfizer GmbH, Karlsruhe/Deutschland) 0,5 mg/kg als Sedativum und Analgetikum; Midazolam (Dormicum[®], Ratiopharm GmbH, Ulm/Deutschland) 5 mg/kg als kurzwirksames Hypnotikum und Fentanyl (Fentanyl[®], Janssen Cilag AG, Neuss/Deutschland) 0,05 mg/kg als Opioid-Analgetikum. Nach Beendigung der Operation wurde die Narkose durch subkutane Injektion eines Gemisches aus spezifischen Antidotem wieder aufgehoben. Zur Antagonisierung wurden folgende Arzneimittel und Dosierungen verwendet: Atipamezol (Antisedan[®], Chemie Technik Pfizer GmbH, Karlsruhe/Deutschland) 2,5 mg/kg als Antagonist von Medetomidin; Flumazenil (Anexate[®], Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/Deutschland) 0,5 mg/kg als Antagonist von

Midazolam; und Naloxon (Naloxon[®], CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe/Deutschland) 1,2 mg/kg als Antagonist von Fentanyl. Nach Injektion des Narkosemittelgemisches trat die Narkose innerhalb von 10 min ein; nach Injektion der Antidote erwachten die Tiere innerhalb von 5 bis maximal 10 min aus der Narkose.

2.3 Untersuchungen an der A. carotis

2.3.1 Präparation und intraluminale Schädigung der A. carotis

Für die intraluminale Schädigung der Gefäßwand wurde ein tierexperimentelles Modell in Anlehnung an das von Lindner et al. publizierte Modell zur Endothelschädigung in der A. carotis der Maus etabliert (Lindner, Fingerle et al. 1993). Die gesamte Operation einschließlich der Narkose dauerte ca. 35 - 40 min. Die narkotisierte Maus wurde mit der Ventralseite nach oben auf einer mit sterilen Zellstofftüchern abgedeckten Korkplatte fixiert. Mit einer chirurgischen Schere wurde medial am Hals ein ca. 1 cm langer Einschnitt gemacht, der unter dem Stereomikroskop STEMI[®] 200-C mit Hilfe von zwei chirurgischen Pinzetten vorsichtig gedehnt wurde. Die A. carotis dextra und die A. carotis sinistra wurden einschließlich der Bifurkation in die A. carotis interna und externa freipräpariert (Abb. 3A). Die A. carotis dextra diente als individuelles, scheinoperiertes Kontrollgefäß, um mögliche Einflüsse der chirurgischen Manipulation auszuschließen.

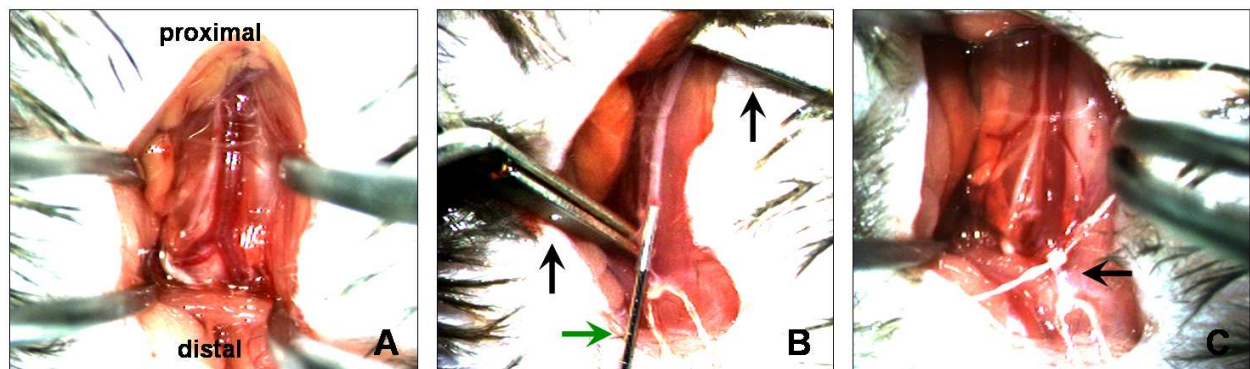


Abb. 3: Präparation und Schädigung des Gefäßendothels der A. carotis sinistra.

Es sind verschiedene Phasen der Operation dargestellt. In Bild A ist die freipräparierte A. carotis sinistra mit ihren beiden Ästen, der A. carotis interna und A. carotis externa, zu sehen. Bild B zeigt das Einführen des Drahtes in die A. carotis communis über die abgebundene A. carotis externa (grüner Pfeil). Die A. carotis interna und A. carotis communis sind durch Gefäßklemmen vorübergehend verschlossen (schwarze Pfeile), um Blutungen zu vermeiden. In Bild C ist das Gefäß nach erfolgter Schädigung und Entfernen der Gefäßklemmen dargestellt. Die A. carotis externa, über die der Draht eingeführt wurde, ist mit einem Nylonfaden abgebunden (schwarzer Pfeil). Die Durchblutung des geschädigten Gefäßabschnitts ist vollständig wiederhergestellt, der Blutfluss erfolgt über die A. carotis interna.

Die A. carotis externa sinistra wurde möglichst weit distal mit einem sehr dünnen Nylonfaden irreversibel abgebunden. Zur Vermeidung von Blutungen wurde der Blutfluss in der A. carotis interna und der A. carotis communis mit Gefäßklemmen für wenige Minuten unterbrochen (Abb. 3B). Über einen kleinen Einschnitt in der A. carotis externa proximal der Ligation wurde ein Draht mit einem Durchmesser von 300 µm (Führungsdraht eines Ballonkatheters) eingeführt und bis in die A. carotis communis vorgeschoben (Abb. 3B). Durch 5-malige Passage des Drahtes wurde intraluminale Gefäßwandschädigung erzeugt. Nach Entfernen des Drahtes wurde die A. carotis externa proximal der Einschnittstelle abgebunden. Die Gefäßklemmen wurden entfernt und der Blutfluss wurde wiederhergestellt (Abb. 3C). Die Wunde

wurde mit sterilen Wundklammern verschlossen und mit Softasept[®] N zur Desinfektion besprüht. Die Narkose der Maus wurde durch subkutane Injektion der entsprechenden Antidote (siehe 2.2.3) beendet. Die abgebundene A. carotis externa führte zu keinen sichtbaren Beeinträchtigungen der Tiere. Die Maus wurde im Anschluss für die in den Versuchsprotokollen festgelegten Zeiten im Institut für Versuchstierkunde unter standardisierten Bedingungen gehalten (siehe 2.2.1).

2.3.2 In vivo-Markierung der A. carotis mit Evans Blau

Um *in vivo* den Grad der Deendothelialisierung nach der Gefäßwandschädigung zu bestimmen, wurde Mäusen in definierten zeitlichen Abständen nach der Schädigung eine Evans Blau-Lösung appliziert. Dazu wurden die Tiere wie unter 2.2.3 beschrieben narkotisiert und über die Schwanzvene wurden 100 µl einer 2,5 %-igen Evans Blau-Lösung (in physiologischer Kochsalzlösung) injiziert. Nach 2 min wurde die Maus durch Kohlendioxid-Begasung getötet und die gesamte Maus zur Fixierung der Gefäße mit 4 %-igem Formalin (Roti[®]-Histofix) gespült (perfusionsfixiert). Dazu wurde die Maus mit der Ventralseite nach oben auf einer Korkplatte fixiert. Der Bauchraum wurde durch einen medialen Schnitt bis zum Sternum eröffnet. Das Zwerchfell und die Rippen wurden durchtrennt, das Sternum wurde zurückgeklappt und fixiert. Das Herz wurde vom Perikard befreit und ein 23 G Katheter (0,65 mm Venofix[®] S) in den linken Ventrikel eingeführt. Über eine ISMATEC MV-CA 4 Schlauch-Pumpe wurden mittels eines 3-Wege-Hahnes (Discofix[®] B) die verschiedenen Perfusionslösungen (physiologische Kochsalzlösung, 4 %-iges Formalin) appliziert. Die Drainage erfolgte durch Einschneiden des rechten Vorhofes; die aus dem Vorhof austretende Spülflüssigkeit wurde sofort abgesaugt. Die Perfusion der Gefäße mit der Spül- und Fixationslösung erfolgte entsprechend des physiologischen Blutdrucks von Mäusen mit einem Druck von 100 mmHg. Es wurde 3 min mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, um das Blut aus dem Gefäßsystem zu entfernen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Gefäße durch 15-minütige Perfusion mit 4 %-igem Formalin [modifiziert nach (Horiba, Kadomatsu et al. 2000)]. Zur Entnahme der Karotisarterien wurden das Sternum und die Rippen entfernt und die Gefäße im thorakalen und zervikalen Bereich weitläufig freigelegt. Ausgehend vom Aortenbogen wurden die A. carotis sinistra und die A. carotis dextra bis zur Bifurkation freipräpariert. Das gesamte Präparat, bestehend aus Aortenbogen und den beiden Karotisarterien, wurde entnommen und zur Einschätzung der mit Evans Blau angefärbten Gefäßabschnitte in eine Zellkulturschale mit 4 %-igem Formalin überführt und am Stereomikroskop ausgewertet.

2.3.3 Ex vivo-Aufarbeitung der A. carotis für histologische Untersuchungen

Die Tiere wurden durch Kohlendioxid-Begasung getötet und mit der Ventralseite nach oben auf der Unterlage fixiert. Durch Eröffnung von Bauchraum und Thorax wurde das Herz freigelegt; das Perikard wurde entfernt. Die gesamte Maus wurde perfusionsfixiert wie unter 2.3.2 beschrieben. Danach wurden die Karotisarterien mitsamt der Bifurkation von A. carotis interna und externa freipräpariert, entnommen und in einer Zellkulturschale für ca. 18 h bei 4°C in 20 %-iger Sucrose-Lösung gewaschen. Die Gefäße wurden in *TissueTek* in *Cryomold Biopsy* Schalen eingebettet, in -80°C kaltem n-Pentan eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die histologische Auswertung wurden 10 µm dicke Schnitte am Gefriermikrotom HM 500 OMV hergestellt. Dazu wurde die A. carotis communis von der Bifurkation an in proximaler Richtung in 6 Schnittfolgen eingeteilt (Abb. 4), wobei im Abstand von 600 µm je drei Schnitte zur Ermittlung der morphometrischen Daten, der Gesamtzellzahl und der Zahl proliferierender Zellen auf Polysine[™] Objektträger aufgenommen wurden. Zusätzliche Schnitte der Schnittfolgen 3, 4 und 5 wurden ebenfalls

auf Polysine™ Objektträger aufgenommen, luftgetrocknet und zur späteren Verwendung für immunhistochemische Markierungen bei –80°C aufbewahrt.

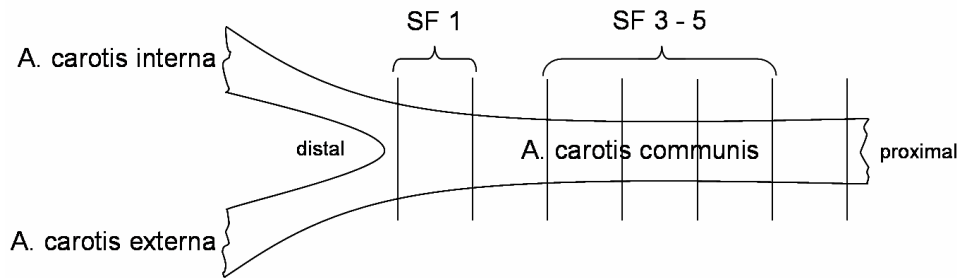


Abb. 4: Schematische Darstellung der Serienschritte der A. carotis communis.

Die A. carotis communis wurde in 6 Abschnitte zu je 600 µm eingeteilt (Schnittfolge, SF), beginnend an der Bifurkation von A. carotis interna und externa. Dieses standardisierte Vorgehen ermöglichte die Auswertung unterschiedlicher Gefäßabschnitte bzw. den Vergleich verschiedener Gefäße untereinander. Von jeder Schnittfolge wurden Serienschritte angefertigt, die in definierter Reihenfolge für histologische und immunhistologische Färbungen verwendet wurden. Für weitere Färbungen wurden zusätzliche Schnitte der SF 3, 4 und 5 bei –80°C aufbewahrt.

2.3.4 Ex vivo-Aufarbeitung der A. carotis für molekularbiologische Untersuchungen

Die Tötung der Maus und die Präparation von Herz und Gefäßen erfolgte wie unter 2.3.3 beschrieben. Danach wurde die A. carotis interna auf beiden Seiten inzidiert und beide Karotisarterien wurden über einen Einstich an der Aortenwurzel mit eiskaltem PBS-Puffer gespült. Die A. carotis communis sinistra und dextra wurden von ihrem Beginn am Aortenbogen bzw. Truncus brachiocephalicus bis zur Bifurkation in die A. carotis interna und externa herauspräpariert und in ein 5 ml Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Präparation bei –80°C gelagert.

2.3.5 RNA-Präparation aus der A. carotis

Zur gefrorenen A. carotis wurden 900 µl Trizol® gegeben und diese im 5 ml Reaktionsgefäß mit einem 65 mm Omni-Tip drei mal 20 s homogenisiert. Das Trizol-Lysat wurde in ein 1,5 ml Phase Lock Gel (PLG)-Reaktionsgefäß überführt, 180 µl Chloroform wurden zugegeben und zur Trennung von wässriger, RNA-haltiger Phase und organischer Phase die PLG-Reaktionsgefäße geschüttelt und danach für 15 min bei 12°C und 18000 g zentrifugiert. Der obere, wässrige, RNA-haltige Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 280 µl Ethanol überführt, vermischt, auf eine RNeasy® Micro-Säule gegeben und 1 min bei Raumtemperatur und 6500 g zentrifugiert. Alle RNA-Präparationen erfolgten mit dem RNeasy® Micro-Kit der Firma Qiagen; die mitgelieferte Arbeitsvorschrift wurde an einigen Stellen modifiziert. Der Durchlauf der Säule wurde verworfen und die Säule mit 350 µl Puffer RW1 für 1 min bei 6500 g gewaschen. Dann wurden 10 µl der DNase 1 mit 70 µl Puffer RDD vermischt und die Säule mit 80 µl der Lösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Säule nochmals mit 350 µl Puffer RW1 gewaschen und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl RPE-Puffer und 500 µl 80 %-igem Ethanol bei Raumtemperatur und 6500 g gewaschen und für 3 min bei 18000 g trocken zentrifugiert. Für die Elution der RNA wurde die Säule auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß umgesetzt, 12 µl RNase-freies Wasser wurden auf die Säule gegeben und diese wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde bei Raumtemperatur und 8000 g für 2 min eluiert. Die RNA-Lösung wurde bei –80°C gelagert.

2.4 Untersuchungen an der Aorta

2.4.1 Präparation der Aorta für molekularbiologische Untersuchungen

Die Maus wurde durch Begasung mit Kohlendioxid getötet, gewogen und auf einer Korkplatte mit der Ventralseite nach oben fixiert. Der Bauchraum wurde durch einen medialen Schnitt bis zum Sternum eröffnet. Dann wurden das Zwerchfell und die Rippen durchtrennt und das Sternum zurückgeklappt. Das Herz wurde vom Perikard befreit und aus dem rechten Vorhof an der Eintrittsstelle der unteren Hohlvene wurde mit einer 1 ml Spritze (Omnifix®-F) mit einer 27 G x ½" Kanüle unter Nutzung des Stereomikroskops OPMI® 1 FR das Blut für weiterführende Analysen gewonnen.

Die Aorta wurde vom Aortenbogen bis zur Abzweigung der Beckenarterien freigelegt. Danach wurde durch einen Einstich in die linke Beckenvene die untere Hohlvene mit ca. 5 ml eiskaltem PBS-Puffer gespült. Die Drainage der Spülflüssigkeit erfolgte über eine Inzision der unteren Hohlvene in Höhe der Nierenvenen. Durch dieses Vorgehen wurde eine Kühlung der Aorta und des umgebenden Gewebes erreicht. Im Anschluss wurde die Verbindung zwischen Aorta und Zwerchfell gelöst und der abdominale Teil der Aorta sorgfältig vom umgebenden Gewebe befreit. Nach Inzision beider Beckenarterien wurde die Aorta über einen Einstich an der Aortenwurzel mit 2 ml eiskaltem PBS-Puffer gespült, danach wurden die großen arteriellen Gefäßabgänge im Bereich des Bauchraums durchtrennt. Der thorakale Teil der Aorta einschließlich des Aortenbogens wurde sorgfältig freigelegt. Nach erneutem Spülen der Aorta mit 2 ml eiskaltem PBS-Puffer wurden die Verbindung zum Herzen, die 3 arteriellen Gefäßabgänge des Aortenbogens sowie die Beckenarterien vollständig durchtrennt. Die isolierte Aorta wurde sofort in eine Zellkulturschale mit eiskaltem PBS-Puffer überführt und in 5 - 6 Segmente zerteilt. Diese wurden in ein 5 ml Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für weiterführende Untersuchungen wurden vor Präparation der Aorta Thymus, Milz und ein Teil der Leber entnommen, in *Cryomold Biopsy* Schalen in *TissueTek* eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Organe wurden ebenfalls bei -80°C gelagert.

2.4.2 RNA-Präparation aus der Aorta

Zu der gefrorenen zerteilten Aorta wurden 900 µl Trizol® gegeben; im Anschluss wurde die Aorta im 5 ml Reaktionsgefäß mit einem 65 mm Omni-Tip 5 mal 20 s homogenisiert. Alle RNA-Präparationen erfolgten mit dem RNeasy® Micro-Kit der Firma Qiagen, die mitgelieferte Arbeitsvorschrift wurde an einigen Stellen modifiziert. Die RNA-Präparation wurde wie unter 2.3.5 beschrieben durchgeführt. Im letzten Arbeitsschritt wurde jedoch zwei mal mit 500 µl RPE-Puffer bei Raumtemperatur und 6500 g gewaschen und danach wie beschrieben für 3 min bei 18000 g trocken zentrifugiert. Für die Elution der RNA wurde die Säule auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß umgesetzt und zwei mal mit 9 µl RNase-freiem Wasser bei Raumtemperatur und 8000 g für je eine Minute eluiert. Die RNA-Lösung wurde bei -80°C gelagert.

2.5 Aufarbeitung der RNA-Extrakte der A. carotis und der Aorta

2.5.1 Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung

Für die Ermittlung der RNA-Konzentration wurde 1 µl der RNA-Lösung am NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer vermessen. Bei Bedarf wurde die Konzentration der RNA-Lösung mit RNase-freiem Wasser auf die gewünschte Endkonzentration eingestellt.

2.5.2 Qualitätskontrolle der RNA

Die RNA-Integrität wurde durch Mikroelektrophorese mit einem Agilent 2001 Bioanalyzer System nachgewiesen. Dazu wurde der *RNA 6000 Nano LabChip Kit* für die Aorta bzw. der *RNA 6000 Pico LabChip Kit* für die *A. carotis* in Kombination mit dem *Syringe Kit* genutzt entsprechend der Vorschrift des RNA 6000 Nano Assay- bzw. RNA 6000 Pico Assay-Standardprotokolls. Bei intakter RNA wiesen die Elektro-pherogramme ein charakteristisches Muster bestehend aus zwei RNA-Banden auf, bei dem die 28s-rRNA-Menge größer war als die 18s-rRNA-Menge. Waren neben diesen beiden RNA-Banden noch weitere sichtbar und/oder die Mengenverhältnisse der beiden Banden umgekehrt, so lag eine Degradation oder Kontamination der Probe vor, die dann nicht verwendet wurde.

2.6 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)-Analysen der *A. carotis* und der Aorta

2.6.1 Reverse Transkription der RNA (RT-PCR)

Für das Umschreiben der Boten-RNA (*messenger RNA*, mRNA) in die dazu komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) wurde eine reverse Transkriptase aus dem Vogel-Myeloblastosis-Virus (AMV) verwendet. Poly-Desoxy-Thymidin [p(dT)] diente dabei als spezifischer Primer zur Erkennung und Amplifikation von mRNA. Je nach RNA-Konzentration der Probe und der gewünschten Endkonzentration im PCR-Ansatz wurde zur RNA-Lösung p(dT)-Primer-Lösung (25pmol/μl) in einem 200 μl PCR-Reaktionsgefäß zugegeben und 4 min bei 72°C inkubiert (GeneAmp® PCR System 2400) für die Bindung der p(dT)-Primer an die mRNA. Das RT-PCR-Reaktionsgemisch, bestehend aus RNase-freiem Wasser, 5x cDNA Synthesis Buffer, 167 μM Desoxynukleotidtriphosphat-Mix [dNTP-Mix (zu gleichen Teilen Adenosintriphosphat, Thymidintriphosphat, Cytosintriphosphat, Guanosintriphosphat)], 0,6 U/μl RNase-Inhibitor, 5 mM Dithiothreitol, 0,33 U/μl AMV Reverse Transkriptase, 1 μg/μl Rinderserum-Albumin (BSA) wurde zugegeben; der PCR-Ansatz wurde eine Stunde bei 42°C inkubiert. Im Anschluss wurde die cDNA 10 min bei 94°C denaturiert.

2.6.2 Primerdesign mit Primer 3

Für die Erstellung spezifischer Primer wurde das Programm Primer 3 benutzt (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Die gewählten Parameter waren für alle Primer gleich. So sollte die Fragmentlänge des Amplifikates zwischen 150 und 250 bp liegen und maximal drei gleiche, aufeinander folgende Nukleotide aufweisen. Desweiteren wurden die gleichen Schmelztemperaturen für das Primerdesign aller Primer ($T_M = G/C \times 4 + A/T \times 2$) gewählt. Für jede Sequenz wurden fünf mögliche Primerpaare vom Programm ermittelt. Primer 3 hat den Vorteil, dass die Ergebnisse mit einer *Misspriming Library* abgeglichen werden, um eine Kreuzreaktivität mit anderen Spezies auszuschließen. Trotzdem wurden alle verwendeten Amplifikatsequenzen inklusive der Primer nochmals mit der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) auf eine mögliche Kreuzreaktivität überprüft und nur bei negativem Ergebnis verwendet. Alle Primer wurden von Invitrogen GmbH (Karlsruhe/Deutschland) bezogen und in destilliertem Wasser gelöst, so dass sie in einer Konzentration von 60 pmol/ml vorlagen. Die zusammengehörigen Primerpaare wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und dann in der PCR eingesetzt.

2.6.3 Primeretablierung mit Blockcycler-PCR

Die Primeretablierung diente der Überprüfung von Spezifität und Funktionalität der Primer, da unspezifische Amplifikate oder die Bildung von Primerdimeren eine Auswertung der qRT-PCR unmöglich machen würden. Die Primer wurden in der Blockcycler-PCR (GeneAmp[®] PCR System 2400) mit cDNA aus Geweben, die bekannte hohe Expressionsniveaus der zu untersuchenden Gene aufwiesen, getestet. Die primerspezifische Annealing-Temperatur betrug 4°C unter der mittleren Schmelztemperatur, die mit der Primer 3-Software ermittelt wurde.

Zuerst erfolgte eine initiale Denaturierung der DNA für 2,5 min bei 94°C und danach die Wiederholung von Denaturierung (30 s bei 94°C), Primer-Bindung (Annealing, 30 s bei primerspezifischer Annealing-Temperatur) und DNA-Polymerisierung (Elongation, 30 s bei 72°C) für 25 - 35 Zyklen. Die Zyklenzahl war primerabhängig und richtete sich nach dem Expressionsniveau des Gens. Der PCR-Ansatz betrug 25 µl und enthielt neben RNase-freiem Wasser 200 µM dNTP-Mix, 1,8 mM Magnesiumchlorid, je 0,2 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 1/10 Volumen 10x PCR-Puffer, 0,1 µg/µl BSA, 0,8 U/µl Platinum Taq DNA-Polymerase und 2 µl cDNA-Lösung. Das Amplifikat wurde auf einem 2 %-igen Agarose-Gel [2 % Agarose in TAE-Puffer (siehe Anhang A.6.8) und 0,125 mM Ethidiumbromid] aufgetrennt. Die Agarose wurde mit dem TAE-Puffer für einige Minuten erhitzt, bis die Lösung klar und die Agarose vollständig gelöst war. Dann wurde zu dem noch heißen Gel das Ethidiumbromid gegeben und das Gel gegossen. Nach dem Erkalten wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und je 10 µl Probe einschließlich 10 µl DNA-Mass Ladder aufgetragen. Dazu wurde das PCR-Produkt im Verhältnis 10:1 mit Stop-Mix (siehe Anhang A.6.9) vermischt. Mit Hilfe des Bio-Rad 250/2.5 erfolgte die Auftrennung für ca. 20 min bei 132 Volt und 80 mA. Die Auswertung erfolgte mit einem Fotodokumentationssystem bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Bei schwachen DNA-Banden wurde der PCR-Lauf wiederholt und dabei die Annealing-Temperatur gesenkt und/oder die Anzahl der Zyklen erhöht. Wenn bei der PCR zusätzliche Amplifikate entstanden, die durch zusätzliche Banden bzw. eine nicht deutlich begrenzte Bande zu erkennen waren, wurde die Annealing-Temperatur erhöht und/oder die Anzahl der Zyklen reduziert. Führt keine dieser Maßnahmen zum gewünschten Ergebnis, wurde eines der anderen von Primer 3 ermittelten Primerpaare geprüft.

2.6.4 Reamplifikation des PCR-Produkts aus der Etablierung

Mit Hilfe einer langwelligen UV-Handlampe wurde bei einer Wellenlänge von 366 nm die DNA-Bande möglichst knapp mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl destilliertem Wasser überführt und für ca. 18 h bei 4°C eluiert.

56 µl des eluierten Amplifikates und 44 µl PCR-Reaktionsgemisch (200 µM dNTP-Mix, 1,8 mM Magnesiumchlorid, je 0,2 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 1/10 Volumen 10x PCR-Puffer, 0,1 µg/µl BSA, 0,8 U/µl Platinum Taq DNA-Polymerase) wurden in der Blockcycler-PCR mit 25 Zyklen und der den Primern entsprechenden optimalen Annealing-Temperatur eingesetzt. Der Ablauf von Denaturierung, Annealing und Elongation war wie unter 2.6.3. beschrieben. Das Amplifikat wurde mit dem Invisorb PCRapid Kit[®] entsprechend dem Standardprotokoll gereinigt. Die Konzentration wurde am NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer bestimmt. Zur Kontrolle wurden das gereinigte Amplifikat sowie ungereinigtes Amplifikat mit DNA Mass Ladder auf einem 2 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt und mit der Fotodokumentation ausgewertet (siehe 2.6.3.).

2.6.5 Sequenzierung des PCR-Produkts

Die gereinigten Amplifikate wurden bei der MWG Biotech AG (Ebersberg/Deutschland) sequenziert. Je Basenpaar Fragmentlänge wurden 20 ng reamplifiziertes Fragment in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und unter dem Abzug eingetrocknet, wobei darauf zu achten war, dass der DNA nicht alles Wasser entzogen wurde, da dies die Sequenzierung negativ beeinflussen kann. Von jedem der zugehörigen Primer wurden 120 pmol Primer in ein weiteres Reaktionsgefäß gefüllt. Die Proben konnten ungekühlt per Post verschickt werden. Die Sequenzdaten waren anschließend bei MWG online verfügbar (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) und wurden mit der erwarteten bekannten Sequenz des Gens verglichen.

2.6.6 Herstellung der Standards für die qRT-PCR

Die reamplifizierten und gereinigten PCR-Produkte wurden mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 10^{10} Einzelstrang (ss) DNA-Molekülen/ μ l eingestellt [1 μ g 1000 bp doppelsträngige (ds) DNA = 1,52 pmol dsDNA = 3,03 pmol ssDNA, 1 pmol = $6,022 \times 10^{11}$ Moleküle (Invitrogen Katalog 2004, Appendix)]. Sie dienten in der qRT-PCR als Ausgangsmaterial für die Eichreihen zur Normierung der Messwerte und waren bei -20°C mindestens 1 Jahr haltbar. Aus dem Standard (10^{10} ssDNA-Moleküle/ μ l) wurde eine Verdünnungsreihe mit 2.500.000, 500.000, 100.000, 25.000, 5.000, 1.000, 200, 40 und 8 ssDNA-Molekülen/ μ l durch Zugabe von destilliertem Wasser hergestellt. Von dieser Eichreihe wurden in Abhängigkeit vom erwarteten Messwert mindestens fünf nebeneinander liegende Eichpunkte zur Eichung der Messwerte in der qRT-PCR eingesetzt.

2.6.7 Durchführung der qRT-PCR

In der qRT-PCR kann das Expressionsniveau eines Genes ermittelt werden. Dazu wird *Sybr Green* verwendet, ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert und dann fluoresziert. So kann während der PCR und am Ende der Elongationsphase die DNA-Konzentration bestimmt werden. Da in der PCR die Amplifikatmenge in jedem Zyklus verdoppelt wird, lässt sich anhand der Zyklenzahl die eingesetzte cDNA-Menge und damit auch das Expressionsniveau ermitteln. Die qRT-PCR wurde im Rotor Gene 200 Real-Time Cycler mit der zugehörigen Rotor Gene-Software durchgeführt. Dem PCR-Reaktionsgemisch (siehe 2.6.3) wurde *Sybr Green* hinzugefügt, so dass der Anteil im PCR-Ansatz 8 % betrug, ansonsten waren die Bedingungen ähnlich wie bei der Blockcycler-PCR (10 s 99°C , 50 s 96°C , Denaturierung: 30 s bei 96°C , Annealing: 30 s bei primer-spezifischer Annealing-Temperatur + 1°C , Elongation: 30 s bei 72°C ; Denaturierung, Annealing und Elongation für 40 Zyklen).

Bei der Auswertung mit der Rotor Gene-Software wurde zuerst die Eichreihe überprüft. Der Korrelationskoeffizient (R) sollte $> 0,998$ sein. Die Eichpunkte sollten voneinander den gleichen Abstand haben und alle Proben innerhalb der Eichreihe liegen. Die Steigerung der Fluoreszenz (die Amplifikationseffizienz) sollte bei allen Eichproben und den unbekanntenen Proben gleich sein. Bei Abweichungen wurden die Schmelzkurven verglichen; die bei den Eichproben und den unbekanntenen Proben parallel verlaufen müssen und ihr Maximum bei der gleichen Temperatur erreichen sollten. Die Null-Kontrolle (PCR-Mix ohne cDNA) darf keinen Messwert liefern. Eine Übersicht aller verwendeten Primer befindet sich im Anhang unter A.8.

2.7 **Microarrayanalysen der Aorta (Affymetrix™)**

Die technische Durchführung des Microarray erfolgte durch die Affymetrix™-Microarray-Plattform des Instituts für Vaskuläre Medizin (IVM) (<http://www.med.uni-jena.de/ivm/>) der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Je 3 RNA-Proben der Aorta von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen wurden unter Verwendung des murinen U430 2.0 GeneChip® (Mouse Genome 430 2.0 Array) untersucht.

2.7.1 **Prinzipielle Vorgehensweise bei der Aufbereitung der RNA-Proben**

Alle RNA-Proben wurden mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 133 ng/µl eingestellt, insgesamt wurden je Probe 1,2 µg gesamtzelluläre RNA in 9 µl Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC)-Wasser eingesetzt. Im ersten Schritt erfolgte die reverse Transkription der mRNA in einzelsträngige cDNA mit Hilfe von T7-oligo(dT)-Primer und der Verwendung von Superscript™ II RNaseH⁻ Reverse Transkriptase sowie der Ergänzung des komplementären DNA-Strangs durch eine Kombination von E. coli DNA-Polymerase 1, E. coli DNA-Ligase, Ribonuclease H und T4 DNA-Polymerase. Zur Reinigung und Konzentrierung der cDNA wurden eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Ammoniumacetat-Fällung durchgeführt. Das so erhaltene cDNA-Pellet wurde vor der *in vitro*-Transkription (IVT) zur Synthese von cRNA in DEPC-Wasser gelöst und die Konzentration am NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer bestimmt. In der IVT wurde unter Verwendung des *BioArray™ HighYield™ RNA Transcript Labeling Kit (T7)* und der darin enthaltenen T7-RNA-Polymerase die cDNA in biotin-markierte cRNA (alle Cystein- und Uracil-Nukleotide sind biotinyliert) abgeschrieben, gleichzeitig wurde die cRNA amplifiziert. Nach der IVT wurde die cRNA mit Hilfe des *RNeasy® Mini-Kit* gereinigt und die Konzentration bestimmt. Für die Hybridisierung der cRNA an den Oligonukleotid-Array wurde diese einer unspezifischen Fragmentierung mit Fragmentierungspuffer (siehe Anhang A.6.10) für 30 min bei 94°C unterzogen. Die Hybridisierung der cRNA-Fragmente an die entsprechenden Oligonukleotide (Oligos) des GeneChip® erfolgte durch Inkubation des Array mit 10 µg fragmentierter cRNA in 200 µl Hybridisierungspuffer (siehe Anhang A.6.11) unter Rotation im Affymetrix™ Hybridization Oven bei 45°C für 17 h und 60 U/min. Der Hybridisierungscocktail enthielt zusätzlich Kontroll-Oligonukleotide des *Eukariotic Hybridization Control Kit* bestehend aus Oligo B2, Bio B, Bio C und Bio D. Oligo B2 hybridisiert am Rand und kreuzförmig im Zentrum des GeneChip®, diese Markierungen dienen zur Positionierung eines Gitters für die Orientierung bei der Auswertung. Die Kontroll-Oligonukleotide Bio B, Bio C und Bio D dienen zur Überprüfung von Linearität und Sensitivität der Hybridisierung. Zur Kontrolle der RNA-Qualität während der vorangegangenen Reaktionen (reverse Transkription, IVT) wurden bereits zu Beginn der RNA-Aufarbeitung zur RNA-Lösung poly-A-RNA-Kontrollen (*GeneChip® Eukaryotic poly-A RNA Control Kit*) zugesetzt. Darüber hinaus wurden einige Probesets des Array, die verschiedene Haushaltsgene repräsentieren, bei der späteren Auswertung der Daten ebenfalls zur Kontrolle verwendet.

Nach der Hybridisierung wurden die Arrays in der Affymetrix™ Fluidics Station computergesteuert mit stringentem und nicht-stringentem Puffer gewaschen und mit der Färbelösung inkubiert (Waschpuffer siehe Anhang A.6.12). Dazu wurde der Hybridisierungs-Cocktail entfernt, die Arrays wurden mit nicht-stringentem Puffer befüllt und in die Affymetrix™ Fluidics Station eingesetzt. Im ersten Schritt wurden die Arrays mit Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) inkubiert. R-Phycoerythrin ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei 488 nm im GeneChip® Scanner 3000 7G zur Fluoreszenz angeregt wird und bei 532 nm fluoresziert. SAPE bindet an die biotinylierten Nukleotide der cRNA in einem festem Bindungsverhältnis und markiert

so die hybridisierten cRNA-Fragmente. Nach Entfernen der SAPE-Lösung und Waschen der Arrays wurde mit biotinyliertem anti-Streptavidin inkubiert. Danach erfolgte eine zweite Inkubation mit SAPE, um eine Verstärkung der Fluoreszenzsignale zu erreichen. Zum Schluss wurde der GeneChip® noch einmal gewaschen und mit nicht-stringentem Waschpuffer befüllt.

2.7.2 Mouse Genome 430 2.0 Array

Der verwendete murine GeneChip® 430 2.0 Array der Firma Affymetrix™ repräsentiert 45.101 verschiedene cDNA-Sequenzen, das entspricht etwa 30.000 Genen. Die 25 Basenpaare langen Oligos sind auf eine Glasoberfläche mittels Fotolithografie aufgebracht und können eingesehen werden unter <http://www.Affymetrix.com/analysis/index.affx>.

Etwa 10^7 Kopien jedes Oligos wurden auf einer Fläche von $11 \times 11 \mu\text{m}^2$ (*Feature*) auf die Chipmatrix synthetisiert, welche exakt einer cDNA-Sequenz (*Perfect Match*) entsprechen. Direkt neben jedem *Perfect Match-Feature* befindet sich ein so genanntes *Miss Match-Feature*, bei dem die Oligos einen Basenaustausch an Position 13 besitzen, wodurch unspezifische Hybridisierungen selektiert werden. Jede cDNA ist durch 11 solcher *Perfect Match-Miss Match-Kombinationen* (*Feature Pairs* bzw. *Probe Pairs*) repräsentiert (Abb. 5). Diese 11 *Feature Pairs* sind willkürlich über den Chip verteilt und stehen für ein Probeset, wodurch auch bei teils fehlerhafter Chipfläche (z. B. Kratzer) eine Auswertung möglich ist. Viele cDNA-Sequenzen sind durch mehr als ein Probeset auf dem Array vertreten.

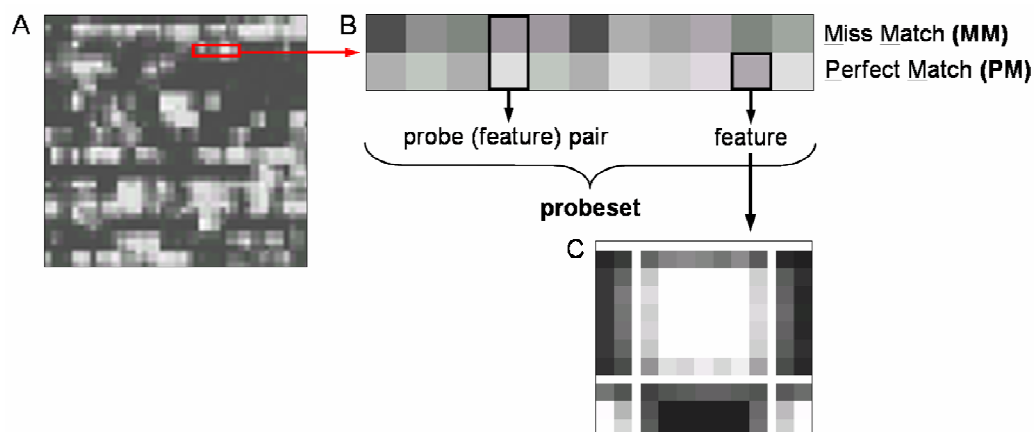


Abb. 5: Erläuterung wichtiger Begriffe für die Auswertung eines Affymetrix™ GeneChip®.

Bild A zeigt ein Schwarz-Weiß-Bild eines Array (*CEL-Datei). In Bild B ist ein Ausschnitt des Array vergrößert dargestellt (roter Rahmen). Jedes Probeset besteht aus 22 *Features* bzw. 11 *Probe Pairs* (*Feature Pairs*), die willkürlich auf dem gesamten Chip verteilt sind. Zum besseren Verständnis sind diese hier in einer Reihe dargestellt. Jedem *Perfect Match-Feature* ist ein *Miss Match-Feature* mit einem Nukleotid-Austausch an Position 13 zugeordnet, dadurch können unspezifische Hybridisierungen detektiert werden. Jedes *Feature* ($11 \times 11 \mu\text{m}^2$) besteht aus 7×7 Pixeln (Bild C), wobei der Mittelwert der Fluoreszenzintensität nur von den zentralen 25 Pixeln ermittelt wird ohne Berücksichtigung der Randbereiche, die an andere *Features* grenzen, da es dort zu Überlagerungs- oder Überstrahlungseffekten durch die angrenzenden Pixel kommt (Bild C).

2.7.3 Scannen und Auswertung des GeneChip®

Im folgenden werden Begriffe erläutert, die zum Verständnis der Datenauswertung dienen. Es wurden teilweise die englischen Originalbezeichnungen beibehalten, um Ungenauigkeiten bei der Übersetzung zu vermeiden. Während des Scannens fährt der Laser Pixel für Pixel ($1,56 \mu\text{m}/\text{Pixel}$) den Chip ab (jedes *Feature* besteht aus 7×7 Pixeln bzw. $11 \times 11 \mu\text{m}^2$, Abb. 5C) und speichert das Fluoreszenzsignal jedes Bereiches in einer Datenmatrix, der *DAT-Datei. Da es in den Grenzbereichen der *Features* zu

Überstrahlungs- und Überlagerungseffekten kommen kann, werden diese Bereiche bei der internen Berechnung der Signalintensitäten nicht berücksichtigt, es wird ein Mittelwert der Fluoreszenzintensität für die zentralen 5 x 5 Pixel berechnet und als *CEL-Datei gespeichert. Die *CEL-Datei kann auch als Graustufen-Bild dargestellt werden (Abb. 5A), bei dem jeder Pixel des Gesamtbildes einem *feature* entspricht, dessen Helligkeitswert die Signalstärke darstellt. Jedoch werden die Abstufungen der Signalintensitätsunterschiede von 65.000 auf 256 Graustufen reduziert, weil mehr Abstufungen vom Monitor nicht dargestellt werden können. Für jeden Signalwert bzw. jedes Probeset wird ein p-Wert (*detection p-value*) ermittelt, anhand dieses p-Wertes wird der *call* für jedes Probeset ermittelt: $p \leq 0,05 = present$; $> 0,05$ und $< 0,065 = marginal$; $> 0,065 = absent$. Für die Vergleichbarkeit der Daten verschiedener Arrays wird eine Skalierung auf einen Zielwert von 500 vorgenommen. Dazu wird der Mittelwert aller Signalintensitäten ermittelt, jedoch ohne die schwächsten und stärksten Signalwerte (je 2 %). Der Zielwert von 500 wird durch den Mittelwert dividiert, daraus ergibt sich der Skalierungsfaktor, mit dem alle Signalwerte multipliziert werden. Die Daten werden dann als *CHP-Datei gespeichert. Diese Rohdatentabelle enthält für alle 45.101 Probesets einen skalierten Signalwert, einen p-Wert und einen *call*. Alle oben genannten Berechnungen werden von der *Gene Chip Analysis-Software* (GCOS 1.1) von Affymetrix™ automatisch vorgenommen, wobei bestimmte Parameter auch manuell veränderbar sind. Für die weitere Auswertung der Microarraydaten der Aorta der WT- und ApoE^{-/-}-Mäuse wurde das Statistikpaket R (R project 2006) mit Bioconductor (Robert, Vincent et al. 2004) verwendet. Als erstes wurden die Signalwerte aller Arrays logarithmiert und es wurde eine Vorfilterung der Daten mit verschiedenen Parametern durchgeführt: Probesets, die in mindestens einer der beiden Gruppen (WT, ApoE^{-/-}) bei zwei von drei Arrays einen p-Wert $\leq 0,05$ sowie einen Signalwert ≥ 200 hatten, wurden ausgewählt. Für die selektierten Probesets wurde der Mittelwert der logarithmierten Werte innerhalb der WT- bzw. ApoE^{-/-}-Gruppe ermittelt und ein *Fold Change* von $\log_2(2,5)$ festgelegt. Durch den *Fold Change* wurden alle Probesets gefiltert, deren Signal-Verhältnis zwischen WT- und ApoE^{-/-}-Arten größer bzw. gleich 2,5 war. Für die Selektion signifikant regulierter Gene wurde mit den verbliebenen Probesets ein ungepaarter t-Test ($p \leq 0,05$) mit einer Korrektur für Mehrfachtestung nach Benjamini und Hochberg (Benjamini and Hochberg 1995) durchgeführt.

2.8 Histologische Färbungen

2.8.1 Hämatoxylin-Färbung

Für die Ermittlung der Gesamtzellzahl in Dünnschnitten der A. carotis wurden diese der Kernfärbung mit Hämatoxylin unterzogen. Die Objektträger mit den luftgetrockneten Schnitten der formalin-fixierten Karotisarterien wurden mit destilliertem Wasser gespült und die Schnitte für 5 min in einer feuchten Kammer mit Hämatoxylin bedeckt. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in Leitungswasser für 10 min gebläut und mit wässrigem *Mounting Medium for AEC* eingedeckt.

2.8.2 Orcein-Hämatoxylin-Färbung

Mittels Orcein-Färbung werden elastische Fasern sichtbar gemacht, die lichtmikroskopisch violett erscheinen. Die Objektträger mit den luftgetrockneten Schnitten der formalin-fixierten Karotisarterien wurden mit destilliertem Wasser gespült, kurz in 96 %-igem Ethanol geschwenkt und für 30 min in die Orcein-Lösung (1 g/ml Orcein, 0,7 mM Salzsäure, in 70 %-igem Ethanol) gestellt und danach mit Leitungswasser

gespült. Anschließend wurden die Schnitte 3 min mit Hämatoxylin in einer feuchten Kammer bedeckt, kurz mit Leitungswasser gespült, für 10 min in Leitungswasser gebläut und mit wässrigem *Mounting Medium for AEC* eingedeckt.

2.8.3 Ölrot O-Hämatoxylin-Färbung

Die Ölrotfärbung dient zur Darstellung von eingelagerten Fetten (Lipidtröpfchen) in Zellen und Geweben. Die Objektträger mit den luftgetrockneten Schnitten der formalin-fixierten Karotisarterien wurden für 5 min in 60 %-igem 2-Propanol fixiert und dann für 10 min in die Ölrot O-Färbelösung (0,33 g/ml Ölrot O, 60 % 2-Propanol in destilliertem Wasser) in eine Küvette gestellt. Die Schnitte wurden für 20 s in 60 %-igem 2-Propanol differenziert, mit Leitungswasser gewaschen und für 3 min mit Hämatoxylin bedeckt. Nach kurzem Spülen mit Leitungswasser wurden die Schnitte für 10 min in Leitungswasser gebläut und mit wässrigem *Mounting Medium for AEC* eingedeckt.

2.9 Immunhistochemische Markierungen

Das Prinzip der Färbungen beruht auf der Bindung eines spezifischen Antikörpers an die Substanz, gegen die er gerichtet ist. Dies können Teile von Proteinen oder Peptide sein, jedoch können auch Antikörper gegen niedermolekulare Stoffe generiert werden; dazu müssen diese an einen Träger (Hapten) gekoppelt sein. Zum Sichtbarmachen bzw. Verstärken der Markierung wird ein sekundärer Antikörper eingesetzt, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und zusätzlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Immunfluoreszenz) oder einem Enzym zur Katalyse einer Farbreaktion (Immunhistochemie) gekoppelt ist. Eine Ausnahme bildete der verwendete Antikörper gegen das α -Aktin der glatten Gefäßmuskelzellen. Dieser primäre Antikörper war bereits mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Eine Liste aller verwendeten Antikörper befindet sich im Anhang unter A.7.

2.9.1 Immunhistochemie

Die bei -80°C gelagerten Objektträger mit den Schnitten der A. carotis wurden sofort nach Entnahme zur Trocknung für ca. 5 min auf eine Präzisionsheizplatte mit einer Temperatur von 32°C gelegt. Im Anschluss wurden die Schnitte für 10 min in Aceton fixiert und mindestens 30 min luftgetrocknet. Zur Rehydrierung der Schnitte wurden diese 10 min in PBS-Puffer in eine Küvette gestellt und 10 min mit Streptavidin-Lösung in der feuchten Kammer inkubiert, dann wurde mit PBS-Puffer gespült. Nach 10 min Inkubation mit Biotin-Lösung wurde erneut mit PBS-Puffer gespült und die Schnitte wurden mit dem primären Antikörper in PBS-Puffer mit 0,25 % BSA-c und 5 % Kaninchen-Normalserum in der feuchten Kammer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Antikörperlösung und Spülen mit PBS-Puffer wurden die Schnitte für 30 min mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung in PBS-Puffer mit 0,25 % BSA-c) inkubiert und danach mit TBS-Puffer (siehe Anhang A.5.4) gewaschen und mit ABA(mouse)-Komplex (1:100 Streptavidin und *Biotinylated Horseradish Peroxidase* in TBS-Puffer) in der feuchten Kammer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf Spülen mit TBS-Puffer folgte eine 5-minütige Inkubation mit alkalischem Phosphatasemedium (zu gleichen Teilen *Fuchsin Chromogen* und *Fuchsin Activating Agent* sowie *Fuchsin Buffered Substrate* nach Vorschrift und 3 % einer 5 mM Levamisole-Lösung). Anschließend wurden die Schnitte zuerst mit TBS-Puffer, dann mit Leitungswasser gewaschen, für 3 min mit Hämatoxylin bedeckt, kurz mit Leitungswasser gespült und 10 min in Leitungswasser gebläut und abschließend mit wässrigem *Mounting Medium for AEC* eingedeckt.

2.9.2 Immunfluoreszenz

Durch Immunfluoreszenz ist es möglich, bis zu 4 Antikörper bzw. 3 Antikörper und die Kernfärbung der Zellen miteinander zu kombinieren, da die an die Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe bei unterschiedlichen Wellenlängen (364 nm, 488 nm, 543 nm und 633 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden und so eine gleichzeitige Betrachtung möglich wird.

Die bei -80°C gelagerten Objektträger mit den Schnitten der A. carotis wurden sofort nach Entnahme zur Trocknung für ca. 5 min auf eine Präzisionsheizplatte bei einer Temperatur von 32°C gelegt. Im Anschluss wurden diese für 10 min in Aceton fixiert und mindestens 30 min luftgetrocknet. Zur Rehydrierung wurden die Schnitte 10 min in PBS-Puffer gestellt und mit dem oder den primären Antikörper(n) in PBS-Puffer mit 0,25 % BSA-c und 5 % Kaninchen-Normalserum in der feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden mit PBS-Puffer gewaschen, 30 min mit dem/n fluoreszenzmarkiertem/n sekundären Antikörper(n) (Verdünnung in PBS-Puffer mit 0,25 % BSA-c) in der feuchten Kammer inkubiert und gleichzeitig wurde die Kernfärbung mit 4',6-Diaminidin-2-Phenylindol (DAPI) (0,003 mM in absolutem Ethanol) durchgeführt durch Zugabe von $1\ \mu\text{l}$ der ethanolischen Lösung je ml Inkubationsmedium. Nach dem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Schnitte mit Fluoromount-G eingedeckt. Die letzten Arbeitsschritte ab Inkubation mit dem(n) sekundären Antikörper(n) wurden unter Vermeidung von Lichteinfall durchgeführt, um ein Ausbleichen der Schnitte zu verhindern.

2.9.3 5-Brom-2'-desoxy-uridin (BrdU)-Markierung

Für die Markierung von proliferierenden Zellen mit BrdU wurde den Mäusen 24 und 4 h vor dem Töten BrdU in der Dosierung von 180 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 300 μl physiologischer Kochsalzlösung, intraperitoneal injiziert. *Mit dem 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II* von Roche Diagnostics GmbH wurden die luftgetrockneten Schnitte der formalin-fixierten Karotisarterien entsprechend der Arbeitsvorschrift gefärbt. Dazu wurden diese in PBS-Puffer rehydriert, mit der primären Antikörperlösung bedeckt und 30 min bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach Waschen mit PBS-Puffer wurden die Schnitte mit der sekundären Antikörperlösung bedeckt, 30 min bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert und danach wieder mit PBS-Puffer gewaschen. Einem weiteren Waschschrift in ASB-Puffer (siehe Anhang A.6.5.) folgte die Überschichtung der Schnitte mit der Farbsubstratlösung für 10 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Im Anschluss wurden die Schnitte in PBS-Puffer und danach in destilliertem Wasser gewaschen und mit wässrigem *Mounting Medium for AEC* eingedeckt.

2.10 Auswertung der morphologischen Untersuchungen

2.10.1 Auswertung der Hämatoxylin- und BrdU-gefärbten Schnitte

An Schnitten der A. carotis wurde die Anzahl der hämatoxylin-gefärbten bzw. der BrdU-markierten Zellen in den verschiedenen Gefäßschichten (Intima, Media und Adventitia) am Lichtmikroskop Axiolab drb KT mit dem 40-iger Objektiv ermittelt. Aus den Werten der beiden Zählungen wurde der Proliferationsindex (PI) wie folgt berechnet: $\text{PI} = \text{Anzahl BrdU-positiver Zellen} \times 100 / \text{Gesamtzellzahl (Hämatoxylin-Färbung)}$.

2.10.2 Morphometrische Analyse der Orcein-Schnitte

Die für die Morphometrie bestimmten Gefäßschnitte der A. carotis wurden am konfokalen Laser Scanning Mikroskop Axiovert 200 M mit dem 10-er Objektiv aufgenommen und mit Hilfe der Leica 500/W Software (Leica Microsystems, Wetzlar/Deutschland) vermessen. An jedem Schnitt wurde die maximale Dicke der Media erfasst sowie die Mediadicke an 3 weiteren Messpunkten, die jeweils im Winkel von 90° zur vorhergehenden Messung angeordnet waren. Zur Messung der Fläche des Gefäßlumens wurde das Gefäß entlang der *Lamina elastica interna* umfahren. Die Fläche, die von der *Lamina elastica externa* begrenzt wird, wurde ebenfalls bestimmt. Die Differenz der beiden gemessenen Flächen ergibt die Fläche der *Lamina media*. Die Umfänge der beiden gemessenen Flächen entsprechen der Länge der *Lamina elastica interna* bzw. *externa*.

2.10.3 Auswertung der Immunfluoreszenzmarkierungen

Zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurde das konfokale Laser Scanning-Mikroskop Axiovert 200 M mit dem LSM 510 verwendet. Dieses ist mit vier verschiedenen Lasern (364 nm, 488 nm, 543 nm und 633 nm Wellenlänge) sowie einer Halogenlampe und entsprechenden Lichtfiltern ausgestattet. DAPI, das Zellkerne darstellt, wird bei 364 nm angeregt, fluoresziert bei 488 nm und erscheint blau. Cy2-markierte Antikörper werden bei 488 nm angeregt, fluoreszieren bei 508 nm und erscheinen somit grün. Cy3-markierte Antikörper werden bei 543 nm angeregt, fluoreszieren bei 570 nm und erscheinen rot. Cy5-markierte Antikörper werden bei 633 nm angeregt und fluoreszieren bei 674 nm. Da diese Fluoreszenz im dunkelroten Bereich liegt, ist sie mit bloßem Auge fast nicht sichtbar und konnte deshalb erst nach dem Scannen des Objektes anhand des entstandenen Bildes ausgewertet werden.

2.11 Statistik

Statistische Analysen wurden durch den zweiseitigen ungepaarten t-Test nach Student mit Hilfe von Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond/USA) durchgeführt. Bei zwei voneinander abhängigen Datensätzen wurde der zweiseitige gepaarte t-Test nach Student mit Microsoft Excel durchgeführt und zusätzlich mit dem Wilcoxon-Paartest überprüft. Für Stichprobenumfänge (n) ≥ 3 wurde der Mann-Witney-Test (U-Test) verwendet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ bzw. $\leq 0,1$ bei $n = 3$ wurde als statistisch signifikant definiert, da bei $n = 3$ in mindestens einer der zu untersuchenden Gruppen bei zweiseitigem U-Test keine Aussage für $p \leq 0,05$ getroffen werden kann. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Bei Abweichung von diesem Verfahren wird im Text darauf hingewiesen.

3 Ergebnisse

Arteriell Remodeling findet sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen statt und ist insbesondere bei den mit der Atherosklerose assoziierten Gefäßveränderungen von Bedeutung, wobei sowohl das expansive, mit einer Zunahme des Gefäßlumens, als auch das konstriktive, mit einer Abnahme des Gefäßlumens einhergehende Remodeling beobachtet werden kann. Atherosklerose und arterielles Remodeling sind verbunden mit morphologischen Veränderungen der Gefäßwand; hierbei stehen das Auftreten inflammatorischer Zellen wie Makrophagen und T-Zellen, aber auch glatter Muskelzellen oder Fibroblasten sowie die Produktion inflammatorischer Zytokine im Vordergrund (Bentzon, Pasterkamp et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden zur Aufklärung möglicher Pathomechanismen der Atherosklerose und des arteriellen Remodelings an der Maus Prozesse eines experimentell induzierten arteriellen Remodelings in der A. carotis und die Atherosklerose in der Aorta einschließlich der Expression ausgewählter Gene untersucht.

3.1 Untersuchungen zum arteriellen Remodeling an der A. carotis der Maus

Die Untersuchungen zum arteriellen Remodeling nach mechanischer, intraluminaler Gefäßwandschädigung wurden an WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Für die Versuche wurden Tiere im Alter von 32 Wochen verwendet. Auf der Basis von Literaturdaten (Cheung, D'Andrea et al. 1999; Harada, Komuro et al. 1999) wurden jeweils 5 Tage (Nachweis proliferierender Zellen) und 14 Tage (Zellproliferation abgeschlossen) nach der Schädigung molekulare, histologische, immunhistologische und morphometrische Analysen an der A. carotis communis von geschädigten und nichtgeschädigten bzw. scheinoperierten Gefäßen der jeweils gleichen Tiere durchgeführt. Molekulare Untersuchungen der Gefäße erfolgten zusätzlich 24 Stunden und 3 Tage nach der Schädigung.

3.1.1 Etablierung des tierexperimentellen Modells einer mechanischen Endothelschädigung

Zur Untersuchung von Veränderungen der Gefäßwand im Sinne eines arteriellen Remodelings wurde ein tierexperimentelles Modell etabliert, das auf einer intraluminalen Gefäßwandschädigung der A. carotis communis der Maus beruht (siehe 2.3.1). Bei ca. 2 % aller Versuchstiere traten nach der intraluminalen Gefäßwandschädigung thrombotische Verschlüsse auf, die die Durchblutung der A. carotis teilweise oder vollständig blockierten. Beim makroskopischen Nachweis eines Thrombus während der Präparation oder im Verlauf der histologischen Aufarbeitung des Gefäßes wurden diese Gefäße nicht in die weiteren Auswertungen einbezogen.

3.1.1.1 Nachweis der Schädigung des Gefäßendothels

Die mechanisch induzierte Deendothelialisierung der A. carotis communis wurde sowohl *in vivo* am Ganztier durch Färbung mit Evans Blau als auch *ex vivo* an Gefäßschnitten mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen.

a) Intravenöse Injektion von Evans Blau-Lösung

Um nachzuweisen, dass das Endothel durch das Einführen des Drahtes und nicht durch die Manipulation am Gefäß während der Präparation geschädigt wird, wurde WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Eingriff eine Evans Blau-Lösung injiziert. Evans Blau ist ein ungiftiger Farbstoff, der in Interzellularräume eindringt, wenn die epitheliale oder endotheliale Barriere geschädigt bzw.

zerstört ist. Intakte Gewebe mit funktionierender zellulärer Barriere können nicht durchdrungen werden, das Gewebe wird folglich nicht gefärbt. Der narkotisierten Maus wurde über die Schwanzvene Evans Blau injiziert und im Anschluss der Aortenbogen mit den abgehenden Gefäßen einschließlich intakter A. carotis communis sinistra und dextra nach Fixierung mit Formalin herauspräpariert (siehe 2.3.2). Abbildung 6 zeigt ein entsprechendes Präparat 4 und 14 Tage nach der Endothelschädigung. Nach 4 Tagen war das Gewebe im geschädigten Abschnitt der linken A. carotis deutlich dunkelblau gefärbt, während eine Färbung des rechten, ungeschädigten bzw. scheinoperierten Gefäßes sowie des Aortenbogens nicht festgestellt werden konnte (Abb. 6A). 14 Tage nach dem Eingriff wurde keine Färbung des Präparates mehr beobachtet, was auf eine vollständige Reendothelialisierung des geschädigten Gefäßes deutet (Abb. 6B).

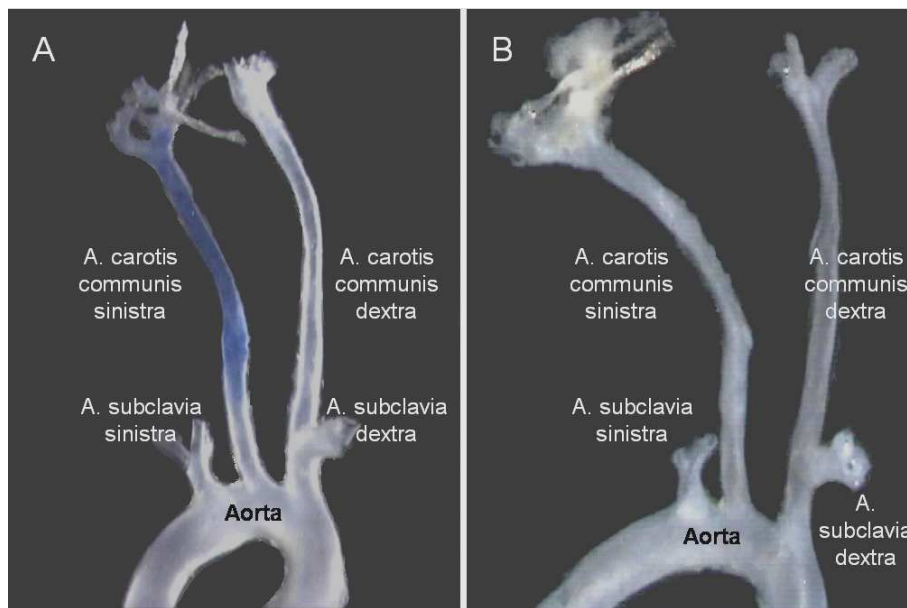


Abb. 6: Ex vivo-Präparate des Aortenbogens von WT-Mäusen nach Färbung mit Evans Blau.

Die Präparate zeigen den isolierten Aortenbogen mit den abgehenden Gefäßen A. subclavia sinistra, A. carotis communis sinistra (geschädigtes Gefäß) und A. innominata (Truncus brachiocephalicus), aus der die A. carotis communis dextra (nichtgeschädigtes Gefäß, Kontrolle) und die A. subclavia dextra hervorgehen. In Bild A wurde Evans Blau-Lösung 4 Tage nach der Gefäßwandschädigung injiziert. Die deutliche Blaufärbung der A. carotis communis sinistra zeigt die Schädigung bzw. Entfernung des Endothels. Bild B zeigt die Evans Blau-Färbung 14 Tage nach der Endothelschädigung. Zwischen dem Aortenbogen und den abgehenden Gefäßen ist kein Unterschied mehr erkennbar.

b) Histologische Untersuchung von Gefäßschnitten mittels Immunfluoreszenz

Histologische Schnitte von geschädigten und nichtgeschädigten Gefäßen wurden 5 bzw. 14 Tage nach der intraluminalen Endothelschädigung mittels Immunfluoreszenz untersucht. Als endothelzell-spezifischer Marker wurde von Willebrand Faktor verwendet. Während in den scheinoperierten Gefäßen eine intakte Endothelzellschicht vorhanden war (Abb. 7A und C), waren in den geschädigten Karotisarterien nach 5 Tagen nur noch wenige Endothelzellen bzw. Endothelzellreste nachweisbar (Abb. 7B). Nach 14 Tagen war eine vollständige Reendothelialisierung des geschädigten Gefäßes erfolgt; die endothelzell-spezifische Markierung mit von Willebrand Faktor zeigte eine vollständige Auskleidung des Gefäßlumens (Abb. 7D) wie in den scheinoperierten Kontrollgefäßen (Abb. 7A und C). Die De- bzw. Reendothelialisierung im geschädigten Gefäßabschnitt erfolgte nicht homogen, die immunhistologische Auswertung mehrerer Dünnschnitte der jeweils gleichen geschädigten Gefäße nach Markierung der

Endothelzellen mit von Willebrand Faktor ergab, dass in einzelnen Gefäßabschnitten nach 5 Tagen bereits eine nahezu intakte Endothelzellschicht nachweisbar war, während nach 14 Tagen in einzelnen Schnitten ein fast vollständiges Fehlen des Endothels beobachtet wurde (nicht gezeigt).

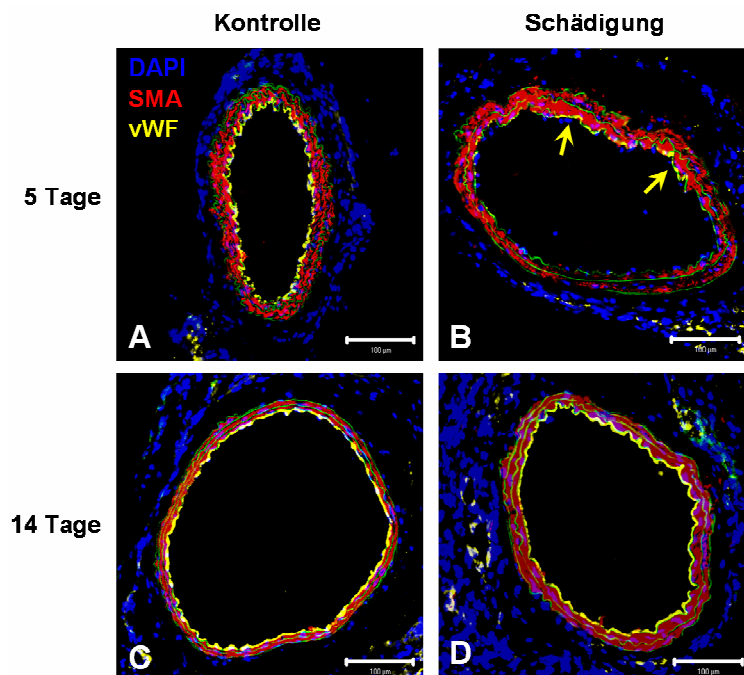


Abb. 7: Nachweis der De- und Reendothelialisierung in der geschädigten A. carotis communis sinistra einer WT-Maus 5 bzw. 14 Tage nach der Schädigung.

Die Abbildung zeigt repräsentative Dünnschnitte der A. carotis communis 5 und 14 Tage nach intraluminaler Endothelschädigung mit den zugehörigen Kontrollgefäßen. Blau dargestellt sind die Zellkerne (DAPI), rot die glatten Muskelzellen (*smooth muscle actin*, SMA), gelb das Gefäßendothel (von Willebrand Faktor, vWF) und grün die elastischen Fasern der *Lamina media* (Eigenfluoreszenz). In den scheinoperierten Gefäßen (Bild A und C) ist eine intakte Endothelzellschicht vorhanden, während 5 Tage nach der Schädigung nur Endothelzellreste nachweisbar waren (Bild B, gelbe Pfeile). 14 Tage nach der Schädigung ist die Reendothelialisierung der A. carotis communis erfolgt (Bild D), die vWF-Markierung ist ähnlich derjenigen in den Kontrollen (A und C).

Balken = 100 µm

3.1.1.2 *In vivo*-Nachweis proliferierender Zellen durch Markierung mit BrdU

Die durch die Schädigung der Gefäßwand induzierte Zellproliferation wurde nach Markierung der DNA mit BrdU gemessen. BrdU, das während der Zellteilung anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird, wurde den Tieren intraperitoneal injiziert (siehe 2.9.3). Als Parameter zur Einschätzung der Zellproliferation wurde der Proliferationsindex bestimmt (siehe 2.10.1), wobei jeweils benachbarte Schnitte der Gefäße zur Ermittlung der Gesamtzellzahl (Färbung der Zellkerne mit Hämatoxylin, siehe 2.8.1) und der Anzahl proliferierender Zellen (immunhistochemischer Nachweis des BrdU-Einbaus, siehe 2.9.3) verwendet wurden. Es wurden pro Gefäß jeweils 6 Schnitte in einem definierten Abstand von 600 µm ausgezählt (siehe 2.3.3).

In der A. carotis communis von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen wurde 5 Tage nach Schädigung der Gefäßwand und dadurch bedingter Deendothelialisierung ein signifikanter Anstieg der Zellproliferation in der *Lamina media* nachgewiesen. In nichtgeschädigten, scheinoperierten Arterien der gleichen Tiere wurden hingegen nur vereinzelt BrdU-positive Zellen beobachtet (Abb. 8). Das operative Vorgehen während der Präparation der A. carotis communis verursachte demzufolge keine Proliferation der Zellen, dieser Effekt war Folge der intraluminalen Endothelschädigung. Zwischen WT- und ApoE^{-/-}-Tieren gab es keine

Unterschiede in der Anzahl der proliferierenden Zellen in den geschädigten Gefäßen (Abb. 8). Nach 14 Tagen konnten in den geschädigten Gefäßen ebenso wie in den Kontrollgefäßen nur noch vereinzelte proliferierende, BrdU-positive Zellen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

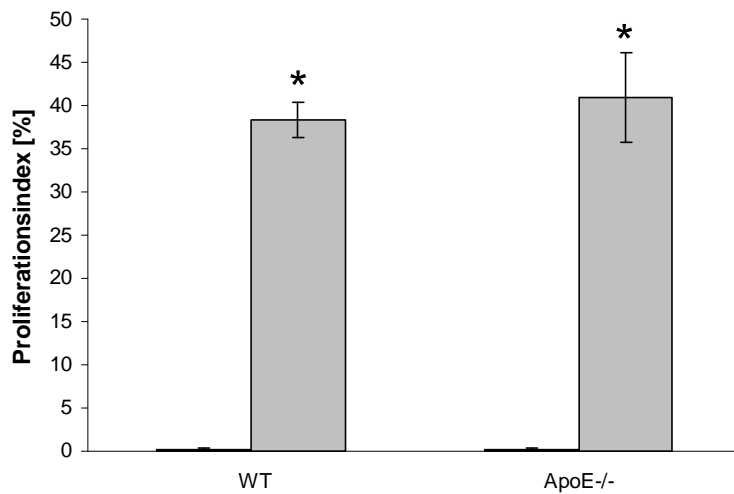


Abb. 8: Messung der Zellproliferation in der *Lamina media* geschädigter und nichtgeschädigter Karotisarterien von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen.

Die Abbildung zeigt die Proliferationsindices als Maß für die Zellproliferation (siehe 2.10.1), diese wurden in beiden Mauspopulationen jeweils 5 Tage nach intraluminaler Gefäßwandschädigung ermittelt. Sowohl bei WT- als auch bei ApoE^{-/-}-Mäusen war die Zellproliferation in den geschädigten Gefäßen (graue Säulen) signifikant größer als in den nichtgeschädigten, scheinoperierten Arterien (schwarze Säulen).

Mittelwerte \pm SEM; n = 7 (WT) und 5 (ApoE^{-/-})

* p < 0,0001 Schädigung vs. Kontrolle

3.1.2 Morphometrische Analyse von Gefäßschnitten der A. carotis

Zur Feststellung des arteriellen Remodelings, das durch eine Zu- oder Abnahme von Gefäßgröße bzw. -querschnitt charakterisiert ist (Ward, Pasterkamp et al. 2000), wurden Gefäßschnitte der A. carotis communis morphometrisch ausgewertet. Pro Gefäß wurden jeweils 6 Schnitte in einem definierten Abstand von 600 μ m vermessen (siehe 2.3.3 und 2.10.2) und folgende Parameter bestimmt: Gesamtfläche, Lumenfläche, Mediafläche, Länge der Membrana elastica interna (*internal elastic lamina*, IEL) und externa (EEL) sowie die Mediadicke. Die morphometrischen Daten wurden jeweils 5 und 14 Tage nach der Endothelschädigung an geschädigten und nichtgeschädigten Gefäßen ermittelt. Vergleichsdaten wurden auch an unbehandelten Tieren erhoben. Die morphometrische Untersuchung der Gefäße von 8 unbehandelten Tieren ergab, dass es keine messbaren Unterschiede zwischen der linken und rechten A. carotis gibt (nicht gezeigt), so dass die rechte Karotisarterie jedes Tieres als individuelles Kontrollgefäß zur Überprüfung der Gefäßveränderungen nach der Schädigung verwendet werden konnte.

3.1.2.1 Arteriell Remodeling der A. carotis der WT-Maus

Als Kriterium für die durch die Schädigung des Gefäßendothels induzierten morphologischen Veränderungen an arteriellen Gefäßen wie Aorta (Reddick, Zhang et al. 1998), A. carotis (Lindner, Fingerle et al. 1993; Kumar and Lindner 1997) oder A. femoralis (Sata, Maejima et al. 2000) wird häufig die Bildung einer Neointima und die daraus errechnete Intima/Media-Ratio verwendet. In unserem Modellsystem war die Bildung einer Neointima in der A. carotis nach intraluminaler Gefäßwandschädigung nicht zuverlässig reproduzierbar. Die Ursache könnte darin liegen, dass der atherosklerose-susceptible C57BL/6J-Maus-

stamm nicht suszeptibel für eine Neointimabildung nach endothelialer Schädigung der A. carotis ist (Harmon, Couper et al. 2000; Kuhel, Zhu et al. 2002; Korshunov and Berk 2004). Die Untersuchungen konnten jedoch nicht an einem anderen, für Neointimabildung empfindlichen Mausstamm vorgenommen werden, da der genetische Hintergrund von WT- und ApoE^{-/-}-Tieren identisch sein musste. Aus diesem Grund haben wir unsere morphometrischen Analysen zum arteriellen Remodeling auf die Veränderungen in der *Lamina media* konzentriert.

Nach Endothelschädigung der A. carotis communis der WT-Maus war 5 Tage nach der Schädigung eine Zunahme der Mediafläche, der Mediadicke sowie der EEL-Länge im Vergleich zu den scheinoperierten Gefäßen der gleichen Tiere messbar (Abb. 9). Dieses „Anschwellen“ der Media als akute Reaktion auf die Gefäßschädigung verbunden mit einer signifikanten Abnahme der Zelldichte in der *Lamina media* (nicht gezeigt) wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (Drew, Tucker et al. 2000). Nach 14 Tagen wurde für alle gemessenen morphometrischen Parameter (Gefäßlumen, Mediafläche, maximale Mediadicke, EEL- und IEL-Länge) eine signifikante Zunahme beobachtet (Abb. 9). Die ermittelten morphometrischen Parameter weisen auf ein arterielles Remodeling in der A. carotis von WT-Mäusen nach Endothelschädigung, da sich aus der Vergrößerung des Lumens und der Mediafläche sowie der beide Flächen begrenzenden Umfänge (EEL und IEL) eine Vergrößerung des gesamten Gefäßquerschnitts ableiten lässt, was den Kriterien eines positiven arteriellen Remodelings entspricht.

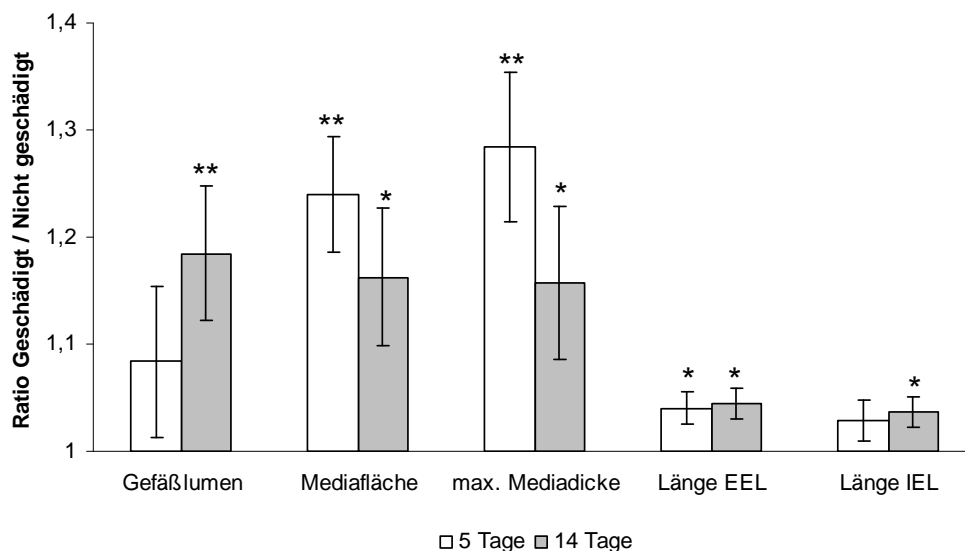


Abb. 9: Morphometrische Parameter des arteriellen Remodelings der A. carotis communis von WT-Mäusen 5 bzw. 14 Tage nach intraluminaler Schädigung der Gefäßwand.

Die Abbildung zeigt die ermittelten morphometrischen Daten von Gefäßlumen, Mediafläche, maximaler Mediadicke, Länge der Membrana elastica externa (EEL) sowie interna (IEL) als Quotient geschädigtes/ungeschädigtes Gefäß. Werte > 1 bedeuten eine Zunahme, Werte < 1 eine Abnahme des jeweiligen Parameters im geschädigten Gefäß. 5 Tage nach der Schädigung nahmen Mediafläche, Mediadicke und EEL-Länge signifikant zu; nach 14 Tagen war für alle ermittelten morphometrischen Parameter eine signifikante Zunahme nachweisbar.

Mittelwerte ± SEM; n = 13 (5 Tage) und 12 (14 Tage)

* p < 0,05; ** p < 0,005 Schädigung vs. Kontrolle

3.1.2.2 Arteriell Remodeling der A. carotis der ApoE^{-/-}-Maus

Ähnlich wie bei WT-Mäusen konnte die Bildung einer Neointima auch bei ApoE^{-/-}-Mäusen nur in Einzelfällen beobachtet werden. Bei einem Teil der untersuchten Tiere wurden jedoch 14 Tage nach der Schädigung Schaumzellen in der *Lamina media* beobachtet (siehe Abbn. 14 und 15), die für die Bildung

atherosklerotischer Plaques charakteristisch sind. Während vor der Endothelschädigung in der *A. carotis communis* der 32 Wochen alten ApoE^{-/-}-Tiere makroskopisch keine atherosklerotischen Läsionen nachweisbar waren, wurden 14 Tage nach der Schädigung bei einzelnen Tieren plaque-ähnliche Läsionen mit eingelagerten Lipiden (siehe Abb. 14) in der *Lamina media* beobachtet. Lediglich am Aortenbogen und an der Bifurkation in *A. carotis interna* und *externa* waren vor der Schädigung atherosklerotische Plaques vorhanden; diese Bereiche wurden jedoch nicht in die Untersuchungen einbezogen. Während der Etablierung des Modells wurden auch Mäuse eingesetzt, die älter als 32 Wochen waren (bis zu 52 Wochen). Dabei war auffällig, dass mit zunehmendem Alter der ApoE^{-/-}-Tiere nach der Endothelschädigung gehäuft atherosklerose-ähnliche Läsionen auftraten (nicht gezeigt). Dagegen zeigte die Untersuchung von 12 Wochen alten ApoE^{-/-}-Tieren weniger starke Gefäßreaktionen in Bezug auf Mediafläche und Mediadicke im Vergleich mit den individuellen Kontrollgefäßen sowie im Vergleich mit ApoE^{-/-}-Tieren im Alter von 32 und 52 Wochen (nicht gezeigt). Möglicherweise wird bei ApoE^{-/-}-Mäusen die Gefäßreaktivität nach der Endothelschädigung durch das Alter bzw. dem Fortschreiten der Atherosklerose beeinflusst; beim Vergleich von 12 und 32 Wochen alten WT-Tieren wurden keine Unterschiede in der Gefäßmorphologie nach Endothelschädigung beobachtet (nicht gezeigt).

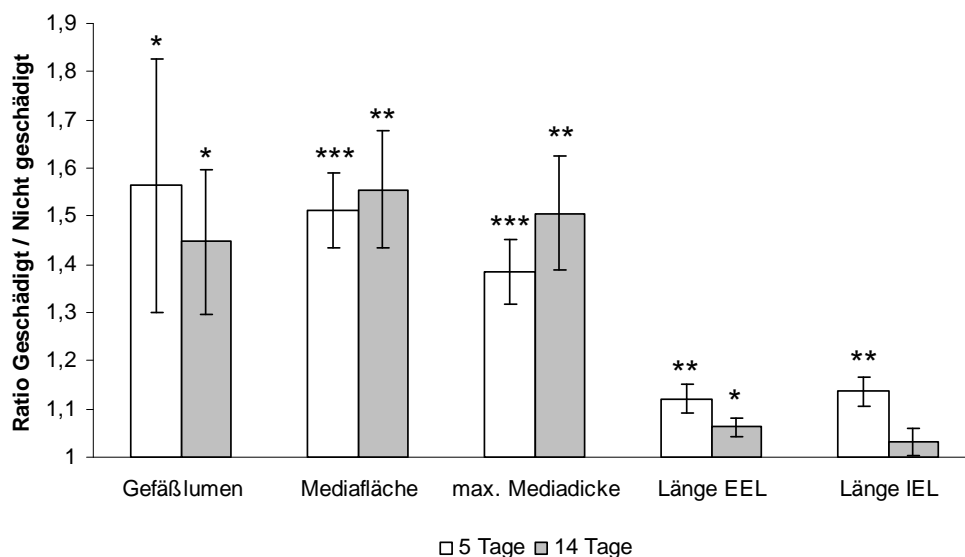


Abb. 10: Morphometrische Parameter des arteriellen Remodelings der *A. carotis communis* von ApoE^{-/-}-Mäusen 5 bzw. 14 Tage nach intraluminarer Schädigung der Gefäßwand.

Die morphometrischen Parameter Gefäßlumen, Mediafläche, maximaler Mediadicke und Länge der Membrana elastica externa (EEL) sowie interna (IEL) wurden in geschädigten und nichtgeschädigten Gefäßen ermittelt und die Messergebnisse jeweils als Quotient geschädigtes/ungeschädigtes Gefäß dargestellt. Werte > 1 bedeuten eine Zunahme, Werte < 1 eine Abnahme des jeweiligen Parameters im geschädigten Gefäß. Nach 5 Tagen waren alle morphometrischen Parameter des geschädigten Gefäßes gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Mit Ausnahme der IEL-Länge war auch 14 Tage nach der Schädigung ein signifikanter Unterschied zwischen geschädigten und nichtgeschädigten Gefäßen nachweisbar.

Mittelwerte ± SEM; n = 12 (5 Tage) und 11 (14 Tage)

* p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,0005 Schädigung vs. Kontrolle

Die 32 Wochen alten ApoE^{-/-}-Mäuse reagierten sehr stark auf die intraluminale Schädigung, was sich in den signifikanten Veränderungen der morphometrischen Parameter für das arterielle Remodeling widerspiegelt (Abb. 10). Für alle ermittelten Parameter wurde eine Erhöhung in den geschädigten Gefäßen nachgewiesen. Wie bei WT- wurden auch bei ApoE^{-/-}-Mäusen durch die Schädigung des

Gefäßendothels vaskuläre Reaktionen im Sinne eines positiven arteriellen Remodelings ausgelöst, die zu charakteristischen morphologischen Veränderungen des Gefäßes mit einer entsprechenden Größenzunahme des Gefäßquerschnittes führten (siehe Abb. 14).

3.1.3 Histologische und morphometrische Unterschiede zwischen WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen in der geschädigten A. carotis

Durch die intraluminale Schädigung der Gefäßwand der A. carotis communis konnten sowohl in WT- als auch in ApoE^{-/-}-Mäusen Veränderungen im Sinne eines positiven arteriellen Remodelings induziert werden. Die Reaktion der ApoE^{-/-}-Mäuse auf den exogenen Stimulus war stärker ausgeprägt als bei den WT-Tieren, was sich in einer größeren Veränderung der ermittelten morphometrischen Parameter beim Vergleich geschädigter mit nichtgeschädigten Gefäßen bzw. in den höheren Ratios widerspiegelt (siehe Abbn. 9 und 10). Möglicherweise liegt bei den ApoE^{-/-}-Mäusen, bedingt durch die starke Hyperlipidämie, eine erhöhte Gefäßreaktivität vor. Bei einer Reihe von Tieren durchgeführte Messungen der Cholesteroll- und Triglyzeridkonzentrationen im Serum ergaben 6- bis 10-fach erhöhte Lipidwerte bei ApoE^{-/-}- gegenüber WT-Tieren (nicht gezeigt).

Die Abbildungen 11 und 12 zeigen den Vergleich ausgewählter morphometrischer Parameter geschädigter und scheinoperierter Gefäße von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen. Sowohl in der Mediafläche (Abb. 11) als auch in der maximalen Mediadicke (Abb. 12) unterscheiden sich WT- und ApoE^{-/-}-Mäuse zu beiden untersuchten Zeitpunkten signifikant voneinander; die morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den individuellen Kontrollen waren in ApoE^{-/-}-Mäusen stärker ausgeprägt.

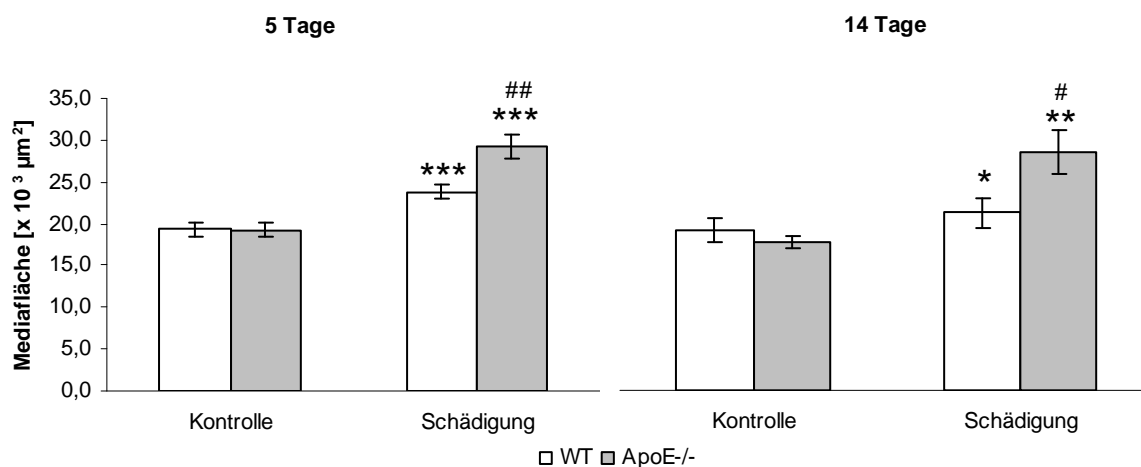


Abb. 11: Vergleich der Mediafläche geschädigter und nichtgeschädigter Gefäße von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen.

Die Abbildung zeigt die ermittelten Messwerte für die Mediafläche von scheinoperierten und geschädigten Gefäßen. Bei den scheinoperierten Karotisarterien (Kontrolle) waren zwischen WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen keine Unterschiede in der Mediafläche messbar. In den geschädigten Gefäßen der ApoE^{-/-}-Mäuse war die Mediafläche sowohl 5 als auch 14 Tage nach der Schädigung im Vergleich zu WT-Gefäßen signifikant größer.

Mittelwerte \pm SEM; n = 10 (ApoE^{-/-}, 14 Tage), n = 11 (ApoE^{-/-}, 5 Tage; WT, 14 Tage), n = 12 (WT, 5 Tage)

* p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,0005 Schädigung vs. Kontrolle

p < 0,05; ## p < 0,01 ApoE^{-/-} vs. WT

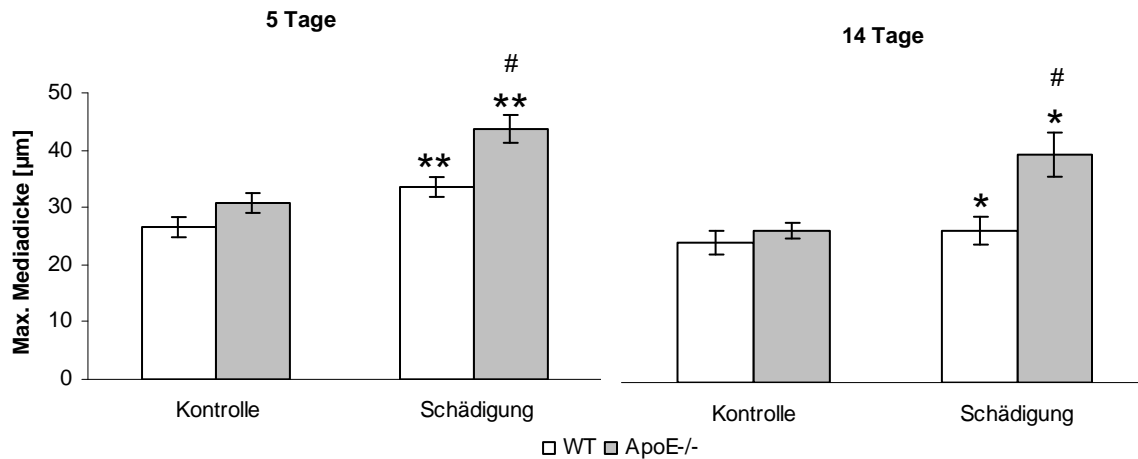


Abb. 12: Vergleich der maximalen Mediadicke geschädigter und nichtgeschädigter Gefäße von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen.

Die Abbildung zeigt die ermittelten Messwerte für die maximale Mediadicke der A. carotis von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen nach Endothelschädigung. Die nichtgeschädigten Gefäße von WT- und ApoE^{-/-}-Tieren wiesen keine Unterschiede in der maximalen Mediadicke auf. Geschädigte Gefäße von ApoE^{-/-}-Mäusen wiesen sowohl 5 als auch 14 Tage nach der Schädigung eine signifikante Zunahme der Mediadicke im Vergleich zu WT-Gefäßen auf.

Mittelwerte \pm SEM; n = 10 (ApoE^{-/-}, 14 Tage), n = 11 (ApoE^{-/-}, 5 Tage; WT, 14 Tage), n = 12 (WT, 5 Tage)

* p < 0,05; ** p < 0,005 Schädigung vs. Kontrolle

p < 0,01 ApoE^{-/-} vs. WT

Zur Unterstützung der morphometrischen Daten sind im folgenden histologische Färbungen von Dünnschnitten der A. carotis communis gezeigt (Abbn. 13 und 14). Abbildung 13 zeigt, dass in WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen zu beiden untersuchten Zeitpunkten nach der Endothelschädigung Mediadicke und -fläche gegenüber den Kontrollen vergrößert waren (Abb. 13). Die Abbildung zeigt außerdem, dass die Gefäßreaktion in den ApoE^{-/-}-Mäusen stärker ausgeprägt war und dass zwischen den scheinoperierten Gefäßen keine Unterschiede bestanden. Abbildung 14 zeigt eine Ölrot O-Hämatoxylin-Färbung eines Schnittes der scheinoperierten und der geschädigten A. carotis communis einer ApoE^{-/-}-Maus. Mit der Ölrot O-Färbung können im Gewebe eingelagerte Fette (Lipidtröpfchen) dargestellt werden. Auch in dieser Abbildung ist eine starke Zunahme der Mediadicke und -fläche als Reaktion auf die Endothelschädigung zu sehen. Zusätzlich finden sich Lipideinlagerungen in der *Lamina media*, ähnlich den Lipideinlagerungen, die im Plaque atherosklerotischer Gefäße und in der *Lamina intima* früher Atherosklerosestadien zu finden sind (nicht gezeigt), wobei die A. carotis communis der verwendeten Tiere makroskopisch frei von atherosklerotischen Ablagerungen war. In scheinoperierten Gefäßen von ApoE^{-/-}-Mäusen (Abb. 14) konnte ebenso wie in ungeschädigten und geschädigten Gefäßen von WT-Mäusen (nicht gezeigt) mit der Ölrot O-Färbung keine Ablagerung von Lipiden nachgewiesen werden.

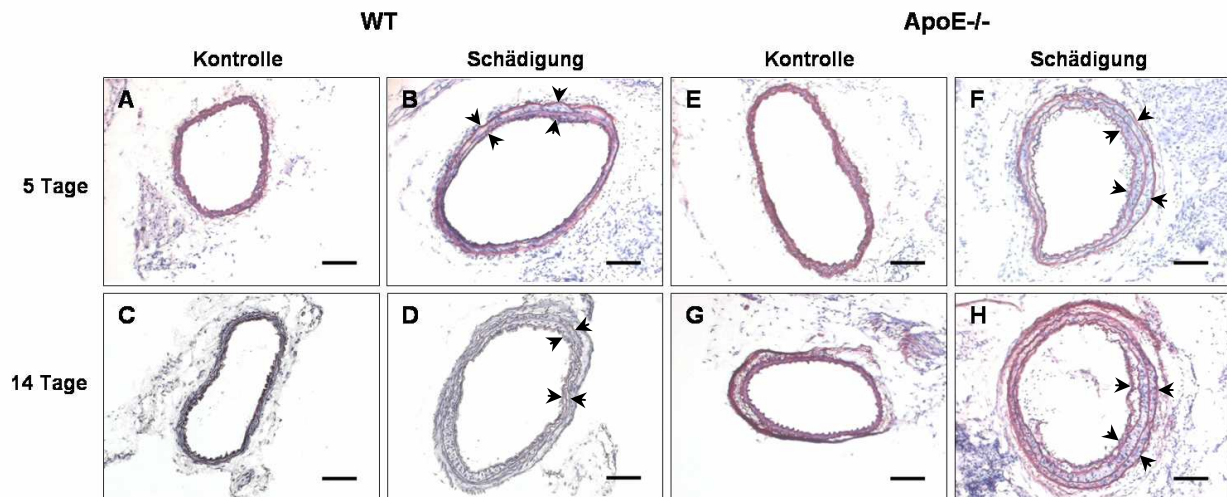


Abb. 13: Hämatoxylin-Orcein-gefärbte Schnitte der A. carotis communis sinistra und dextra von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen 5 und 14 Tage nach Deendothelialisierung.

Dünnschnitte der A. carotis communis sinistra und dextra der jeweils gleichen WT (A+B, C+D)- und ApoE^{-/-} (E+F, G+H)-Mäuse wurden mit Orcein zur Darstellung der elastischen Fasern (violett) und Hämatoxylin zur Darstellung der Zellkerne (blau) gefärbt. In Bild A, C, E und G sind die scheinoperierten Gefäße (Kontrolle) gezeigt, in Bild B, D, F und H die geschädigten Gefäße. Die Gefäßquerschnitte wurden 5 Tage (A, B, E, F) bzw. 14 Tage (C, D, G, H) nach der Endothelschädigung angefertigt. Zu beiden Zeitpunkten war die Media in den geschädigten Gefäßen (B und D, F und H) deutlich verdickt im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgefäßen (A und C, E und G). Bei ApoE^{-/-}-Tieren war die Mediaverdickung deutlich stärker ausgeprägt als in Gefäßen von WT-Tieren (schwarze Pfeile). Balken = 100 µm

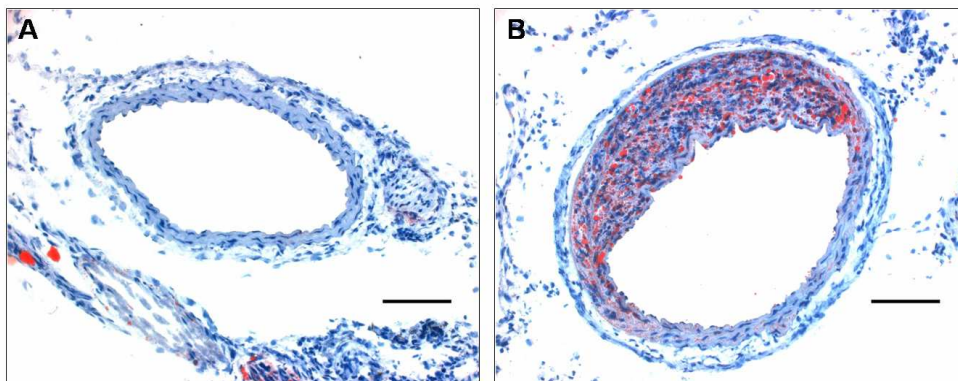


Abb. 14: Ölrot O-Hämatoxylin-gefärbte Schnitte der A. carotis communis einer ApoE^{-/-}-Maus 14 Tage nach intraluminaler Endothelschädigung.

Bild A zeigt das rechte, scheinoperierte Gefäß, eine Lipideinlagerung oder Mediaverdickung ist nicht vorhanden. Bild B zeigt die geschädigte A. carotis communis mit einer einseitig deutlich verdickten Media und eingelagerten Lipiden (Lipidtröpfchen) (rot gefärbt). Ebenso ist die Vergrößerung des Gefäßquerschnitts (positives arterielles Remodeling) im Vergleich zum nichtgeschädigten Gefäß des gleichen Tieres zu erkennen. Beide Schnitte sind aus der gleichen Schnittebene (Schnittfolge 3; siehe 2.3.3), um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Balken = 100 µm

3.1.4 Nachweis von Makrophagen, Granulozyten sowie B- und T-Lymphozyten nach intraluminaler Schädigung der A. carotis

Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden wurden die Zellen der Arterienwand der A. carotis charakterisiert, um die Frage zu beantworten, ob an der Reaktion des Gefäßes auf die Endothelschädigung Zellen des Immunsystems beteiligt sind. Nach intraluminaler Schädigung des Gefäßendothels waren im geschädigten Gefäßbereich Zellen des Immunsystems nachweisbar. Vor allem im perivaskulärem Gewebe [*Lamina adventitia* und periadventitiales Granulationsgewebe, das durch die Operation entsteht (Drew,

Tucker et al. 2000)] fanden sich B- und T-Lymphozyten (Abb. 16) und seltener auch Granulozyten (nicht gezeigt), die in den scheinoperierten Gefäßen nicht nachweisbar waren. Das sehr seltene Vorkommen von Granulozyten in der Media ging in den meisten Fällen mit einer sehr starken Mediaschädigung einschließlich Mediaeinrissen einher. Derart geschädigte bzw. veränderte Gefäße wurden ebenso wie Gefäße mit thrombotischen Verschlüssen nicht in die Auswertung einbezogen.

Die Deendothelialisierung führte zu einer verstärkten Infiltration des perivaskulären Gewebes mit Makrophagen sowie zum Auftreten von Makrophagen in der *Lamina media* im Vergleich zu den Kontrollgefäßen (Abb. 15). Die Auswertung mehrerer Dünnschnitte für jedes Gefäß ergab, dass die Infiltration der Gefäßwand mit Makrophagen sehr stark variierte; während in einem Schnitt nur vereinzelt Makrophagen vorhanden waren, war in einem anderen eine massive Makrophageninfiltration nachweisbar. Das Auftreten von B- und T-Lymphozyten in den geschädigten Gefäßen der WT- und ApoE^{-/-}-Tiere (Abb. 16, ApoE^{-/-}-Tiere nicht dargestellt) variierte ebenso wie die Anzahl der Makrophagen, jedoch waren die Lymphozyten generell in geringerer Anzahl vorhanden, so dass in einigen Dünnschnitten keine Lymphozyten nachweisbar waren. In der Arterienwand von scheinoperierten Gefäßen kam es zu keiner Lymphozyteninfiltration (nicht dargestellt).

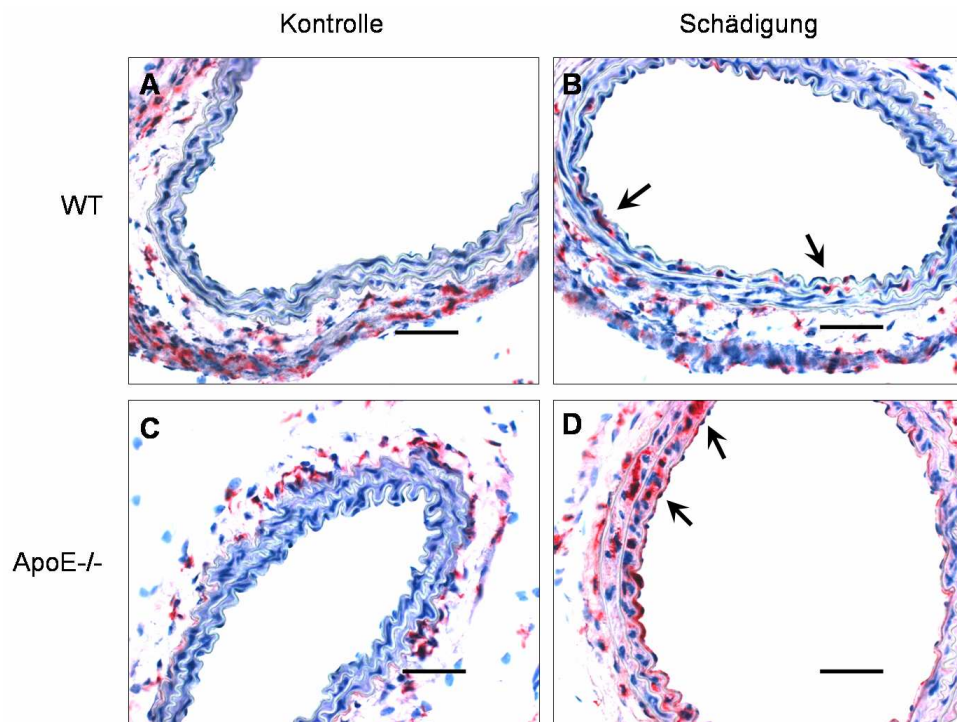


Abb. 15: Auftreten von Makrophagen in der *Lamina media* nach intraluminaler Endothelschädigung bei WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen.

Dargestellt sind repräsentative Dünnschnitte der A. carotis communis einer WT-Maus (A, B) und einer ApoE^{-/-}-Maus (C, D) 14 Tage nach der Schädigung mit den entsprechenden Kontrollgefäßen. Als primärer Antikörper gegen Makrophagen wurde FA-11 (CD68) verwendet. Durch eine Farb-Substrat-Reaktion (siehe 2.9, 2.9.1) wurden die markierten Zellen sichtbar gemacht (rot markiert). Zur besseren Darstellung der Gefäße wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt (Zellkerne blau dargestellt). In den scheinoperierten Kontrollgefäßen waren Makrophagen nur im perivaskulären Gewebe nachweisbar (Bild A und C). Nach der Schädigung waren Makrophagen auch in der *Lamina media* vorhanden (Bild B und D, schwarze Pfeile), die in der ApoE^{-/-}-Maus phänotypische Merkmale von Schaumzellen aufwiesen.

Balken = 100 µm

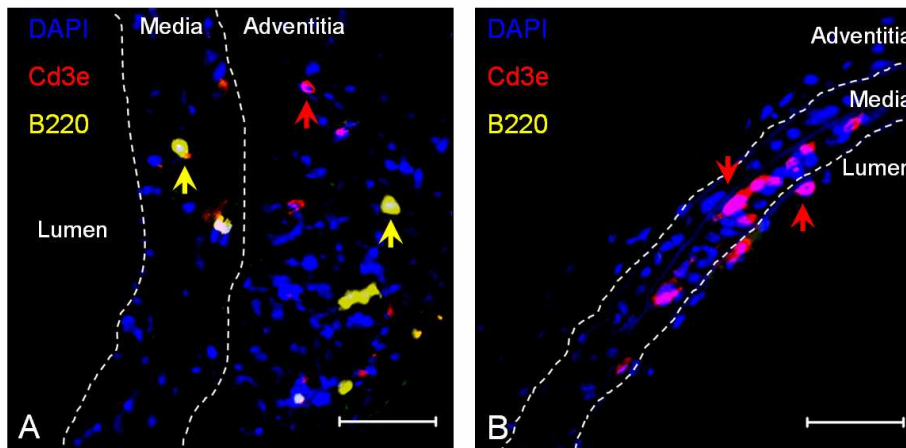


Abb. 16: Nachweis von B- und T-Lymphozyten in der geschädigten A. carotis communis bei WT-Mäusen.

Die Abbildung zeigt mittels Immunfluoreszenz gefärbte Dünnschnitte (siehe 2.9 und 2.9.2) der A. carotis communis sinistra von WT-Tieren 5 (A) und 14 Tage (B) nach der Endothelschädigung. Blau dargestellt sind die Zellkerne (DAPI), für den Nachweis von T-Zellen wurde der Antikörper CD3e verwendet (rot dargestellt), für den Nachweis von B-Zellen wurde der Antikörper B220 verwendet (gelb dargestellt). Nach Schädigung der Gefäßwand waren zu beiden untersuchten Zeitpunkten Lymphozyten in der Media und dem perivaskulären Gewebe nachweisbar (rote und gelbe Pfeile).

Balken = 50 µm

3.1.5 Expression des Stammzellmarkers CD34 in der A. carotis nach Endothelschädigung

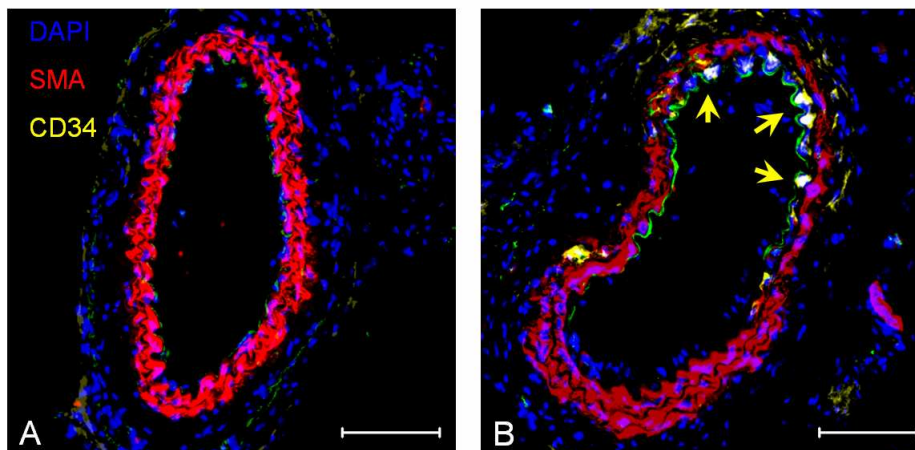


Abb. 17: CD34-positive Zellen in der Lamina media der A. carotis communis einer WT-Maus 14 Tage nach der Deendothelialisierung.

Die Abbildung zeigt Gefäßschnitte der A. carotis communis dextra (A) und sinistra (B) einer WT-Maus 14 Tage nach der Schädigung des Gefäßendothels. Blau dargestellt sind die Zellkerne (DAPI), rot die glatten Gefäßmuskelzellen (SMA), gelb die CD34-positiven Zellen und grün die elastischen Fasern (Eigenfluoreszenz). Im scheinoperierten Gefäß (A) waren keine CD34-positiven Zellen nachweisbar, die gesamte Media war SMA-positiv, während im geschädigten Gefäß (B) CD34-positive Zellen in der Media detektiert wurden, die SMA-negativ waren (gelbe Pfeile).

Balken = 100 µm

In der *Lamina media* konnten nach der Endothelschädigung BrdU-positive, proliferierende Zellen nachgewiesen werden. Proliferierende glatte Gefäßmuskelzellen der Media und der neu gebildeten Neointima exprimieren auf ihrer Oberfläche nur sehr schwach oder keine Oberflächenantigene, die für Gefäßmuskelzellen spezifisch sind (Thyberg, Blomgren et al. 1997; Regan, Adam et al. 2000). Regan et. al. zeigten, dass eine intraluminale Endothelschädigung der A. carotis der Maus zur Dedifferenzierung der Gefäßmuskelzellen führte und dass auf deren Oberfläche vermehrt Marker für Stammzellen exprimiert wurden.

In unseren Untersuchungen konnten in der Media geschädigter Gefäße CD34-positive Zellen nachgewiesen werden, während in den scheinoperierten Kontrollen keine CD34-positiven Zellen nachweisbar waren. Die CD34-positiven Zellen waren negativ für SMA, ein Marker für glatte Gefäßmuskelzellen (Abb. 17).

3.1.6 Genexpressionsanalysen geschädigter und nichtgeschädigter Karotisarterien von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen

Um eine mögliche Beteiligung von Zytokinen, Chemokinen und ECM-degradierenden Proteinasen an arteriellen Remodelingprozessen zu untersuchen, wurde zu definierten Zeitpunkten nach der intraluminalen Gefäßwandschädigung (1, 3, 5 und 14 Tage) die Expression von Chemokinen, Chemokinrezeptoren, (proinflammatorischen) Zytokinen, ECM-degradierenden Enzymen und deren endogener Inhibitoren mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt. Die PCR-Analyse erfolgte an individuellen Gefäßen, wobei die RNA-Menge, die aus einer einzelnen A. carotis gewonnen werden konnte, ca. 1 µg betrug und damit stark limitiert war. Da der Nachweis gering exprimierter Gene den Einsatz größerer RNA-Mengen erfordert, um in den optimalen Messbereich der PCR zu gelangen, wurde auf die Bestimmung gering exprimierter Gene verzichtet.

3.1.6.1 Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren in der A. carotis

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Expression des C-C-Chemokins Mip-1α in Aorten von ApoE^{-/-}-Mäusen mit fortschreitender Atherosklerose bzw. dem damit verbundenen arteriellen Remodeling zunimmt (Moos, John et al. 2005). Für den Rezeptor Ccr5 gibt es Hinweise in der Literatur, dass dieser für Remodelingprozesse nach experimenteller Endothelschädigung von Bedeutung ist, da bei Verwendung von Ccr5-defizienten Mäusen die intimale Hyperplasie reduziert war (Zernecke, Liehn et al. 2006; Braunersreuther, Zernecke et al. 2007) Aus diesem Grund wurde die Expression von Mip-1α und dessen spezifischer Rezeptoren Ccr1 und Ccr5 in der A. carotis communis von geschädigten und nichtgeschädigten Gefäßen untersucht. Nach intraluminaler Endothelschädigung wurde in geschädigten gegenüber nichtgeschädigten Gefäßen sowohl bei WT- als auch bei ApoE^{-/-}-Tieren ein signifikanter Anstieg der Gen-expression von Mip-1α 24 Stunden nach der Deendothelialisierung gemessen; das Expressionsniveau für Mip-1α war in den geschädigten Gefäßen und in den nichtgeschädigten Gefäßen (Kontrollen) der beider Mauspopulationen gleich (Abb. 18A).

Die Expression der Rezeptoren für Mip-1α, Ccr1 und Ccr5, zeigte in den geschädigten Gefäßen einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie die Expression des Chemokins (Abbn. 18B und C). Nach einem initialen signifikanten Anstieg der Expression einen Tag nach der Schädigung im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgefäßen nahm die Expression beider Rezeptoren über die Zeit kontinuierlich ab. Während die ermittelten Expressionswerte für Ccr1 in den geschädigten Gefäßen innerhalb des untersuchten Zeitraums das Niveau der Kontrollen erreichten (Abb. 18B), war das Expressionsniveau von Ccr5 auch 14 Tage nach der Schädigung noch signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht (Abb. 18C). Zwischen den nichtgeschädigten Gefäßen der WT- und ApoE^{-/-}-Tiere bestand kein Unterschied in der Expression der Chemokinrezeptoren.

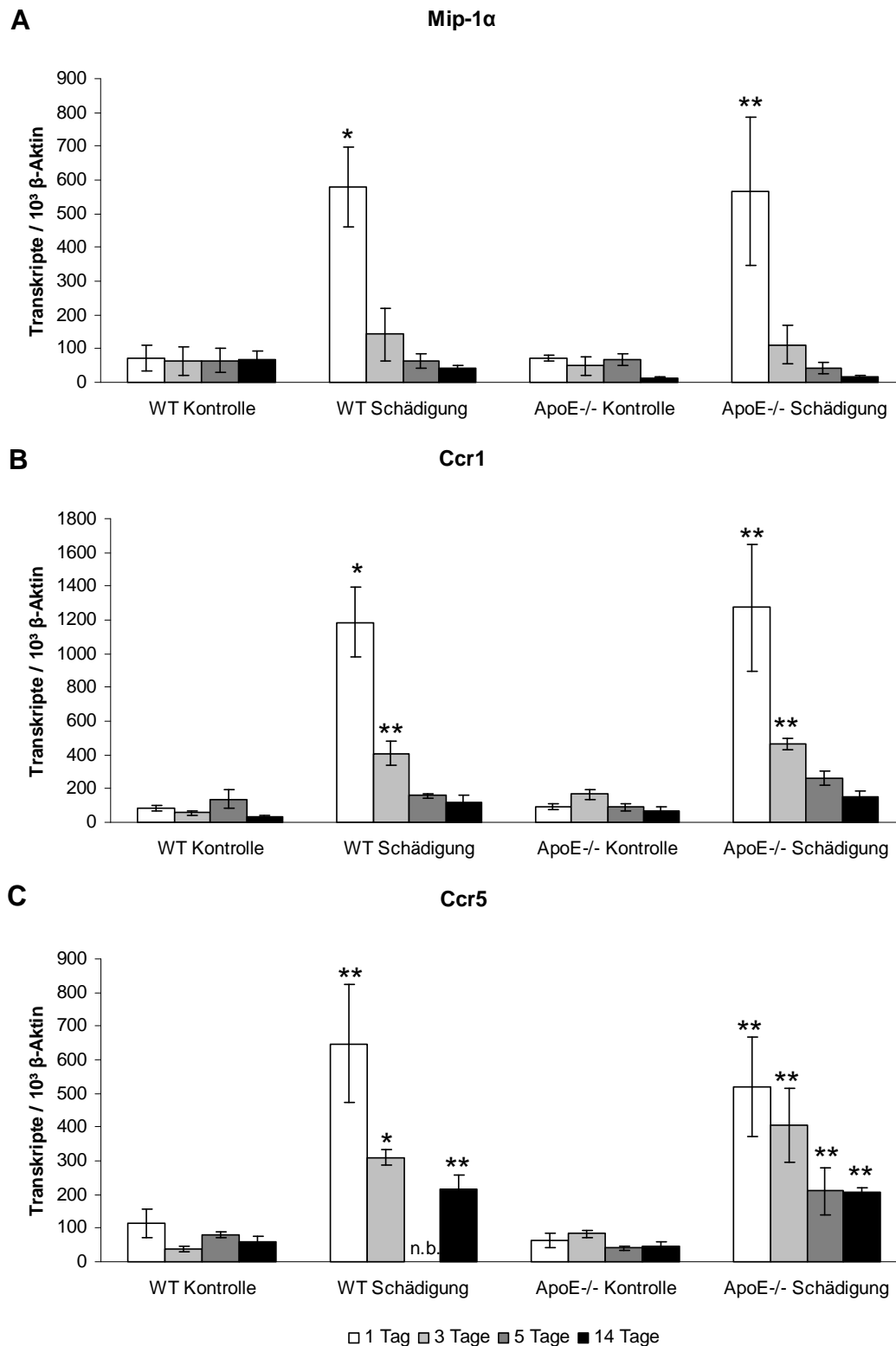


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Expression von Mip-1α, Ccr1 und Ccr5 in der A. carotis geschädigter und nichtgeschädigter Gefäße von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen.

Die Expression von Mip-1α und der spezifischen Chemokinrezeptoren wurde in individuellen Gefäßen mittels qRT-PCR bestimmt. In den geschädigten Gefäßen von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen war die Expression von Mip-1α (Abb. A), Ccr1 (Abb. B) und Ccr5 (Abb. C) zeitabhängig erhöht. Zwischen den beiden Mauspopulationen gab es keine Unterschiede im Expressionsniveau der geschädigten und der Kontrollgefäße zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Deendothelialisierung.

n.b. = nicht bestimmt

Mittelwerte ± SEM, n = 3 – 7

* p ≤ 0,1; ** p ≤ 0,05 Schädigung vs. Kontrolle (Mann-Whitney-Test)

Die Chemokinrezeptoren Ccr1 und Ccr5 reagieren auch spezifisch mit dem Chemokin RANTES (*regulated upon activation, normal t-cell expressed, and presumably secreted*, Ccl5). Auch für RANTES konnte ein Unterschied in der Genexpression zwischen geschädigten und nichtgeschädigten Gefäßen festgestellt werden (nicht gezeigt), jedoch waren die ermittelten Expressionswerte beim Einsatz geringer RNA-Mengen sehr niedrig, was eine Interpretation der Daten erschwert bzw. unmöglich macht. Jedoch zeigten Schober et al., dass RANTES nach einer Gefäßwandschädigung der A. carotis von ApoE^{-/-}-Mäusen in der Neointima immunhistochemisch nachweisbar war (Schober, Manka et al. 2002).

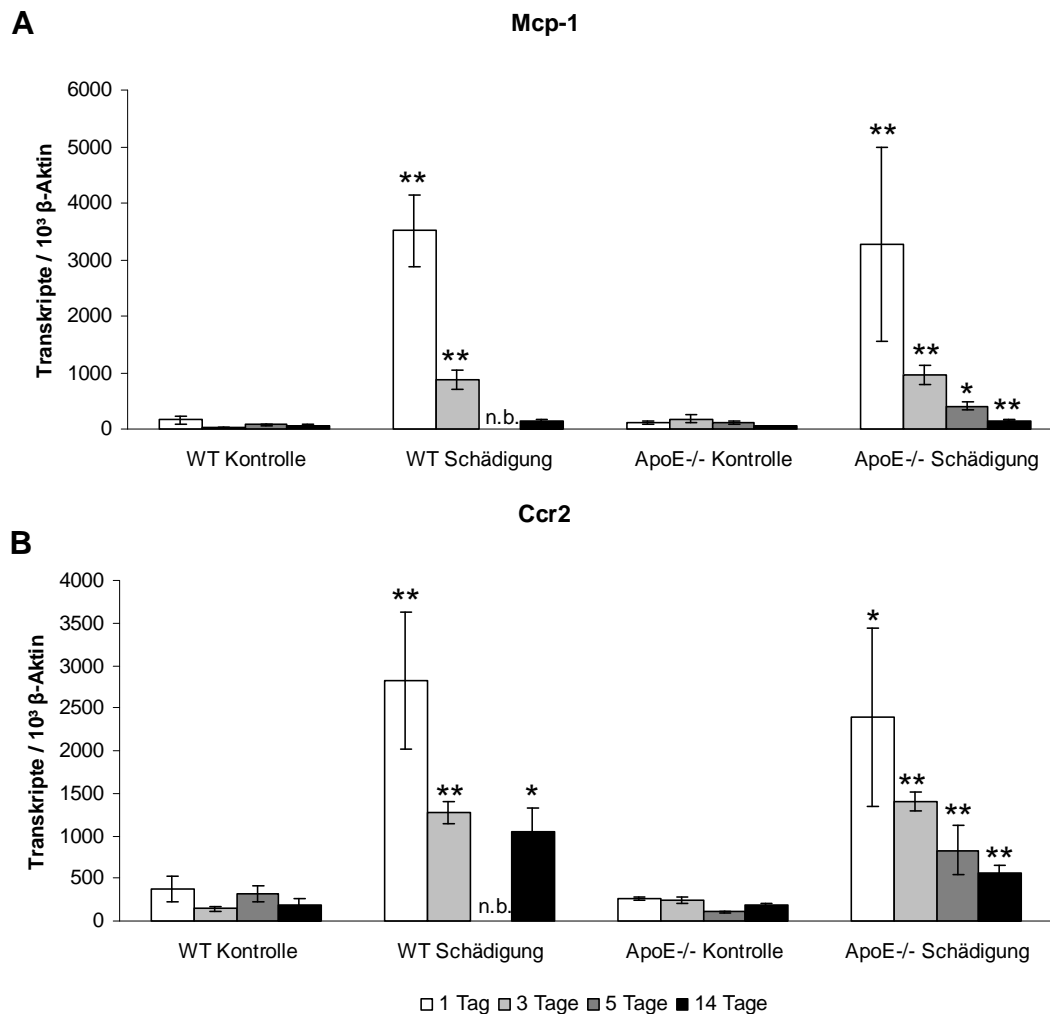


Abb. 19: Zeitabhängige Expression von Mcp-1 und Ccr2 in der A. carotis communis von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen.

Die Expression von Mcp-1 und Ccr2 wurde in individuellen Gefäßen mittels qRT-PCR bestimmt. In den geschädigten Gefäßen sowohl von WT- als auch von ApoE^{-/-}-Mäusen war die Expression von Mcp-1 (Abb. A) und Ccr2 (Abb. B) 24 Stunden nach der Schädigung gegenüber den Kontrollen erhöht und nahm im untersuchten Zeitraum ab. WT- und ApoE^{-/-}-Tiere unterschieden sich nicht im Expressionsniveau von Mcp-1 und Ccr2 sowohl in den geschädigten als auch in den Kontrollgefäßen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Schädigung.

n.b. = nicht bestimmt

Mittelwerte ± SEM, n = 3 – 5

* p ≤ 0,1; ** p ≤ 0,05 Schädigung vs. Kontrolle (Mann-Whitney-Test)

Neben Mip-1α wurde auch die Expression des C-C-Chemokins Mcp-1 und dessen Rezeptor Ccr2 untersucht, die direkt mit der Atherosklerose assoziiert sind. Mcp-1 wurde als erstes Chemokin in frühen humanen Atherosklerosestadien identifiziert (Takeya, Yoshimura et al. 1993). Außerdem gibt es Hinweise

in der Literatur, dass das Mcp-1-Ccr2-System die Proliferation glatter Muskelzellen nach einer Endothelschädigung beeinflusst, da die intimale Hyperplasie in der Femoralarterie bei Verwendung von Ccr2-Knockout-Mäusen reduziert war (Roque, Kim et al. 2002).

Die Deendothelialisierung induzierte die Expression von Mcp-1 und Ccr2, die Expression erfolgte dabei auf sehr hohem Niveau und lag über den Expressionswerten der mitbestimmten Haushaltsgene β -Aktin (Abb. 19) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (nicht gezeigt). Wie bei Mip-1 α und dessen Rezeptoren war 24 h nach der Schädigung die Expression von Mcp-1 und Ccr2 gegenüber den Kontrollgefäßen signifikant erhöht und nahm danach zeitabhängig ab. In den geschädigten Gefäßen war die Expression von Mcp-1 nach 14 Tagen wieder auf ähnlichem Niveau wie in den Kontrollen; es bestand nur noch bei den ApoE^{-/-}-Mäusen ein signifikanter Unterschied (Abb. 19A). Dagegen waren die Expressionswerte für Ccr2 zu diesem Zeitpunkt in beiden Mauspopulationen noch deutlich in den geschädigten Gefäßen gegenüber den Kontrollen erhöht (Abb. 19B).

3.1.6.2 Expression von Osteopontin in der A. carotis der WT- und ApoE^{-/-}-Maus

Osteopontin ist ein Phosphoprotein mit einer Tripeptid-Sequenz, wie sie auch andere extrazelluläre Matrixproteine besitzen. Osteopontin kann an ECM gebunden vorliegen, wo es für die Integrität und die Funktionalität verantwortlich ist, oder in seiner löslichen Form die Funktion eines Zytokins haben. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass Osteopontin die Proliferation von glatten Muskelzellen der *Lamina media* und die intimale Hyperplasie nach Endothelschädigung beeinflusst (Isoda, Nishikawa et al. 2002) sowie an der Adhäsion und Akkumulation von Leukozyten nach einer Endothelschädigung beteiligt ist (Myers, Harmon et al. 2003). Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Daten und der Expression von Osteopontin in der Aorta von 32 Wochen alten ApoE^{-/-}-Mäusen (siehe 3.2.1, Tab. 2) wurde die Expression von Osteopontin auch in der A. carotis der WT- und ApoE^{-/-}-Mäuse untersucht, um Hinweise für eine Beteiligung von Osteopontin beim arteriellen Remodeling nach der intraluminalen Endothelschädigung zu finden und mögliche Unterschiede zwischen den beiden Mauspopulationen aufzuzeigen.

Die Expression von Osteopontin in den geschädigten Gefäßen der WT-Tiere war zu allen untersuchten Zeitpunkten (1, 3, 5 und 14 Tage) signifikant gegenüber den Kontrollgefäßen erhöht, während in den geschädigten Gefäßen von ApoE^{-/-}-Tieren kein Anstieg der Expression nachgewiesen werden konnte (Abb. 20). Jedoch war die Expression von Osteopontin in den Kontrollgefäßen der ApoE^{-/-}-Mäuse bereits auf hohem Niveau und signifikant gegenüber den WT-Kontrollen erhöht. Im Gegensatz dazu unterschied sich das Expressionsniveau in den geschädigten Gefäßen nicht zwischen WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen (Abb. 20).

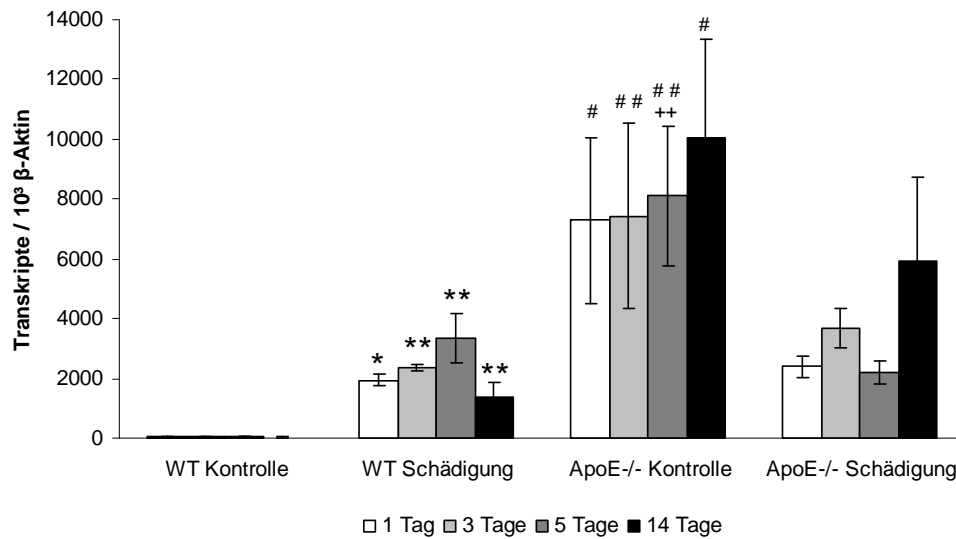


Abb. 20: Expression von Osteopontin in der A. carotis geschädigter und nichtgeschädigter Gefäße von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen.

Die Expression von Osteopontin wurde in individuellen Gefäßen mittels qRT-PCR bestimmt. Das gemessene Expressionsniveau der nichtgeschädigten Gefäße von WT-Mäusen lag im Mittel bei 39 Transkripten/10³ β-Aktin. Die Endothelschädigung führte zu einem signifikanten Anstieg der Expression von

Osteopontin zu allen untersuchten Zeitpunkten in der WT-Maus. Bei ApoE^{-/-}-Tieren konnte keine Induktion der Osteopontin-Expression durch die Schädigung nachgewiesen werden, jedoch war Osteopontin bereits in den nichtgeschädigten Gefäßen auf hohem Niveau exprimiert.

Mittelwerte ± SEM; n = 3 – 4

* p ≤ 0,1; ** p ≤ 0,05 Schädigung vs. Kontrolle (Mann-Whitney-Test)

p ≤ 0,1; ## p ≤ 0,05 ApoE^{-/-} vs. WT (Mann-Whitney-Test)

** p ≤ 0,05 Kontrolle vs. Schädigung (Mann-Whitney-Test)

3.1.6.3 Expression proinflammatorischer Zytokine in der A. carotis nach Endothelschädigung

Zur näheren Charakterisierung immunologischer Prozesse beim arteriellen Remodeling in der A. carotis communis nach Endothelschädigung wurde die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1β und TNFα bestimmt. Proinflammatorische Zytokine wirken als Stimulus für Migration, Wachstum und Differenzierung von Zellen und regen andere Zellen zur Ausschüttung weiterer Zytokine an. So spielt IL-6 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und der Aufrechterhaltung chronisch-inflammatorischer Prozesse (Gabay 2006). Die Entwicklung einer späteren Restenose nach perkutaner koronarer Intervention geht mit einem Anstieg der Plasmakonzentrationen von Mcp-1 und IL-6 einher, was auf deren Bedeutung für Restenoseprozesse und damit verbundenes arterielles Remodeling hinweist (Ikeda 2003). Des weiteren gibt es Hinweise in der Literatur, dass der IL-1β-Signalweg an arteriellen Remodelingprozessen beteiligt ist (Chamberlain, Evans et al. 2006) und dass TNFα das arterielle Remodeling bzw. die intimale Hyperplasie nach Ligatur der A. carotis beeinflusst (Rectenwald, Moldawer et al. 2000).

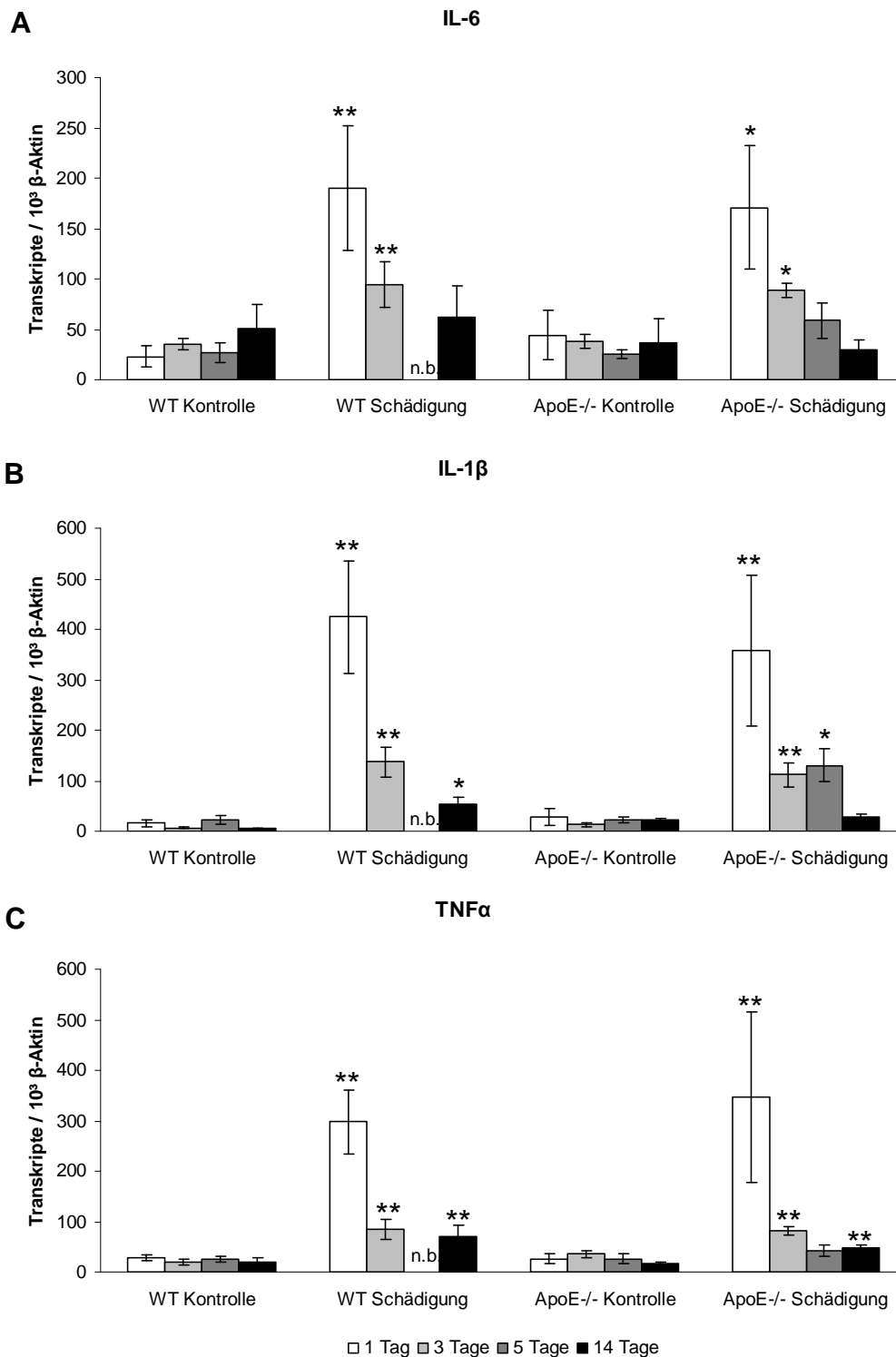


Abb. 21: Expression von IL-6, IL-1β und TNFα in der A. carotis zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Endothelschädigung bei WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen.

Die Expression der Zytokine wurde in individuellen Gefäßen mittels qRT-PCR bestimmt. Sowohl die Expression von IL-6 (Abb. A) als auch von IL-1β (Abb. B) und TNFα (Abb. C) wurde durch die Deendothelialisierung in der A. carotis induziert im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollgefäßen. Dabei zeigten die Expressionswerte aller drei Zytokine einen initialen Anstieg einen Tag nach der Schädigung und eine Abnahme der Expression im untersuchten Zeitraum. Zwischen WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen bestanden in den geschädigten Gefäßen und in den Kontrollen keine Unterschiede im Expressionsniveau von IL-6, IL-1β und TNFα.

n.b. = nicht bestimmt

Mittelwerte ± SEM; n = 3 – 6

* p ≤ 0,1; ** p ≤ 0,05 Schädigung vs. Kontrolle (Mann-Whitney-Test)

Die Expression von IL-6, IL-1 β und TNF α nach intraluminaler Schädigung der A. carotis zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf sowie ein ähnliches Expressionsniveau in beiden Mauspopulationen. In den nichtgeschädigten Kontrollgefäßen waren die Zytokine gering exprimiert, dabei konnte kein Unterschied zwischen WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen festgestellt werden (Abb. 21). Für alle drei Zytokine wurde in den geschädigten Gefäßen 24 Stunden nach der Deendothelialisierung ein Anstieg der Expressionswerte ermittelt, die im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen signifikant erhöht waren und innerhalb des untersuchten Zeitraumes abnahmen. Dabei war die Expression von TNF α zu allen 4 Zeitpunkten signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht (Abb. 21C); lediglich in den Gefäßen der ApoE^{-/-}-Mäuse 5 Tage nach der Schädigung war kein signifikanter Unterschied nachweisbar, möglicherweise wegen der geringen Probenzahl. Einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie TNF α zeigte auch die Expression von IL-1 β (Abb. 21B), jedoch war nach 14 Tagen die Expression von IL-1 β in den geschädigten Gefäßen der ApoE^{-/-}-Tiere bereits wieder auf dem Niveau der Kontrollen. Für IL-6 wurde nur für die Zeitpunkte von 1 und 3 Tagen nach der Schädigung ein signifikanter Unterschied in der Genexpression zwischen geschädigten und nichtgeschädigten Gefäßen in beiden Mauspopulationen gemessen (Abb. 21A).

3.1.6.4 Expression von Socs3 und Bcl2A1a in der A. carotis nach Deendothelialisierung

In atherosklerotischen Aorten von ApoE^{-/-}-Mäusen waren die Gene Socs3 (*supressor of cytokine signaling 3*) und Bcl2A1a (*B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a*) signifikant hochreguliert (siehe Anhang A.9). Um eine mögliche Beteiligung von Socs3 und Bcl2A1a an atherosklerose-unabhängigen Remodelingprozessen nachzuweisen, wurde die Expression dieser beiden Gene auch in der A. carotis zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Endothelschädigung und in den individuellen Kontrollgefäßen der WT- und ApoE^{-/-}-Mäuse untersucht. Das Socs3-Genprodukt ist ein immunregulatorisches Protein, das zu einer Proteinfamilie mit 8 Mitgliedern gehört, die inhibitorisch auf Zytokinsignalwege einwirken. Die Aktivierung der Inhibitoren erfolgt durch die Zytokine selbst oder über die Aktivierung von *Toll-like*-Rezeptoren (Kubo, Hanada et al. 2003; Yoshimura, Ohishi et al. 2004; Tan and Rabkin 2005). Bcl2A1a gehört zu einer Proteinfamilie (Bcl-2), deren Mitglieder antiapoptotische Wirkung haben (Hamasaki, Sendo et al. 1998) und kann durch inflammatorische Zytokine induziert werden (Moreb and Schweder 1997; He, Waxman et al. 2005). Das Gen für Bcl2A1a wurde 1998 von Hatakeyama et al. in der Maus charakterisiert (Hatakeyama, Hamasaki et al. 1998); im humanen System existiert eine homologe Sequenz, die in Endothelzellen entdeckt wurde (Karsan, Yee et al. 1996). Das murine Genom umfasst 4 bekannte A1-Gene (A1-a, -b, -c, -d). Zur Bestimmung der Genexpression von Bcl2A1a wurde ein Primerpaar verwendet, das aufgrund von Sequenzhomologien auch für die Varianten A-1b und A-1d spezifisch ist.

Die intraluminale Endothelschädigung der A. carotis führte zu einer Induktion der Expression von Socs3 und Bcl2A1a in WT- und ApoE^{-/-}-Tieren; für alle untersuchten Zeitpunkte (1, 3, 5 und 14 Tage) waren die Unterschiede zu den nichtgeschädigten Gefäßen signifikant (Abbn. 22 und 23). Für Bcl2A1a wurde außerdem zu allen Zeitpunkten eine signifikant höhere Expression in den nichtgeschädigten Gefäßen der ApoE^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollgefäßen der WT-Tiere nachgewiesen (Abb. 23).

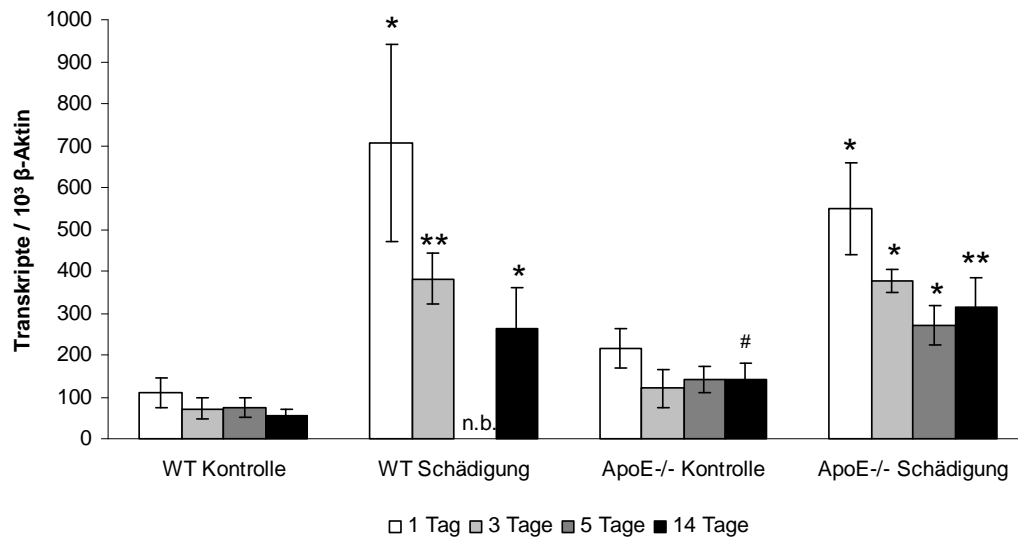


Abb. 22: Zeitabhängige Expression von Socs3 in der A. carotis communis von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen nach Deendothelialisierung.

Die Expression von Socs3 wurde in individuellen Gefäßen mittels qRT-PCR bestimmt. Zu allen untersuchten Zeitpunkten war die Expression in den geschädigten Gefäßen der WT- und ApoE^{-/-}-Tiere gegenüber den Kontrollen erhöht, dabei bestand kein Unterschied im Expressionsniveau zwischen den beiden Mauspopulationen.

n.b. = nicht bestimmt

Mittelwerte ± SEM, n = 3 – 4

* $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,05$ Schädigung vs. Kontrolle (Mann-Whitney-Test)

$p \leq 0,1$ ApoE^{-/-} vs. WT (Mann-Whitney-Test)

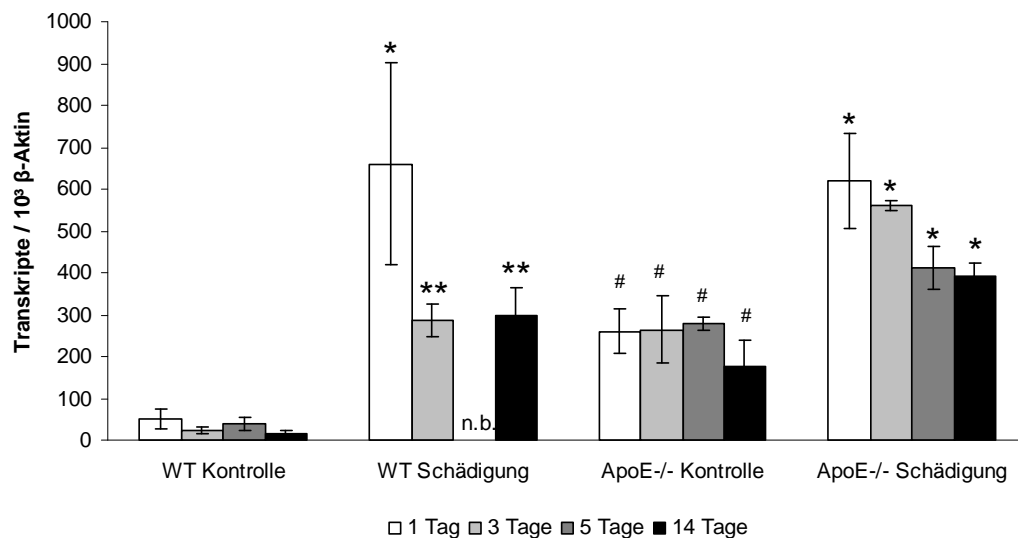


Abb. 23: Zeitlicher Verlauf der Expression von Bcl2A1a in der A. carotis communis nach Endothelschädigung bei WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen.

Die Expression von Bcl2A1a wurde in individuellen Gefäßen mittels qRT-PCR bestimmt. Die Schädigung des Gefäßendothels induzierte die Expression von Bcl2A1a in den Gefäßen beider Mauspopulationen im Vergleich mit den individuellen Kontrollen. In den Kontrollgefäßen der ApoE^{-/-}-Mäuse war Bcl2A1a im Vergleich zu den WT-Kontrollen bereits auf hohem Niveau exprimiert.

n.b. (nicht bestimmt)

Mittelwerte ± SEM, n = 3 – 4,

* $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,05$ Schädigung vs. Kontrolle (Mann-Whitney-Test),

$p \leq 0,1$ ApoE^{-/-} vs. WT (Mann-Whitney-Test)

3.1.6.5 Expression von ECM-degradierenden Enzymen im Verlauf des arteriellen Remodelings der A. carotis nach Endothelschädigung

Für arterielles Remodeling ist die Reorganisation von ECM ein wichtiger Prozess, da diese aus Proteinen und elastischen Fasern bestehende Matrix alle Zellen umgibt und je nach Zusammensetzung für die spezifische strukturelle Integrität eines Gewebes verantwortlich ist. Ab- und Umbau von ECM ist die Voraussetzung für arterielles Remodeling, das in der A. carotis communis nach der Endothelschädigung und in atherosklerotischen Gefäßen stattfindet. An diesen Umgestaltungen sind Proteinasen beteiligt (siehe 1.4), die spezifisch verschiedene ECM-Bestandteile degradieren. Im Folgenden wurden die Expression von Matrixmetalloproteinase Mmp-13 und der Cysteinproteinase Cathepsin S untersucht. Zusätzlich wurde noch die Expression des endogenen Mmp-Inhibitors Timp-1 analysiert. Beide ECM-degradierende Proteinase sowie der Inhibitor waren in atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mausarten gegenüber den WT-Aorten signifikant erhöht (siehe 3.2.1, Tab. 2 sowie Anhang A.9). Um Hinweise auf eine Beteiligung von Mmp-13, Timp-1 und Cathepsin S an Remodelingprozessen in der A. carotis communis nach Endothelschädigung zu erhalten, wurde die Expression der Proteinase in der A. carotis untersucht.

Ein Anstieg der Expression von Mmp-13 und Cathepsin S in der A. carotis communis wurde nur in WT-Tieren durch die Endothelschädigung induziert, da das Expressionsniveau der beiden Proteinase in den nichtgeschädigten Gefäßen der ApoE^{-/-}-Mäuse bereits dem der geschädigten Gefäße von WT- und ApoE^{-/-}-Tieren entsprach (Abb. 24A und 25). Dabei unterschieden sich die ermittelten Expressionswerte deutlich voneinander, diese waren für die Elastase Cathepsin S über dem Expressionsniveau der mit bestimmten Haushaltsgene β -Aktin (Abb. 25) und GAPDH (nicht gezeigt), während die Kollagenase Mmp-13 eher gering exprimiert war (Abb. 24A). Die Proteinase Cathepsin S wies zu allen Zeitpunkten eine signifikant erhöhte Expression in den Kontrollgefäßen der ApoE^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen auf (Abb. 25), während für Mmp-13 nur für einen Zeitpunkt (3 Tage) ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte (Abb. 24A). Die Expression des endogenen Mmp-Inhibitors Timp-1 in der A. carotis wurde durch die Deendothelialisierung in beiden Mauspopulationen induziert, jedoch war die Expression in den geschädigten Gefäßen der WT-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollen zu allen Zeitpunkten signifikant erhöht, während in Gefäßen von ApoE^{-/-}-Tieren nur 3 Tage nach der Schädigung ein signifikanter Anstieg der Expression von Timp-1 nachgewiesen werden konnte (Abb. 24B). Für drei der untersuchten Zeitpunkte (3, 5 und 14 Tage) wurde eine signifikant höhere Expression des Mmp-Inhibitors Timp-1 in nichtgeschädigten Gefäßen von ApoE^{-/-}-Mäusen gegenüber nichtgeschädigten WT-Arterien nachgewiesen (Abb. 24B).

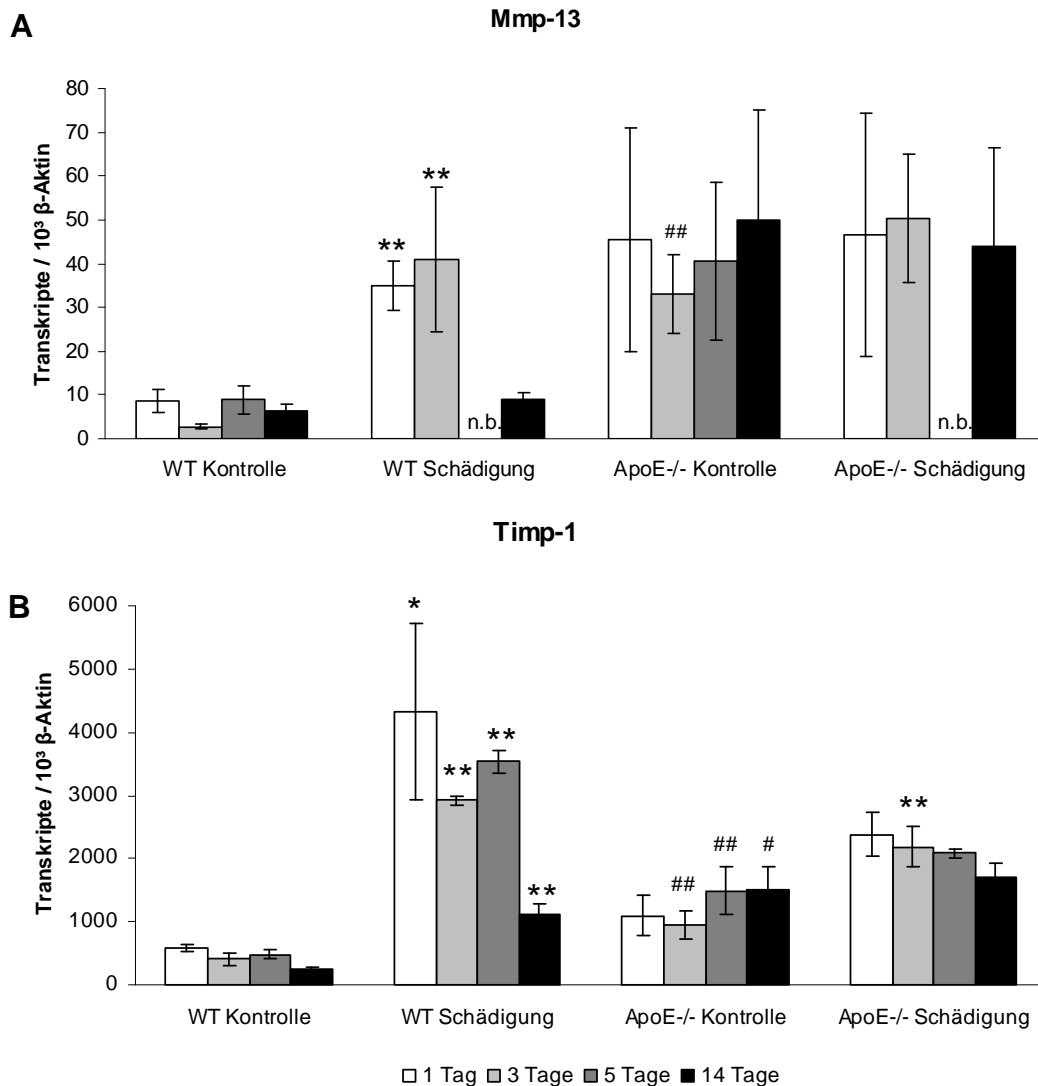


Abb. 24: Expression von Mmp-13 und Timp-1 im Verlauf des arteriellen Remodelings nach Endothelschädigung in der A. carotis von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen.

Die Expression von Mmp-13 und Timp-1 wurde in individuellen Gefäßen mittels qRT-PCR bestimmt. Die Endothelschädigung induzierte die Expression beider Gene in der geschädigten A. carotis der WT-Maus, während in der A. carotis von ApoE^{-/-}-Mäusen nur 3 Tage nach der Schädigung ein signifikanter Anstieg der Timp-1-Expression gemessen wurde. Sowohl Timp-1 (Abb. B) als auch Mmp-13 (Abb. A) wiesen eine erhöhte Expression in den nichtgeschädigten Gefäßen von ApoE^{-/-} im Vergleich zu WT-Mäusen auf.

n.b. (nicht bestimmt)

Mittelwerte \pm SEM, n = 3 – 6

* $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,05$ Schädigung vs. Kontrolle (Mann-Whitney-Test)

$p \leq 0,1$; ## $p \leq 0,05$ ApoE^{-/-} vs. WT (Mann-Whitney-Test)

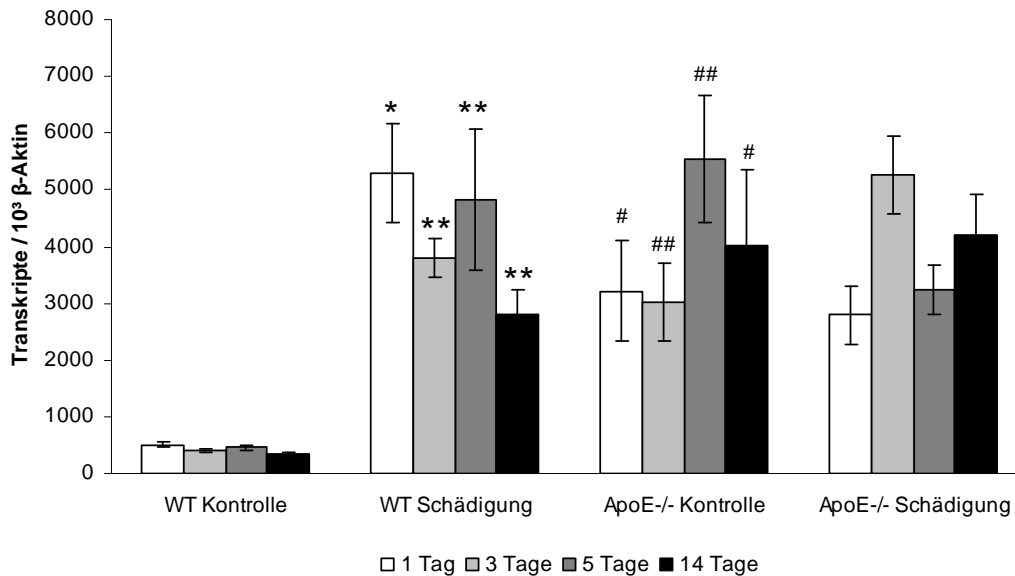


Abb. 25: Zeitabhängige Expression von Cathepsin S in der A. carotis communis geschädigter und nichtgeschädigter Gefäße von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen.

Die Expression von Cathepsin S wurde in individuellen Gefäßen mittels qRT-PCR bestimmt. In WT-Mäusen war zu allen untersuchten Zeitpunkten nach der Deendothelialisierung die Expression von Cathepsin S im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgefäßen erhöht. Das Expressionsniveau von Cathepsin S in den geschädigten Gefäßen der ApoE^{-/-}-Mäuse entsprach dem der Kontrollen; die Expression von Cathepsin S war in nichtgeschädigten Gefäßen von ApoE^{-/-}- gegenüber WT-Mäusen erhöht.

Mittelwerte ± SEM, n = 3 – 4

* p ≤ 0,1; ** p ≤ 0,05 Schädigung vs. Kontrolle (Mann-Whitney-Test)

p ≤ 0,1; ## p ≤ 0,05 ApoE^{-/-} vs. WT (Mann-Whitney-Test)

Neben den beiden untersuchten Proteinase gab es noch weitere ECM-degradierende Proteinase, die in den atherosklerotischen Mausearten signifikant hochreguliert waren (siehe 3.2.4). Eine dieser Proteinase war Mmp-12 (Makrophagen-Elastase). Für beide Metalloproteinase (Mmp-12 und Mmp-13) wurden Primer etabliert. Für Mmp-12 wurden im Verlauf der Etablierung mehrere Primerpaare getestet; es wurde jedoch kein Primerpaar gefunden, das in der qRT-PCR zu verlässlichen Ergebnissen führte.

3.2 Untersuchungen zur Atherosklerose der Maus

Morphologische Untersuchungen der Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen haben gezeigt, dass mit fortschreitender Atherosklerose der Gefäßquerschnitt der Aorta im Vergleich mit der Aorta von WT-Tieren stark zunimmt (Moos, John et al. 2005), was auf ein arterielles Remodeling deutet. Um diese Remodelingprozesse und die Atherosklerose der Mauseorta auf molekularbiologischer Ebene näher zu charakterisieren, wurden genomweite Transkriptionsanalysen atherosklerotischer Aorten von ApoE^{-/-}-Mäusen und von WT-Aorten durchgeführt. Des weiteren wurden in beiden Mauspopulationen ausgewählte Gene mittels qRT-PCR untersucht, um mögliche Expressionsunterschiede aufzuzeigen.

3.2.1 Genomweite Expressionsstudien der Aorta von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen

Mit Hilfe der Microarray-Technologie wurden genomweite Expressionsanalysen (Affymetrix™) von jeweils drei Aorten der WT- und der ApoE^{-/-}-Mäuse durchgeführt. Die Untersuchungen sollten mögliche Unterschiede in der Genexpression zwischen WT- und ApoE^{-/-}-Mausearten aufklären und zur Identifizierung atherosklerose- bzw. remodeling- und hyperlipidämie-assoziiertes Gene beitragen. Für die Untersuchungen wurden 32 Wochen alte Tiere verwendet, da in diesem Alter bereits atherosklerotische Läsionen in

der Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen vorhanden sind (eigene Beobachtungen, Moos 2005). Untersuchungen an der A. carotis wurden ebenfalls an 32 Wochen alten Tieren durchgeführt, so dass beim Vergleich der Expression von Genen in beiden Systemen altersabhängige Unterschiede ausgeschlossen werden können. In den Aorten der ApoE^{-/-}-Mäuse waren im Vergleich zu WT-Aorten 315 Probesets (Begriffserläuterung siehe 2.7.2 und 2.7.3) bzw. 236 Gene signifikant reguliert (Abb. 26), wovon 310 Probesets bzw. 231 Gene hochreguliert (Anhang A.9) und 5 Probesets bzw. 5 Gene herunterreguliert waren, einschließlich des ApoE^{-/-}-Gens, das in den Knockout-Mäusen nicht exprimiert sein sollte (Tab. 1).

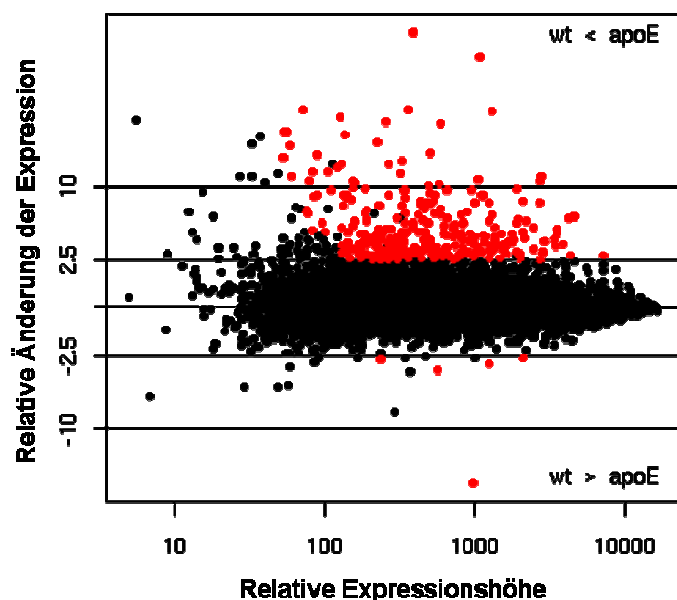


Abb. 26: MA-Plot (Dudoit, Yang et al. 2002) signifikant regulierter Gene der Aorta von ApoE^{-/-} im Vergleich zu WT-Mäusen.

Die Grafik zeigt alle Probesets, die als *present* selektiert wurden (rote und schwarze Punkte). Rot hervorgehoben sind alle signifikant regulierten Probesets, die den gewählten Filterkriterien entsprechen (siehe 2.7.3) und einen *Fold Change* $\geq 2,5$ aufweisen. Es wurden 310 Probesets ermittelt, die in der Aorta von ApoE^{-/-} im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant erhöht waren (siehe Anhang A.9) sowie 5 herunterregulierte Probesets (siehe Tab. 1).

Tabelle 1: Alle Probesets, die in der Aorta von ApoE^{-/-} im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant herunterreguliert waren

Genname	Gensymbol	p-Wert	Fold Change	Affymetrix™ Probeset ID
apolipoprotein E	Apoe	0,0110	28,0	1432466_a_at
RIKEN cDNA 1110008P14 gene	1110008P14Rik	0,0250	3,2	1447982_at
solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	Slc1a5	0,0070	2,9	1416629_at
lectin, galactose binding, soluble 4	Lgals4	0,0130	2,7	1451336_at
zinc finger and BTB domain containing 16	Zbtb16	0,0210	2,6	1419874_x_at

Tabelle 2: Probesets, die in der Aorta von ApoE^{-/-}- im Vergleich zu WT- Mäusen signifikant hochreguliert waren

Genname	Gensymbol	p-Wert	Fold Change	Affymetrix™ Probeset ID
matrix metallopeptidase 12	Mmp12	0,0061	190,0	1449153_at
secreted phosphoprotein 1	Spp1	0,0009	120,0	1449254_at
interleukin 7 receptor	Il7r	0,0071	44,0	1448576_at
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit D2	Atp6v0d2	0,0110	43,0	1444176_at
CD5 antigen-like	Cd5l	0,0017	42,0	1449193_at
matrix metallopeptidase 13	Mmp13	0,0190	38,0	1417256_at
brain expressed gene 1	Bex1	0,0110	35,0	1448595_a_at
lipocalin 2	Lcn2	0,0061	34,0	1427747_a_at
mucolipin 3	Mcoln3	0,0061	29,0	1437540_at
interleukin 6	Il6	0,0085	29,0	1450297_at

Tabelle 2 zeigt eine Auswahl der in der ApoE^{-/-}- im Vergleich zur WT-Aorta signifikant hochregulierten Probesets (vollständige Liste im Anhang unter A.9); es wurden die 10 Probesets mit dem größten *Fold Change* ausgewählt und dargestellt. Die durch Fettdruck hervorgehobenen Probesets bzw. Gene, Osteopontin (*secreted phosphoprotein 1*, Spp1), Mmp-13 und IL-6 wurden auch in der A. carotis communis von WT- und ApoE^{-/-}-Tieren mittels qRT-PCR untersucht. Sowohl Osteopontin als auch Mmp-13 und IL-6 wurden durch die intraluminale Endothelschädigung induziert und im Verlauf eines atherosklerose-unabhängigen arteriellen Remodelings exprimiert (siehe Abbn. 20, 21A und 24A).

3.2.2 Funktionelle Analyse der signifikant regulierten Gene

Für die folgenden Abbildungen (Abbn. 27 und 28) wurden die Microarraydaten mit Hilfe einer von Affymetrix™ angebotenen *Gene Ontology* (GO)-Analyse ausgewertet. Die statistische GO-Analyse kann dazu verwendet werden, die komplexen und umfangreichen Ergebnisse von genomweiten Expressionsstudien auf eine mögliche Häufung funktionell verwandter Gene zu überprüfen. *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org/>) ist in 3 Hauptkategorien unterteilt: „*biological process*“, „*molecular function*“ und „*cellular component*“, die wiederum hierarchisch in spezifischere Untergruppen (Tochter-GO-Begriffe) unterteilt sind, wobei mehrere GO-Begriffe einen gemeinsamen Tochter-GO-Begriff besitzen können bzw. ein GO-Begriff mehreren oder nur einem Überbegriff zugeordnet ist. Die funktionell zugehörigen Gene können deshalb nur einem als auch mehreren GO-Begriffen zugeordnet (annotiert) sein. Die Annotation von Genen wird aufgrund neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse kontinuierlich erweitert; die Annotationen der Affymetrix™-Probesets werden ebenfalls kontinuierlich aktualisiert. Alle Analysen wurden mit der gültigen Annotation von August 2006 durchgeführt.

Alle Probesets, die in ApoE^{-/-}- gegenüber WT-Aorten signifikant hochreguliert waren (Anhang A.9), wurden auf der Affymetrix™-Website (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>) mit der dort verfügbaren GO-Analyse unter der Bedingung ausgewertet, dass mindestens 5 Probesets zu einem GO-Begriff gehören, so dass sehr spezifische GO-Begriffe mit z.B. nur einem zugehörigen Probeset ausgeschlossen

wurden. Für jeden GO-Begriff wurde ein Chi-Quadrat-Wert ermittelt, der als Maß für die Häufung einer bestimmten GO-Annotation gegenüber einer normalen, zufälligen Verteilung angesehen werden kann. (Zur Berechnung gibt es von Affymetrix™ keine weiteren Angaben). Die Auswertung der GO-Analyse ergab, dass auffällig viele der GO-Begriffe mit hohen Chi-Quadrat-Werten funktionell zu immunologischen Prozessen gehören (Abbn. 27 und 28). Aus Abbildung 27 (GO-Kategorie „*molecular function*“) wird ersichtlich, dass in atherosklerotischen ApoE^{-/-}- im Vergleich zu WT-Aorten signifikant hochregulierte Gene zum GO-Begriff „*immunoglobulin binding*“ und dessen Tochter-GO-Begriff „*IgG binding*“ gehören. Auch die Chemokin(rezeptor)aktivität (GO-Begriffe: „*chemokine receptor binding*“ und „*chemokine activity*“) scheint in der atherosklerotischen Mausaorta von Bedeutung zu sein, da diese beiden GO-Begriffe ebenfalls hohe Chi-Quadrat-Werte aufweisen (Abb. 27). In Abbildung 28 ist der GO-Begriff „*immune response*“ mit einer Auswahl der zugehörigen Tochter-GO-Begriffe dargestellt. „*Immune response*“ ist ein Tochter-GO-Begriff von „*response to biotic stimulus*“ bzw. „*defense response*“, beide wiesen sehr hohe Chi-Quadrat-Werte auf (nicht gezeigt). Die zu „*immune response*“ gehörenden Tochter-GO-Begriffe „*inflammatory response*“ und „*humoral immune response*“ zeigten ebenso wie „*immune response*“ selbst eine signifikante Häufung der mit ihnen annotierten Probesets (erhöhte Chi-Quadrat-Werte), was auf eine mögliche Bedeutung dieser immunologischen Prozesse in der Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen bzw. dem atherosklerose-abhängigen arteriellen Remodeling hinweist (Abb. 28).

In Abbildung 29 sind Heatmaps der GO-Begriffe „*antigen presentation*“ und „*antigen processing*“ dargestellt, die zeigen, dass mehr als die Hälfte der jeweils zugehörigen Gene in der atherosklerotischen Aorta signifikant hochreguliert waren bzw. sehr viele der als *present* selektierten Probesets in der ApoE^{-/-}-Aorta eine signifikant höhere Expression gegenüber WT-Aorten aufwiesen. Dabei weisen „*antigen processing*“ und „*antigen presentation*“ nur geringe Chi-Quadrat-Werte auf (Abb. 28); laut der GO-Analyse besteht keine signifikante Häufung der mit den GO-Begriffen annotierten Probesets. Im Heatmap zeigt sich jedoch, dass auffällig viele der zugehörigen Gene in der ApoE^{-/-}-Aorta signifikant hochreguliert waren (Abb. 29A und B). Der zu „*antigen processing*“ gehörende spezifischere Tochter GO-Begriff „*antigen processing, exogenous antigen via MHC class II*“ bzw. die zu „*antigen presentation*“ gehörenden spezifischeren Tochter GO-Begriffe „*antigen presentation, exogenous antigen*“, „*antigen presentation, exogenous antigen via MHC class II*“ und „*antigen presentation, exogenous peptide antigen*“ weisen dagegen erhöhte bzw. sehr hohe Chi-Quadrat-Werte auf (Abb. 28). Die mögliche Bedeutung von immunologischen Prozessen in der Atherosklerose der ApoE^{-/-}-Maus bzw. dem atherosklerose-assoziierten Remodeling, insbesondere der Antigenpräsentation über MHC II-Moleküle, wird dadurch gestützt, dass auch in der GO-Kategorie „*molecular function*“ hohe Chi-Quadrat-Werte für die GO-Begriffe „*MHC class II receptor activity*“ und „*scavenger receptor activity*“ ermittelt wurden (nicht gezeigt).

Der GO-Begriff „*complement activation*“ ist ein Tochter-GO-Begriff von „*humoral immune response*“ (Abb. 28). Mit Hilfe der Affymetrix™-GO-Analyse wurde für die Probesets, die der Komplementaktivität zugeordnet sind, keine signifikante Überrepräsentation in den Aorten der ApoE^{-/-}-Mäuse ermittelt, der Chi-Quadrat-Wert war dementsprechend niedrig (siehe Abb. 28). Im Heatmap (Abb. 30A) zeigt sich jedoch, dass fast die Hälfte der mit „*complement activation*“ annotierten und als *present* selektierten Probesets in der atherosklerotischen Aorta gegenüber der WT-Aorta signifikant hochreguliert waren. Abbildung 30B zeigt einen Heatmap zum GO-Begriff „*innate immune response*“, der ebenfalls zur Kategorie „*biological process*“ gehört bzw. ein Tochter-GO-Begriff von „*immune response*“ ist (siehe Abb. 28). Der

ermittelte Chi-Quadrat-Wert für „*innate immune response*“ war laut Affymetrix™-GO-Analyse niedrig und zeigte keine signifikante Häufung der damit annotierten Probesets. Im Heatmap wird jedoch ersichtlich, dass mehr als die Hälfte der mit diesem GO-Begriff annotierten und als *present* selektierten Probesets in den atherosklerotischen Aorten signifikant hochreguliert waren (Abb. 30B). Mit Hilfe der GO-Analyse konnte gezeigt werden, dass Immunprozesse in der Atherosklerose der Maus und dem atherosklerose-assoziiertem arteriellen Remodeling von Bedeutung sein könnten. Dabei wurden Hinweise auf eine Beteiligung der innaten und der adaptiven Immunität gefunden.

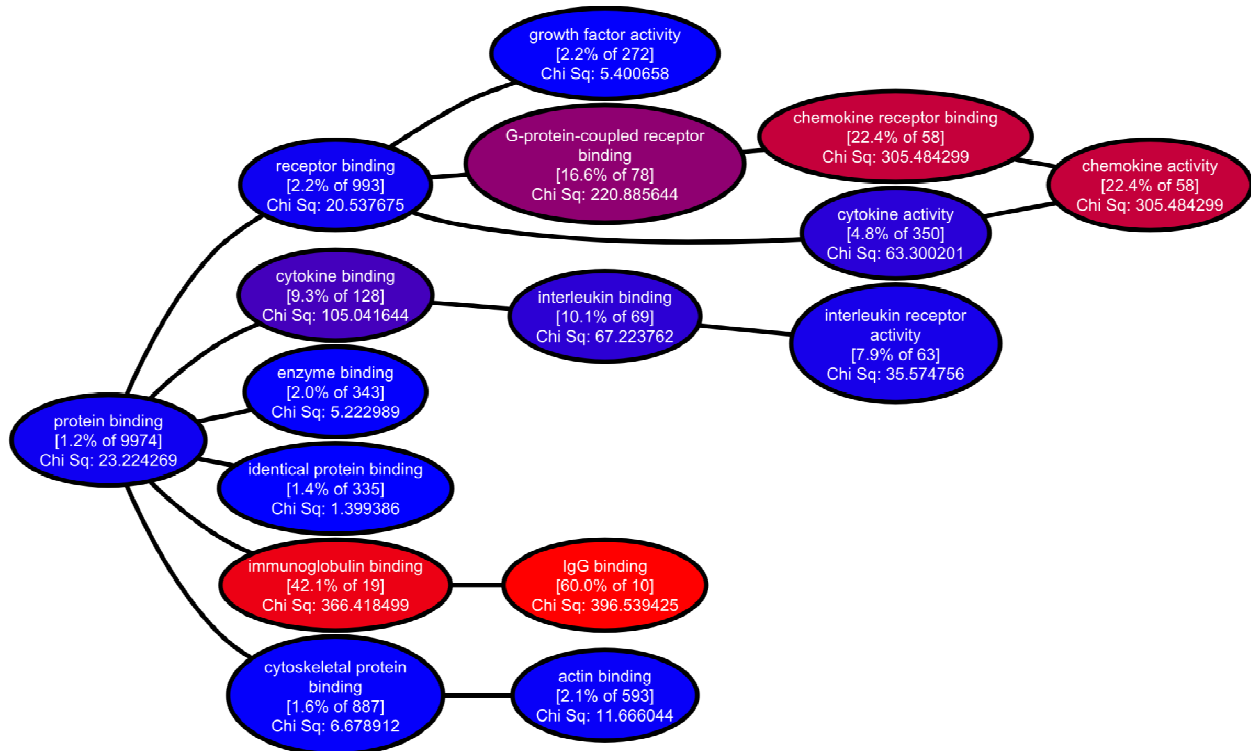


Abb. 27: Auszug aus der GO-Analyse von Affymetrix™ zur Kategorie „*molecular function*“.

Die Abbildung zeigt den GO-Begriff „*protein binding*“ mit den zugehörigen Tochter-GO-Begriffen. Die in der Aorta von ApoE^{-/-} im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant hochregulierten Probesets (Anhang A.9) wurden mit der Affymetrix™-GO-Analyse ausgewertet. Rot dargestellt sind GO-Begriffe mit hohen Chi-Quadrat-Werten, die eine signifikante Häufung der zugehörigen Gene aufweisen bzw. eine mögliche Bedeutung in der Atherosklerose der Maus haben. Blau dargestellt sind GO-Begriffe mit kleinen Chi-Quadrat-Werten, die keine signifikante Häufung aufweisen. Dazwischen gibt es farbliche Abstufungen von Blau über Violett zu Rot entsprechend der ermittelten Chi-Quadrat-Werte.

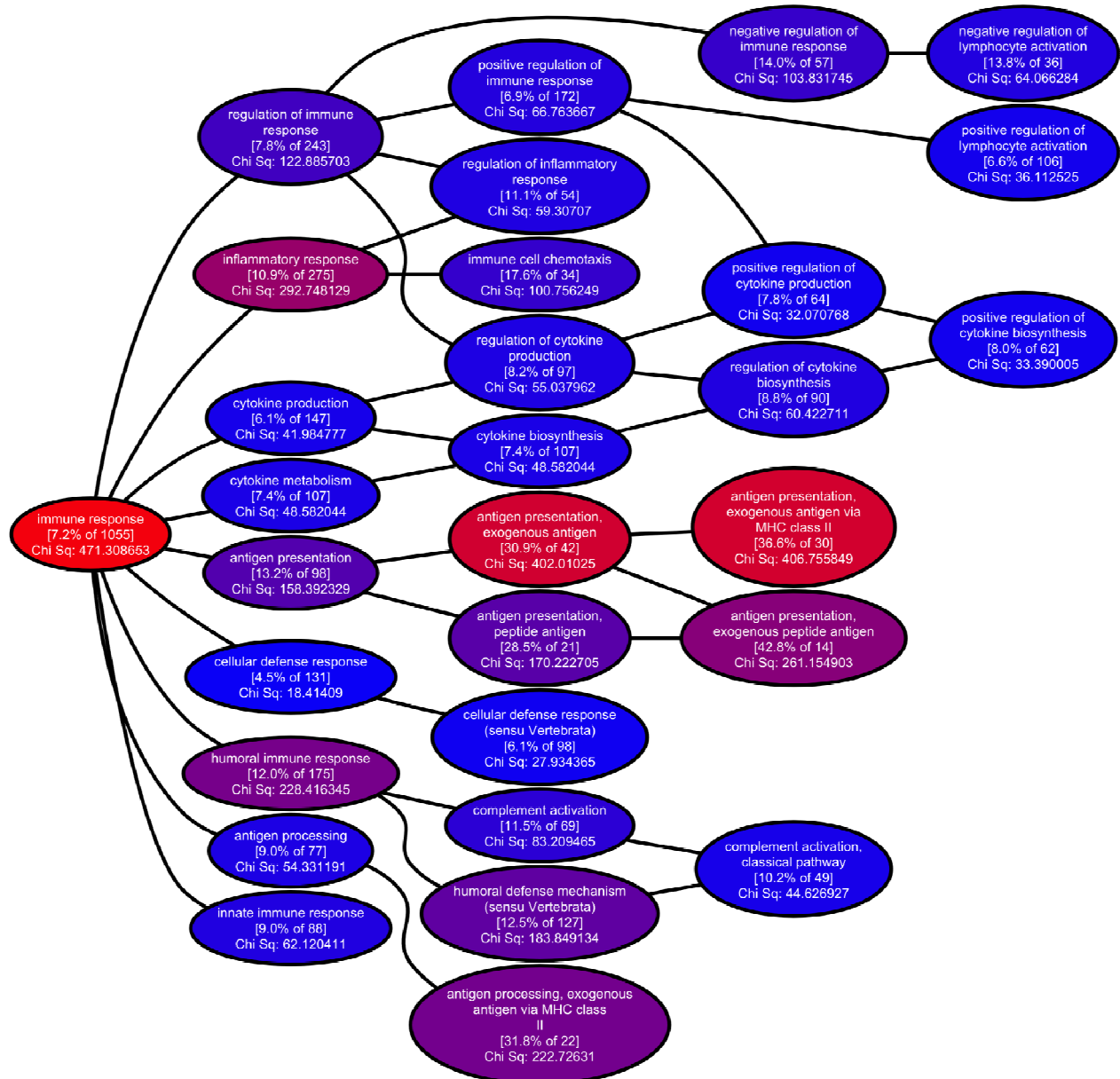
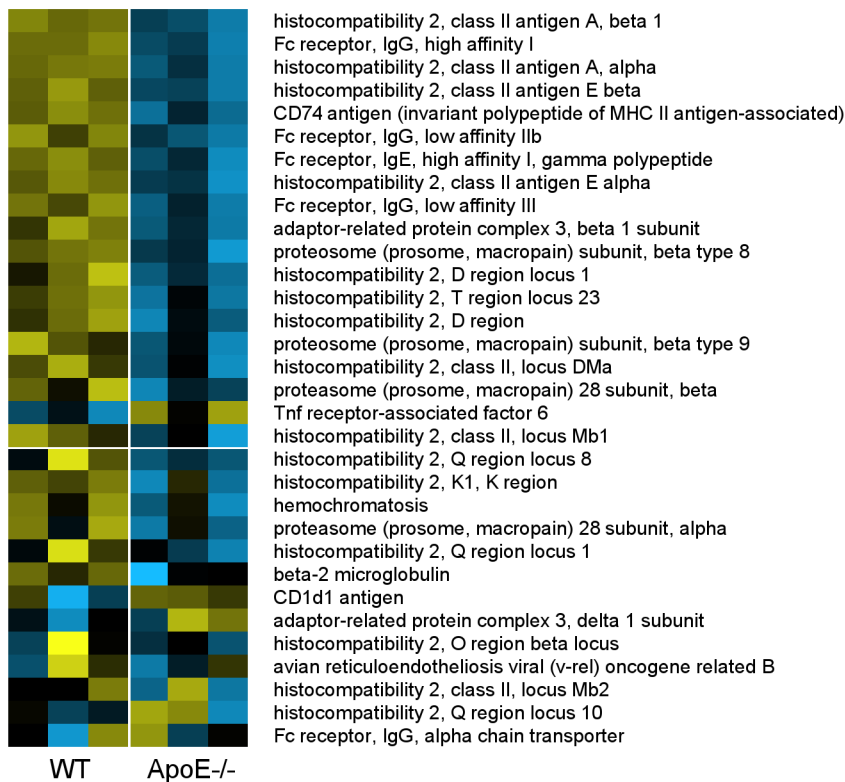


Abb. 28: Auszug aus der GO-Analyse von Affymetrix™ zur Kategorie „biological process“.

In der Grafik ist der GO-Begriff „immune response“ mit einer Auswahl der zugehörigen Tochter-GO-Begriffe dargestellt. Die signifikant hochregulierten Probesets (Anhang A.9) wurden mit der Affymetrix™-GO-Analyse ausgewertet. Die farblichen Abstufungen von Blau über Violett zu Rot entsprechen den ermittelten Chi-Quadrat-Werten, dabei entsprechen rot dargestellte GO-Begriffe hohen Chi-Quadrat-Werten und blau dargestellte GO-Begriffe niedrigen Chi-Quadrat-Werten. Hohe Werte weisen auf eine signifikante Häufung der mit dem GO-Begriff annotierten Probesets bzw. auf eine mögliche Bedeutung in der

Atherosklerose der Maus hin.

A antigen presentation



B antigen processing

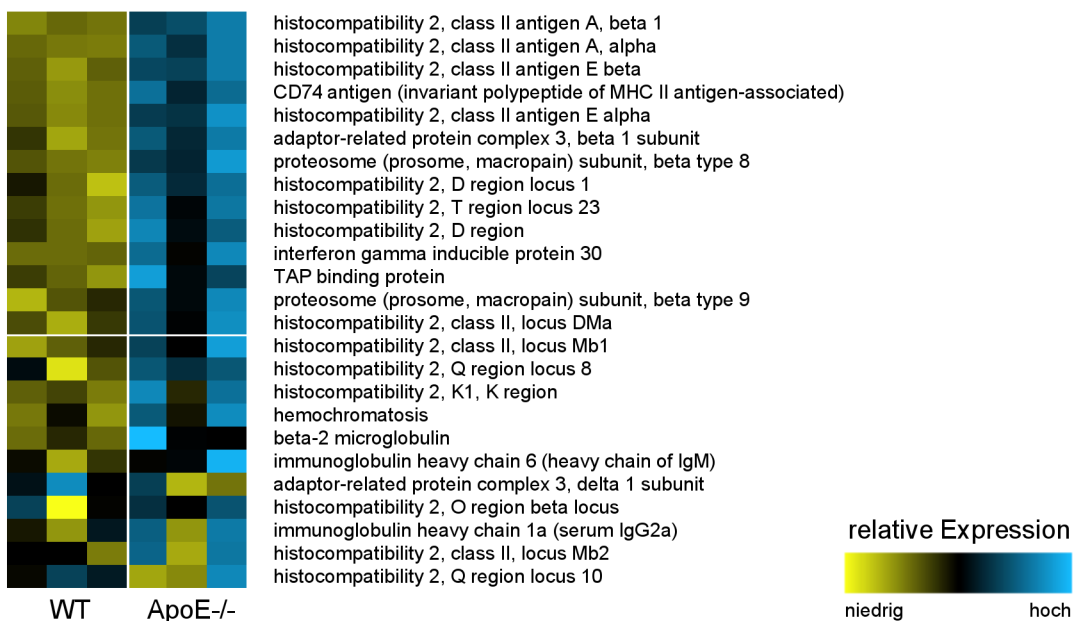


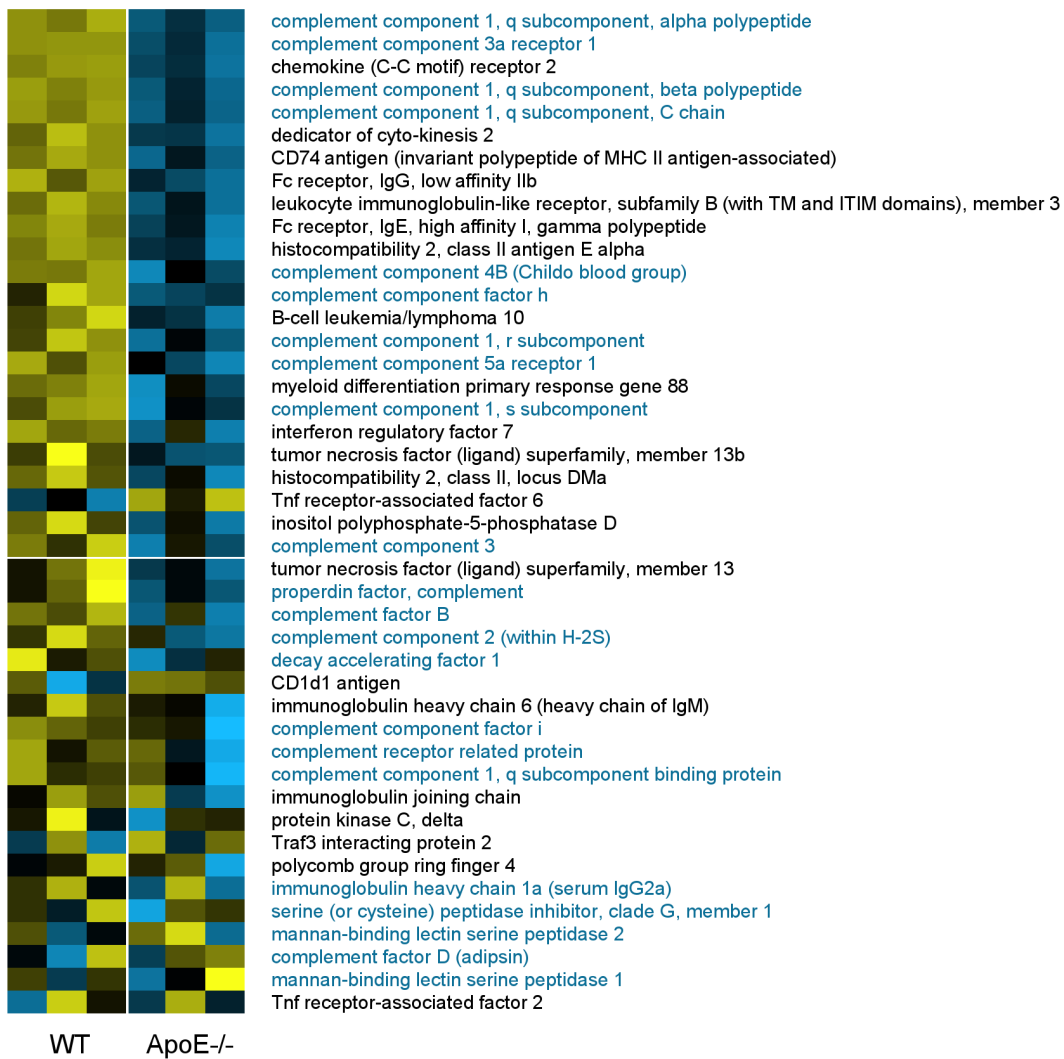
Abb. 29: Heatmap von in der Aorta exprimierten Genen, die mit den GO-Begriffen „antigen presentation“ (A) und „antigen processing“ (B) annotiert sind.

Die Rohdatenwerte wurden nach Probesets gefiltert, die einen *present call* in mindestens 2 der 3 verwendeten Arrays für WT- oder ApoE^{-/-}-Mäuse besaßen. Die Filterung ergab 23248 Probesets. Bei mehreren Probesets für ein Gen wurde das Probeset mit dem kleinsten p-Wert des ungepaarten t-Tests (WT vs. ApoE^{-/-}) für die Darstellung ausgewählt. Der weiße Querbalken trennt die signifikant regulierten Gene [$p \leq 0,1$ (Benjamini and Hochberg 1995)] von den nicht signifikant regulierten Genen.

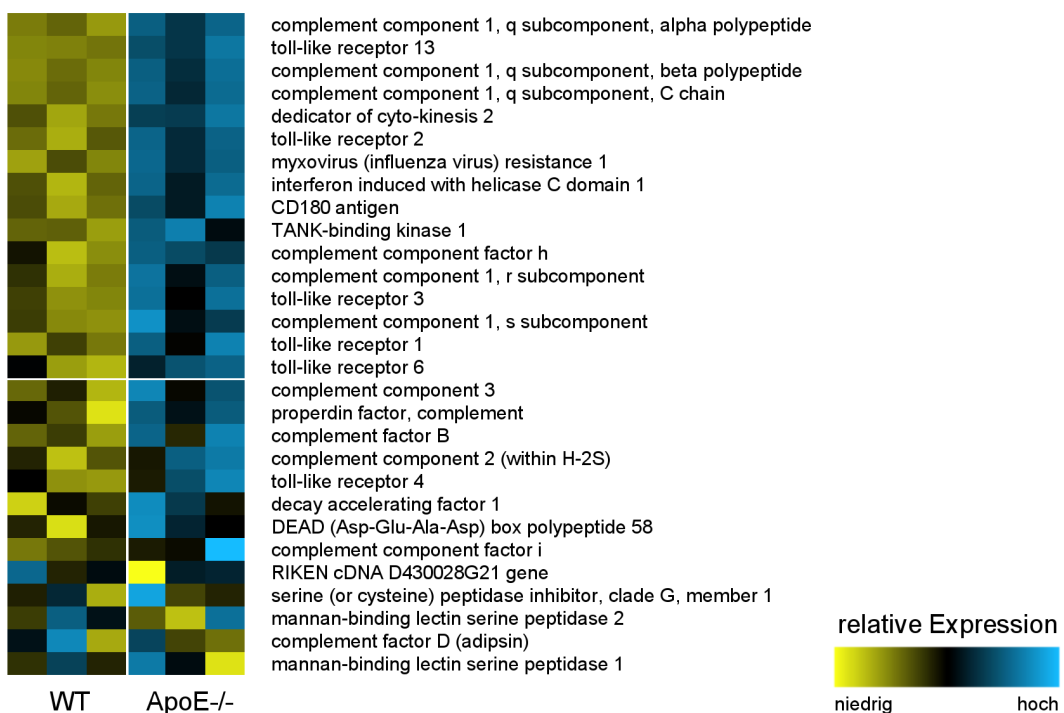
Abb. 30: Heatmap von in der Aorta exprimierten Genen, die mit den GO-Begriffen „*humoral immune response*“ (A) und „*innate immune response*“ (B) annotiert sind.

Die Rohdatenwerte wurden nach Probesets gefiltert, die einen *present call* in mindestens 2 von den 3 verwendeten Arrays für WT oder ApoE^{-/-}-Mäuse besaßen. Die Filterung ergab 23248 Probesets. Bei mehreren Probesets für ein Gen wurde das Probeset mit dem kleinsten p-Wert des ungepaarten t-Tests (WT vs. ApoE^{-/-}) für die Darstellung ausgewählt. Der weiße Querbalken trennt die regulierten Gene [$p \leq 0,1$ (Benjamini and Hochberg 1995)] von den nicht regulierten Genen. In Abbildung 30A sind die Gene farblich hervorgehoben, die ebenfalls mit dem GO-Begriff „*complement activation*“ annotiert sind.

A humoral immune response



B innate immune response



3.2.3 Signalwege in der atherosklerotischen Aorta der ApoE^{-/-}-Maus

Eine weitere Möglichkeit der Auswertung von Microarraydaten, neben der GO-Analyse, ist die Nutzung von KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <http://www.genome.jp/kegg/>). Auf der Website können ein oder mehrere Listen von Genen eingegeben werden, die den bisher aufgeklärten Signalwegen verschiedener biologischer Prozesse zugeordnet werden. Es ist sowohl die Anzeige sortierter Genlisten (annotierte Gene und nicht zugeordnete Gene) als auch eine grafische Darstellung von Signalwegen möglich. Ebenso wie die Annotation von AffymetrixTM-Probesets und *Gene Ontology* wird auch KEGG aktualisiert und erweitert; alle Analysen wurden mit der KEGG-Datenbank von September 2006 durchgeführt. Es wurden 73 Signalwege ermittelt, die mindestens eins der in den atherosklerotischen Aorten signifikant hochregulierten Gene enthielten, wobei 14 Signalwege mehr als drei der hochregulierten Gene beinhalteten. Tabelle 3 zeigt die 14 Signalwege, die eine mögliche biologische Bedeutung für die Atherosklerose und für das Remodeling der Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen haben könnten. Der Signalweg „*Antigen processing and presentation*“ (Tab. 3; siehe auch 4.6, Abb. 34) zeigt, dass nur die am MHC II-Weg beteiligten Gene in der atherosklerotischen Aorta signifikant hochreguliert waren bzw. nur sehr wenige Gene konstitutiv exprimiert waren, während die am MHC I-Weg beteiligten Gene ausschließlich konstitutiv exprimiert waren. Die GO-Analyse zeigte ebenfalls, dass GO-Begriffe, die sich auf Antigenpräsentation und -prozessierung und insbesondere auf den MHC II-Weg beziehen, signifikant überrepräsentiert waren. So wurde durch beide Auswertungsmethoden eine spezifische Aktivität des MHC II-Weges nachgewiesen, was auf eine mögliche Bedeutung von Antigenpräsentation und -prozessierung in der atherosklerotischen Aorta schließen lässt. Die Signalwege „*Cytokine-cytokine receptor interaction*“, „*Cell adhesion molecules (CAMs)*“ und „*Focal adhesion*“ weisen auf eine mögliche Beteiligung von Zytokinen, deren Rezeptoren und von Adhäsionsmolekülen an der Atherosklerose und an Remodelingprozessen in der Aorta von ApoE^{-/-}-Tieren hin.

Tabelle 3: KEGG-Signalwege, die in der atherosklerotischen Aorta von Bedeutung sein könnten

KEGG-Signalweg	KEGG-Nummer	Anzahl der signifikant regulierten Gene
Cytokine-cytokine receptor interaction*	mmu04060	21 (9,1 % von 231)
Leukocyte transendothelial migration	mmu04670	12 (5,2 % von 231)
Cell adhesion molecules (CAMs)*	mmu04514	11 (4,8 % von 231)
Natural killer cell mediated cytotoxicity	mmu04650	11 (4,8 % von 231)
Hematopoietic cell lineage*	mmu04640	10 (4,3 % von 231)
B cell receptor signaling pathway	mmu04662	10 (4,3 % von 231)
Focal adhesion	mmu04510	8 (3,5 % von 231)
Antigen processing and presentation	mmu04612	8 (3,5 % von 231)
Jak-STAT signaling pathway	mmu04630	8 (3,5 % von 231)
MAPK signaling pathway	mmu04010	7 (3,0 % von 231)
Fc epsilon RI signaling pathway	Mmu04664	6 (2,6 % von 231)
T cell receptor signaling pathway	Mmu04660	5 (2,2 % von 231)
ECM-receptor interaction*	Mmu04512	5 (2,2 % von 231)
Wnt signaling pathway	Mmu04310	4 (1,7 % von 231)

*keine klassischen Signalwege, sondern eine Zusammenfassung der bekannten Zytokine, Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und der zellspezifischen Marker von hämatopoetischen Zellen

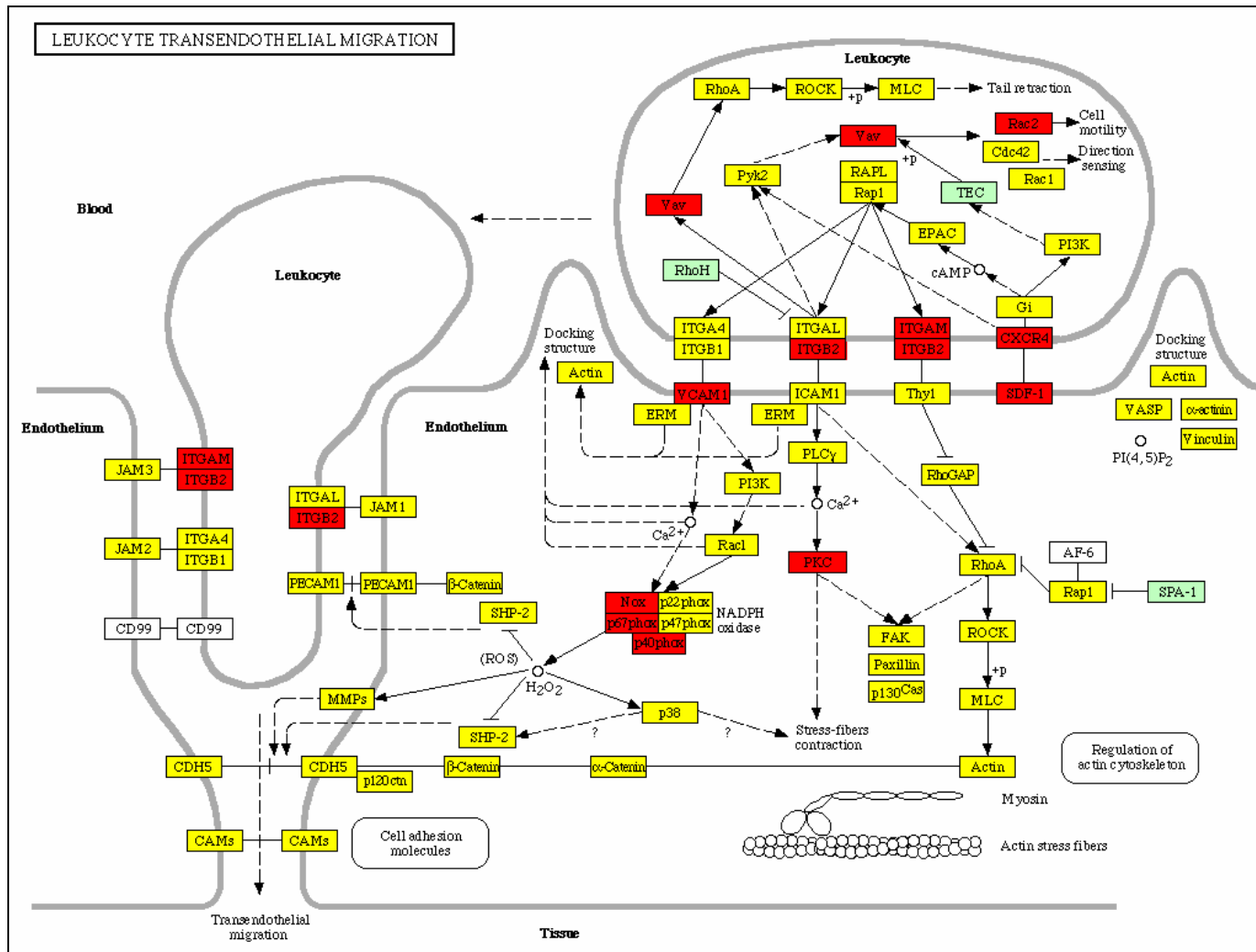


Abb. 31 Signalweg (KEGG) der Adhäsion und transendothelialen Migration von Leukozyten durch das Endothel.

Die Grafik zeigt schematisch die Gene, die an der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen und der Migration von Leukozyten aus dem Blut durch die Endothelbarriere beteiligt sind. Gelb dargestellt sind Gene, die in der Aorta der ApoE^{-/-}-Tiere konstitutiv exprimiert bzw. *present* waren und gegenüber WT-Aorten keine Regulation aufwiesen. Rot dargestellt sind Gene, die in den ApoE^{-/-}-Aorten signifikant hochreguliert waren. Für grün dargestellte Gene wurde mittels Microarray keine Expression nachgewiesen; zu weiß dargestellten Genen sind in der Datenbank keine Informationen vorhanden.

Abbildung 31 zeigt den Signalweg „Leukocyte transendothelial migration“, wobei 5,2 % (siehe Tab. 3) aller in der ApoE^{-/-}-Aorta signifikant hochregulierten Gene zu diesem Signalweg gehören. Vor allem Gene von Adhäsionsmolekülen [Vcam-1, Itgb2 (Integrin beta 2) und Itgam (Integrin alpha M)], das Chemokine SDF-1α (*stromal derived factor 1α*) und dessen Rezeptor Cxcr4 sowie Enzyme, die in die intrazelluläre Signalkaskade der aktivierten Leukozyten und Endothelzellen involviert sind, waren in ApoE^{-/-}-Aorten signifikant hochreguliert (Abb. 31). Lediglich für 3 Gene des Signalwegs konnte mittels Microarray keine Expression (weder konstitutiv noch differentiell) nachgewiesen werden, jedoch können auch diese Gene exprimiert sein, da möglicherweise keine Probesets auf dem GeneChip[®] vorhanden sind bzw. die Probesets zu keinem Messergebnis führten (z.B. war das Probeset für Mip-1α im Microarray *absent*, aber nach Überprüfung mittels qRT-PCR war Mip-1α in den ApoE^{-/-}-Aorten exprimiert, siehe Abb. 32).

3.2.4 Expression von Zytokinen, Chemokinen, Chemokinrezeptoren und ECM-degradierenden Proteinasen in der Aorta von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen

Neben der Durchführung von genomweiten Expressionsstudien wurden ausgewählte Gene mittels qRT-PCR bestimmt. Für die in ApoE^{-/-} gegenüber WT-Aorten signifikant hochregulierten Gene Mcp-1, Ccr2, Ccr5, Cathepsin S, Mmp-13, Timp-1, Osteopontin, Vcam-1, Socs3 und Bcl2A1a (Anhang A.9) wurde durch PCR-Analysen die erhöhte Expression in atherosklerotischen Gefäßen bestätigt; es wurden folgende p-Werte (n = 5 – 6) ermittelt: Mmp-13 (p < 0,05); Mcp-1, Timp-1 und Cathepsin S (p < 0,005); Osteopontin, Vcam-1 und Ccr5 (p < 0,001); Ccr2, Socs3 und Bcl2A1a (p < 0,0005). Des Weiteren wurde die Expression von Genen bestimmt, die in den Microarrayanalysen keine differentielle Expression aufwiesen (Mip-1α, Ccr1, TNFα und IL-1β). Abbildung 32 zeigt die Expression des Chemokins Mip-1α und der spezifischen Chemokinrezeptoren Ccr1 und Ccr5 in der Mauseorta. Obwohl nur für Ccr5 mittels Microarray eine erhöhte Expression nachgewiesen wurde, konnte durch die PCR auch eine signifikant erhöhte Expression von Mip-1α und Ccr1 in den Aorten der ApoE^{-/-} gegenüber WT-Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 32); diese Gene waren auch in der A. carotis communis nach intraluminarer Schädigung exprimiert (siehe Abb. 18). Da auch TNFα, IL-1β und IL-6 in der geschädigten A. carotis communis nachgewiesen wurden (siehe Abb. 21), aber nur für IL-6 mittels Microarray eine signifikant erhöhte Expression in der Aorta nachgewiesen wurde, wurde die Expression der proinflammatorischen Zytokine mittels PCR in der Aorta untersucht, um mögliche Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Expression zwischen atherosklerose-unabhängigen und atherosklerose-abhängigen Remodeling-prozessen zu finden. Die Expression von IL-1β und IL-6 war in den Aorten der ApoE^{-/-} gegenüber WT-Mäusen signifikant erhöht, jedoch konnte für TNFα keine erhöhte Expression in der atherosklerotischen Aorta nachgewiesen werden; eine geringe Basisexpression war in den Aorten beider Mauspopulationen vorhanden (Abb. 33).

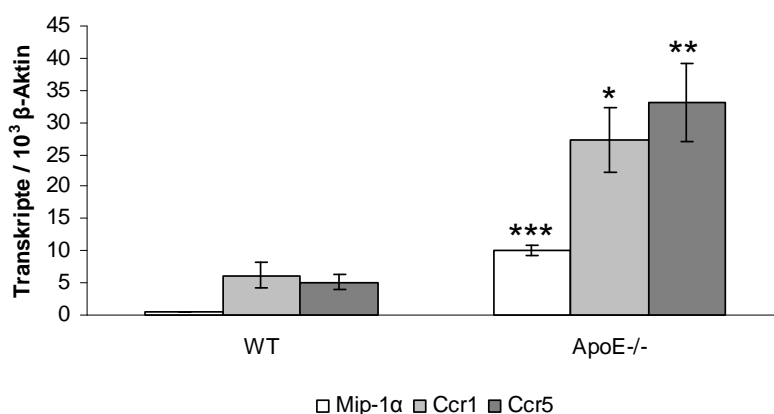


Abb. 32: Expression von Mip-1α und der spezifischen Rezeptoren Ccr1 und Ccr5 in der Aorta von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen.

Die Expression wurde in individuellen Gefäßen mittels qRT-PCR bestimmt. Mip-1α war in der WT-Aorta nicht exprimiert, während die Chemokinrezeptoren Ccr1 und Ccr5 gering exprimiert waren. Sowohl die Expression des Chemokins als auch der Chemokinrezeptoren waren in den atherosklerotischen Aorten der ApoE^{-/-}-Mäuse signifikant erhöht.

Mittelwerte ± SEM, n = 5 – 6

* p < 0,005; ** p < 0,001; *** p < 0,00001 ApoE^{-/-} vs. WT

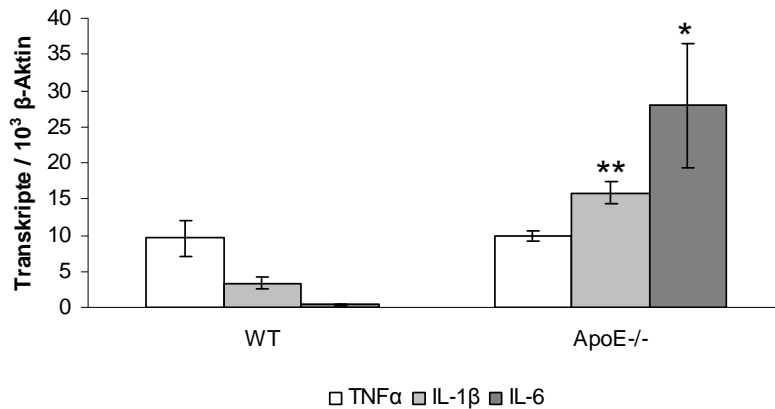


Abb. 33: Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 in der Aorta von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen.

Die Expression wurde in individuellen Gefäßen mittels qRT-PCR bestimmt. IL-1 β und IL-6 waren in der WT-Aorta auf geringem Niveau bzw. nicht exprimiert, die Aorta der ApoE^{-/-}-Mäuse wies für beide Zytokine eine signifikant erhöhte Expression auf. TNF α war in der Aorta von WT- und ApoE^{-/-}-Tieren auf gleichem Niveau exprimiert.

Mittelwerte \pm SEM, n = 5 – 6

* p = 0,01; ** p < 0,00005 ApoE^{-/-} vs. WT

Mit Hilfe des Microarray wurde die Expression zahlreicher C-C-Chemokine wie Mcp-1 (siehe 1.3), Mrp-1 (*macrophage inflammatory protein-related protein 1*, Ccl6), Mcp-3 (Ccl7), Mcp-2 (Ccl8), Mip-1 γ (Ccl9) und Mcp-5 (Ccl12) in der Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen nachgewiesen (siehe Anhang A.9). Mcp-3 ist ein Ligand der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr3 (Kim 2004); eine Expression von Mcp-3 wurde in humanen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen; Mcp-3 konnte *in vitro* durch oxLDL induziert werden (Jang, Kim et al. 2004) und wurde auch in der A. carotis der Ratte nach Endothelschädigung exprimiert (Wang, Li et al. 2000). Die Expression von Mip-1 γ (Rezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr3) konnte in Peritonealmakrophagen von WT-Mäusen durch eine atherogene Diät induziert werden; *in vitro* wurde die Mip-1 γ -Expression in Makrophagen durch oxLDL stimuliert (Yu, Park et al. 2002). Die Expression von Mcp-1 und -5 (Rezeptor Ccr2) nahm mit dem Fortschreiten der Atherosklerose zu; die Expression war mit Makrophagen im Plaque kolokalisiert (Lutgens, Faber et al. 2005). Die C-X-C-Chemokine Cxcl1, Cxcl5, Cxcl13 und Cxcl16 (siehe 1.3) waren ebenfalls in atherosklerotischen ApoE^{-/-}- im Vergleich zu WT-Aorten signifikant hochreguliert (siehe Anhang A.9). Die Expression von Cxcl1 kann durch hämodynamischen Stress in Endothelzellen (Hagiwara, Mitsumata et al. 1998) und durch oxidierte Phospholipide in der Arterienwand induziert werden (Hagiwara, Mitsumata et al. 1998; Furnkranz, Schober et al. 2005); Cxcl1 ist an der Akkumulation von Makrophagen im Plaque sowie am Plaquewachstum beteiligt (Boisvert, Rose et al. 2006). Neben den durch die qRT-PCR verifizierten, in der atherosklerotischen Aorta signifikant hochregulierten Proteinasen Mmp-13 und Cathepsin S, waren noch weitere Proteinasen in ApoE^{-/-}- im Vergleich zu WT-Aorten hochreguliert. Unter anderem waren Mmp-12, die membrangebundene Mmp-14 sowie die Cathepsine L und K in der atherosklerotischen Aorta signifikant hochreguliert (siehe Anhang A.9). Diese Proteinase sind nicht nur für Remodelingprozesse von Bedeutung, sie sind auch an der Modulation der Immunantwort durch proteolytische Spaltung von Chemokinen und Zytokinen (McQuibban, Butler et al. 2001; McQuibban, Gong et al. 2002; Van Lint and Libert 2007) sowie an der Antigenprozessierung durch proteolytische Spaltung von Antigenen und der invariablen Untereinheit des MHC II-Moleküls beteiligt (Liu and Spero 2004).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende wesentliche Beobachtungen gemacht:

1. Durch eine intraluminale mechanische Schädigung der Gefäßwand wurde in der A. carotis communis von WT- und hyperlipidämischen ApoE^{-/-}-Mäusen eine Deendothelialisierung erzeugt und ein daraus resultierendes arterielles Remodeling induziert; hierbei wiesen die ApoE^{-/-}-Mäuse eine stärkere Gefäßreaktion hinsichtlich der gemessenen morphometrischen Parameter auf.
2. Die Deendothelialisierung induzierte die Proliferation von Zellen in der *Lamina media* und führte zum Auftreten von Makrophagen, B- und T-Lymphozyten in der Arterienwand. Die Endothelschädigung induzierte die Expression von proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-1 β , TNF α), Chemokinen und deren Rezeptoren (Mip-1 α , Ccr1, Ccr5, Mcp-1, Ccr2) in WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen. Zwischen beiden Mauspopulationen gab es keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Gefäßschädigung.
3. Alle proinflammatorischen Zytokine, Chemokine und Chemokinrezeptoren, die durch die Deendothelialisierung in der A. carotis induziert wurden, wiesen mit Ausnahme von TNF α auch in atherosklerotischen Aorten von ApoE^{-/-}- gegenüber WT-Mäusen eine signifikant erhöhte Expression auf.
4. Die Schädigung des Gefäßendothels der A. carotis führte bei WT-Mäusen zu einer signifikanten Zunahme der Expression von ECM-degradierenden Proteinasen (Mmp-13, Cathepsin S) und des endogenen Mmp-Inhibitors Timp-1. Bei hyperlipidämischen ApoE^{-/-}-Mäusen konnte keine Induktion der Proteinasen durch die Endothelschädigung beobachtet werden. Mmp-13 und Cathepsin S waren bereits in den nichtgeschädigten Kontrollgefäßen der ApoE^{-/-}-Mäuse stark exprimiert; das Expressionsniveau entsprach demjenigen bei WT-Tieren nach der Schädigung.
5. Die Induktion der Expression von Osteopontin durch die intraluminale Schädigung der A. carotis wurde nur in WT-Tieren beobachtet; in nichtgeschädigten Gefäßen von ApoE^{-/-}-Mäusen war Osteopontin bereits auf hohem Niveau exprimiert. Osteopontin war auch in der Aorta von ApoE^{-/-}- im Vergleich zu WT-Mäusen sehr stark exprimiert; die Expression war mehr als 100-fach erhöht.
6. Genomweite Expressionsstudien (Affymetrix™) von atherosklerotischen ApoE^{-/-}- im Vergleich zu WT-Aorten ergaben 231 signifikant hochregulierte Gene in den Aorten der ApoE^{-/-}-Tiere. Zwei der Gene wurden auch in der A. carotis untersucht und durch die Endothelschädigung in beiden Mauspopulationen induziert. Der Inhibitor von Zytokinsignalwegen Socs3 und das antiapoptotische Protein Bcl2A1a waren auch in den nichtgeschädigten Karotisarterien der ApoE^{-/-}-Mäuse exprimiert; für Bcl2A1a wurde für alle untersuchten Zeitpunkte eine signifikant höhere Expression gegenüber den nichtgeschädigten WT-Gefäßen nachgewiesen.
7. Die Auswertung der genomweiten Expressionsdaten mit Hilfe der GO-Analyse (Affymetrix™) ergab in den GO-Kategorien „*biological process*“ und „*molecular function*“ bzw. in differenzierteren GO-Untergruppen, dass GO-Begriffe, die funktionell der innaten und adaptiven Immunität zugeordnet sind, auffällig überrepräsentiert waren. Darüber hinaus konnte eine signifikant erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen, die vor allem von Immunzellen und aktivierten Endothelzellen exprimiert werden, nachgewiesen werden.

8. Die Auswertung der genomweiten Expressionsdaten mit Hilfe von KEGG zeigte ebenfalls, dass die in atherosklerotischen ApoE^{-/-}- gegenüber WT-Aorten signifikant hochregulierten Gene vor allem immunologischen Signalwegen zugeordnet wurden. Besonders viele der regulierten Gene wurden der Adhäsion und Migration von Leukozyten durch das Endothel sowie der Antigenpräsentation über MHC II zugeordnet, so dass diese Signalwege anhand der konstitutiv exprimierten und signifikant hochregulierten Gene nahezu vollständig rekonstruiert wurden.

4.1. Die Maus als Modellsystem für arterielles Remodeling und Atherosklerose

Die experimentellen Untersuchungen zum arteriellen Remodeling wurden an zwei verschiedenen Mauspopulationen durchgeführt, den C57BL/6J-Mäusen und den hyperlipidämischen ApoE^{-/-}-Mäusen mit C57BL/6J-Hintergrund. Die kurze Generationszeit der Mäuse und die Ausprägung atherosklerotischer Gefäßveränderungen bei vorhandener Atherosklerosesuszeptibilität innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne stellten besonders gute Voraussetzungen zur Durchführung der beschriebenen Versuche dar. Während bei Mausstämmen wie den LDL-R^{-/-}-Mäusen eine Atherosklerose nur durch Fütterung einer atherogenen Diät erreicht werden kann (Ishibashi, Goldstein et al. 1994), entwickeln ApoE^{-/-}-Mäuse bereits bei Fütterung einer Standarddiät altersabhängige und reproduzierbare atherosklerotische Gefäßveränderungen (Moos 2005; Moos, John et al. 2005), deren Morphologie denjenigen humaner atherosklerotischer Plaques ähnelt (Coleman, Hayek et al. 2006). Die ApoE^{-/-}-Maus wird vorwiegend als Modell zur Untersuchung der Atherosklerose angesehen; die Kenntnisse über die Auswirkungen des ApoE-Knockouts auf andere Organe und Organsysteme sind hingegen limitiert und es fehlen umfangreiche vergleichende Analysen von WT- und ApoE^{-/-}-Tieren. So zeigten Feingold et al., dass in der Haut von ApoE^{-/-}-Mäusen Schaumzellen vorkommen, deren Auftreten durch Applikation einer atherogenen Diät dramatisch erhöht wurde (Feingold, Elias et al. 1995). In eigenen Fütterungsexperimenten konnten wir ebenfalls Lipidablagerungen in der Haut (Xanthome) beobachten (Daten nicht gezeigt). Neben seiner Funktion im Lipidstoffwechsel und der bei einem ApoE-Defizit daraus resultierenden Hyperlipidämie und Atherosklerose wird eine Beteiligung von ApoE auch bei neurodegenerativen und viralen Erkrankungen wie z.B. dem Morbus Alzheimer diskutiert (Poirier 2005; Hill, Bhattacharjee et al. 2006). Zudem gibt es Hinweise auf eine immunmodulatorische Funktion von ApoE; ApoE^{-/-}-Mäuse wiesen gegenüber WT-Mäusen nach Impfung mit Tetanustoxid erhöhte IgM-Werte im Serum auf und zeigten eine verminderte antigen-spezifische Immunreaktion nach lokaler Injektion von Tetanustoxid bei vorangegangener Immunisierung der Tiere (Laskowitz, Lee et al. 2000).

Die Vergleichbarkeit von Studien verschiedener Forschergruppen untereinander kann problematisch sein, da viele Einrichtungen eine eigene Tierzucht besitzen und die Herkunft der Tiere und der damit verbundene spezifische genetische Hintergrund die jeweiligen Untersuchungsergebnisse beeinflussen kann. Unterschiede im genetischen Hintergrund der C57BL/6-Mauspopulationen entstehen, wenn über mehrere Generationen eine isolierte Zucht einer kleinen Population des Inzucht-Stammes zu Veränderungen des Genpools führt bzw. die Entwicklung von Subpopulationen begünstigt (*genetic drift*). Diese Beobachtungen wurden bereits in den 1970-iger Jahren gemacht und dokumentiert (Hoi-Sen 1972; Eisen and Hanrahan 1974). Die in unseren Experimenten verwendeten Tiere stammen von *The Jackson Laboratory* (USA), wobei aus je 4 Zuchtpaaren eine eigene Mauspopulation aufgebaut wurde. *The Jackson Laboratory* führt regelmäßige Rückkreuzungen sowie die Erneuerung der dort erhältlichen Mauspopulationen mit gefrierkonservierten Embryonen durch, um der genetischen Drift entgegenzuwirken. Außerdem wird

empfohlen, dass ab der 10. Generation einer isolierten Zucht die Tiere einen Zusatz zur Stammbezeichnung erhalten sollten, der auf die Herkunft der Tiere verweist. Unsere Tiere wurden im Jahr 2001 bei *The Jackson Laboratory* gekauft und befanden sich zur Zeit der Versuchsdurchführung in der 7. – 8. Generation. Ein weiterer Nachteil der Vergleichbarkeit verschiedener Studien untereinander ist die Verwendung atherogener Diäten, die in ihrer Zusammensetzung und Applikationsdauer variieren. Die Fütterung einer atherogenen Diät ist sehr verbreitet, da diese Diäten die Entwicklung atherosklerotischer Gefäßveränderungen stark beschleunigen und somit auch in relativ jungen Mäusen Untersuchungen zur Atherogenese durchgeführt werden können. Die von uns verwendeten ApoE^{-/-}-Mäuse entwickelten unter Standarddiät bereits im Alter von 12 Wochen atherosklerotische Plaques im Aortenbogen bzw. in der A. innominata; im Alter von 32 Wochen fanden sich auch Plaques in der Abdominalaorta (Daten nicht gezeigt). Daten aus der Literatur zeigten eine ähnliche Entwicklung bei Fütterung von ApoE^{-/-}-Mäusen mit einer atherogenen Diät ab der 10. Woche für insgesamt 14 Wochen. So waren nach 2 Wochen Diät Plaques im Aortenbogen detektierbar (entspricht unseren 12 Wochen alten Tieren) und nach 14 Wochen auch eine beginnende Atherosklerose in der Abdominalaorta (entspricht unseren 24 Wochen alten Tieren) (Veillard, Steffens et al. 2004). Es muss darauf hingewiesen werden, dass der Einsatz atherogener Diäten zahlreiche Nachteile aufweist, die in der Literatur jedoch häufig nicht erwähnt werden. Atherogene Diäten sind sehr unphysiologisch, insbesondere wenn sie über einen längeren Zeitraum (> 8 Wochen) appliziert werden. Eigene Experimente haben gezeigt, dass die Fütterung von 12 Wochen alten Mäusen mit einer atherogenen Diät, die keine Cholsäure enthielt (Western Diät), über einen Zeitraum von mehr als 12 Wochen zu schweren gesundheitlichen Beeinträchtigungen der Tiere führte wie Haarausfall und großflächigen Xanthomen. Die Xanthome führten in einigen Fällen zur völligen Versteifung von Gliedmaßen, außerdem traten bei einzelnen Tieren in Bereichen, in denen die Xanthome sehr stark ausgeprägt waren, offene, entzündliche Hautläsionen auf, so dass die Experimente abgebrochen wurden. Keine dieser Veränderungen wurde in der Kontrollgruppe mit Normalfutter beobachtet; auch sehr alte ApoE^{-/-}-Mäuse (bis 2 Jahre) waren bei Fütterung einer Standarddiät makroskopisch gesund und vital (Daten nicht gezeigt). Untersuchungen von Moghadasian et al. zeigten dagegen, dass trotz Standarddiät massive, entzündliche Xanthome bei 18 Monate alten ApoE^{-/-}-Mäusen auftraten; die aus diesem Grund getöteten Tiere wiesen auch eine starke Atherosklerose in den Koronargefäßen auf (Moghadasian, McManus et al. 2001). Bei früheren von uns durchgeführten Fütterungsexperimenten mit der Cholsäure enthaltenden Paigen-Diät für 8 Wochen wurde bei den Tieren eine starke Gewichtsreduktion, eine Verdickung der Gelenke sowie makroskopische und mikroskopische Veränderungen von Milz, Leber, Gallenblase und Thymus beobachtet (Moos 2005). Die Entstehung von Xanthomen sowie Veränderungen im Leber- und Nierenparenchym unter einer cholesterolreichen Diät wurden auch von anderen Wissenschaftlern beschrieben (Moghadasian, Nguyen et al. 1999). Zur Induktion von instabilen Plaques bzw. einer Plaqueruptur in der ApoE^{-/-}-Maus ist die Gabe einer atherogenen Diät über einen sehr langen Zeitraum erforderlich (Johnson and Jackson 2001; Williams, Johnson et al. 2002; Johnson, Carson et al. 2005). Derartige Studien konzentrieren sich jedoch in erster Linie auf die atherosklerotischen Gefäßveränderungen und deren Folgen; Angaben zu den Auswirkungen der atherogenen Diäten auf den Gesundheitszustand der Tiere werden kaum gemacht.

Trotz fehlender klinischer Komplikationen der Atherosklerose unter Standarddiät, stellt die ApoE^{-/-}-Maus ein geeignetes Modell zur Untersuchung molekularer Mechanismen von Atherosklerose und arteriellem

Remodeling dar, da der Aufbau und die zelluläre Zusammensetzung sowohl der Gefäßwand als auch der atherosklerotischen Läsion mit derjenigen des Menschen vergleichbar ist. So konnten Gemeinsamkeiten in der Expression von Zytokinen im atherosklerotischen Plaque der Maus und des Menschen gefunden werden (Wuttge, Eriksson et al. 2001). In unseren Untersuchungen war die Expression von Cathepsin S, L und K, Mmp-14 sowie von Osteopontin in den atherosklerotischen Mauseorten signifikant erhöht, die Proteinase wurden auch in humanen Plaques exprimiert (Sukhova, Shi et al. 1998; Rajavashisth, Xu et al. 1999; Liu, Sukhova et al. 2006); die Expression von Osteopontin wurde ebenfalls in humanen atherosklerotischen Gefäßen nachgewiesen (Kwon, Hong et al. 2000). Unterschiede zwischen muriner und humaner Atherosklerose bestehen vor allem hinsichtlich der Lokalisation der atherosklerotischen Gefäßveränderungen. Bei der Maus ist die Atherosklerose weitestgehend auf die Aorta beschränkt und im Gegensatz zum Menschen weniger in den Herzkranzgefäßen zu finden. ApoE^{-/-}-Mäuse sterben im Allgemeinen nicht an den klinischen Komplikationen der Atherosklerose wie z.B. thrombotischen Verschlüssen von koronaren und zerebralen Gefäßen. Möglicherweise existieren bei Mäusen aufgrund ihrer geringen Größe und den dadurch deutlich kleineren Gefäßen andere Strömungsverhältnisse als in den arteriellen Gefäßen des Menschen, weshalb die Prädispositionsstellen für die Entstehung atherosklerotischer Gefäßveränderungen verschieden sind. Weinberg et al. zeigten, dass die hämodynamischen Bedingungen und der daraus resultierende hämodynamische Stress, der auf die Arterienwand einwirkt, sich in der Aorta der Maus und des Menschen deutlich unterscheiden bzw. dass der hämodynamische Stress in der Mauseorta bis zu 20-fach größer ist (Weinberg and Ross Ethier 2007). Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die Studien von Greve et al.; der hämodynamische Stress in der infrarenalen Aorta unterschied sich zwischen Maus, Ratte und Mensch, wobei der hämodynamische Stress in den Mausgefäßen im Vergleich zum Menschen deutlich erhöht war (Greve, Les et al. 2006). Durch Untersuchungen von Cheng et al., die mit Hilfe einer Gefäßmanschette in der A. carotis der ApoE^{-/-}-Maus unter atherogener Diät verschiedene Strömungsbedingungen erzeugten, wurde gezeigt, dass die hämodynamischen Bedingungen im Gefäß entscheidend an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind (Cheng, Tempel et al. 2006).

4.2 Bedeutung des genetischen Hintergrundes für das arterielle Remodeling

Durch die intraluminale Schädigung der Gefäßwand der A. carotis communis konnte sowohl bei WT- als auch bei ApoE^{-/-}-Mäusen ein positives arterielles Remodeling induziert werden. Der Vergleich mit scheinoperierten Gefäßen zeigte, dass dieses Remodeling durch die mechanisch bedingte Deendothelialisierung und nicht durch das operative Vorgehen hervorgerufen wurde. Für verschiedene Modelle der Endothelschädigung (siehe 1.5) wie die perivaskuläre elektrische Schädigung (Carmeliet, Moons et al. 1997), die nicht-invasive photochemische Schädigung (Trieu, Narla et al. 2000), das Ligations-Modell (Kumar and Lindner 1997) und das von uns verwendete Modell der intraluminalen Gefäßwandschädigung (Lindner, Fingerle et al. 1993) wurde die intimale Hyperplasie bzw. Neointimabildung für die Bewertung und Beurteilung der Gefäßreaktion nach der Schädigung verwendet.

Die Bildung einer Neointima konnte in unserem tierexperimentellen Modell, bei dem intraluminal eine mechanische Endothelschädigung durch einen Führungsdraht (*guide wire*) induziert wurde, weder in WT- noch in ApoE^{-/-}-Tieren beobachtet werden; lediglich in einzelnen Fällen fanden sich intraluminal an der Gefäßwand adhären Zellen, die als Leukozyten identifiziert wurden. Auch Modifikationen des experimentellen Vorgehens wie die Reduktion oder Erhöhung der Passagen des Drahtes sowie die Verwendung eines mit Harz beschichteten Fadens (*resin probe*) konnten keine Neointimabildung induzieren

(Daten nicht dargestellt), so dass dieser Parameter für die Bewertung des tierexperimentellen Modells nicht mit herangezogen werden konnte. Das Fehlen der Neointima ist möglicherweise auf den C57BL/6J-Hintergrund zurückzuführen. In den letzten Jahren wurden systematische Untersuchungen an verschiedenen Mausstämmen durchgeführt, die sich deutlich in ihrer Suszeptibilität gegenüber der Entstehung einer Atherosklerose und in ihrer Gefäßreaktion nach einer Schädigung unterscheiden. Dabei wurde gezeigt, dass der genetische Hintergrund ein wesentlicher Faktor ist, der die Suszeptibilität bzw. die Resistenz gegenüber Atherosklerose und arteriellem Remodeling bei der Maus beeinflusst (Harmon, Couper et al. 2000; Wang and Paigen 2002). Die Untersuchung des arteriellen Remodelings an der A. carotis von 11 verschiedenen Mausstämmen unter Verwendung des Ligation-Modells ergab, dass der verwendete Mausstamm die Art des Remodelings entscheidend beeinflusste; vom negativen Remodeling durch intimale Hyperplasie oder Mediahypertrophie bis zu positivem Remodeling mit Zunahme des Lumens waren alle Formen des arteriellen Remodelings zu beobachten. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wurden vom verwendeten Mausstamm abhängige Unterschiede in der Proliferation der SMCs beobachtet (Harmon, Couper et al. 2000). Der Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Neointimabildung nach intraluminaler Schädigung der A. carotis (*resin probe*) wurde auch von Kuhel et al. untersucht (Kuhel, Zhu et al. 2002). Bei allen verwendeten Mausstämmen war die Mediafläche 14 Tage nach der Schädigung gegenüber den Kontrollgefäßen vergrößert bzw. verdickt, bei der Ausbildung der Neointima traten deutliche Unterschiede auf. Die Deendothelialisierung der A. carotis führte im C57L/J-Stamm zu einem fast vollständigen Gefäßverschluss, während C57BL/6J-Tiere nahezu resistent gegenüber der Bildung einer Neointima waren. Eine Verdickung und Vergrößerung der Mediafläche ohne Neointimabildung wurde auch von uns in der C57BL/6J-WT-Maus nach Schädigung der A. carotis beobachtet.

Die Kreuzung des resistenten C57BL/6J- und des suszeptiblen C57L/J-Mausstammes ergab neointima-resistente F1-Hybride, möglicherweise wird die Neointima-Suszeptibilität rezessiv vererbt. Die Rückkreuzung der F1-Mausgeneration mit dem suszeptiblen C57L/J-Elternstamm ergab Hybrid-Tiere, die zum größten Teil resistent gegenüber einer Neointimabildung waren, aber auch suszeptible Tiere mit starker Neointima sowie graduelle Abstufungen von einer stark ausgeprägten bis zu einer nur schwach ausgebildeten Neointima (Kuhel, Zhu et al. 2002). Eine intraluminale Endothelschädigung (*guide wire* oder *resin probe*) der A. carotis bei ApoE^{-/-}-Mäusen mit C57BL/6J- oder C3H/HeJ-Hintergrund zeigte ebenfalls Unterschiede in der Neointimabildung, die im ApoE^{-/-}-C57BL/6J-Mausstamm wesentlich stärker ausgeprägt war als in den Tieren mit C3H/HeJ-Hintergrund; eine Erklärung für diese Unterschiede gibt es gegenwärtig noch nicht (Shi, Pei et al. 2004). Ähnliche Unterschiede zwischen diesen beiden Stämmen wurden auch bei der Ausprägung der Atherosklerose in der Aorta beobachtet (Shi, Wang et al. 2000; Smith, James et al. 2003) (siehe 4.3).

Möglicherweise ist das arterielle Remodeling nicht nur vom genetischen Hintergrund abhängig, sondern auch vom verwendeten arteriellen Gefäß. Sata et al. verwendeten die A. femoralis für ihr Modell der intraluminalen Endothelschädigung und zeigten, dass in 4 verschiedenen Mausstämmen eine reproduzierbare Neointima in der A. femoralis induziert werden konnte einschließlich in dem für die A. carotis resistenten C57BL/6J-Mausstamm (Sata, Maejima et al. 2000). Die Bildung einer Neointima in der A. femoralis der Maus nach Schädigung des Endothels wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Roque, Fallon et al. 2000). In humanen Gefäßen sind Art und Ausdehnung des arteriellen Remodelings ebenfalls von der

Lokalisation sowie von eventuellen morphologischen Veränderungen des betroffenen Gefäßes abhängig (Pasterkamp, Schoneveld et al. 1997; Pasterkamp, Galis et al. 2004).

4.3 Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Atherosklerose

Nicht nur das durch eine experimentelle Endothelschädigung induzierte arterielle Remodeling, sondern auch die Entstehung und das Fortschreiten der Atherosklerose werden durch den genetischen Hintergrund des verwendeten Mausstamms beeinflusst (Rader and Pure 2000). Schon Mitte der 1980-iger Jahre wiesen Paigen et al. auf die Bedeutung des genetischen Hintergrundes bei der Entstehung der Atherosklerose in der Maus hin (Paigen, Morrow et al. 1985). Zehn verschiedene Maus-Inzuchtstämme wurden mit einer atherogenen Diät gefüttert, die neben einem erhöhten Fettgehalt auch Cholesterin und Cholsäure enthielt. Die Untersuchungen der Cholesterin- und Triglyzeridwerte im Plasma sowie der morphologischen Veränderungen in der Aorta, insbesondere im Bereich der Aortenwurzel, ergaben deutliche Unterschiede zwischen den Mausstämmen. Der C57BL/6J-Mausstamm wurde als atherosklerose-suszeptibel und die Stämme BALB/cJ und C3H/HeJ wurden als atherosklerose-resistent bei Fütterung einer atherogenen Diät identifiziert.

Die Generierung von ApoE^{-/-}-Mäusen, die bereits bei Fütterung einer Standarddiät atherosklerotische Läsionen in der Aorta ausbilden, ermöglichte die Untersuchung von fortgeschrittenen Plaques mit einer ähnlich komplexen Morphologie wie sie atherosklerotische Plaques des Menschen aufweisen. ApoE^{-/-}-Mäuse sind deshalb ein etabliertes Atherosklerose-Modell; aufgrund der Atherosklerose-Suszeptibilität des C57BL/6-Mausstammes werden meistens ApoE^{-/-}-Mäuse mit diesem genetischen Hintergrund verwendet. Eine Einkreuzung des ApoE-Knockouts in atherosklerose-resistente Mausstämmen eröffnet jedoch die Möglichkeit herauszufinden, welche Unterschiede im genetischen Hintergrund für die Atherosklerose-Suszeptibilität bzw. -Resistenz verantwortlich sind. So wurden von Smith et al. sechs ApoE^{-/-}-Mauspopulationen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund hinsichtlich der Atheroskleroseausprägung im Aortenbogen analysiert und es konnte eine Reihenfolge der Atherosklerose-Empfindlichkeit der verschiedenen Mausstämmen erstellt werden: DBA/2J > C57BL/6 > 129/SV-ter > AKR/J ≈ BALB/cByJ ≈ C3H/HeJ. Durch die Analyse und Korrelation der genetischen und phänotypischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen wurden fünf chromosomale Regionen identifiziert, auf denen die für die Atherosklerose-Empfindlichkeit verantwortlichen Gene lokalisiert sein könnten (Smith, James et al. 2003). Morphologische Studien bestätigten die Abhängigkeit der Ausprägung der Atherosklerose vom genetischen Hintergrund. Shi et al. verwendeten ApoE^{-/-}-Mäuse mit C57BL/6J- und C3H/HeJ-Hintergrund und konnten deutliche Unterschiede in der Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen bzw. der Ausprägung von Plaques in der Aorta beobachten. Trotz der höheren Plasmalipidspiegel in ApoE^{-/-}-C3H/HeJ-Mäusen sowohl unter Normalfutter als auch bei atherogener Diät waren in den ApoE^{-/-}-C57BL/6J-Mäusen die atherosklerotischen Läsionen deutlich größer als bei den ApoE^{-/-}-C3H/HeJ-Mäusen. Die *in vitro*-Kultivierung von Endothelzellen der beiden Mausstämmen zeigte, dass Endothelzellen, die von Mäusen mit C57BL/6J-Hintergrund abstammten, nach Stimulation mit modifiziertem LDL eine starke Expression von Mcp-1, M-Csf und Vcam-1 aufwiesen, während in Endothelzellen von ApoE^{-/-}-Tieren mit C3H/HeJ-Hintergrund diese Gene nur schwach induziert wurden. Für die unterschiedliche Atherosklerose-Empfindlichkeit der beiden Stämme *in vivo* werden in erster Linie die Endothelzellen und nicht die Monozyten oder die Höhe des Lipidspiegels verantwortlich gemacht. (Shi,

Wang et al. 2000). Histologische Untersuchungen zeigten, dass das Ausmaß der Atherosklerose jedoch nicht mit Veränderungen in der *Lamina media* korreliert; so fanden sich im ApoE^{-/-}-C3H/HeJ Mausstamm eine vermehrte Destruktion der Media, eine erhöhte proteolytische Aktivität von Mmps und eine deutliche Tendenz zur Ausprägung von Aneurysmen (Shi, Wang et al. 2000; Shi, Brown et al. 2003). Genomweite Expressionsanalysen von Aorten des resistenten C3H/HeJ- und des suszeptiblen C57BL/6J-WT-Mausstammes identifizierten 311 differentiell exprimierte Gene, die mögliche Kandidatengene für die unterschiedliche Atherosklerose-Suszeptibilität dieser beiden Stämme darstellen könnten, wobei in den C57BL/6J-Mäusen deutlich mehr Gene exprimiert waren (Tabibiazar, Wagner et al. 2005). Die Untersuchung von ApoE^{-/-}-Tieren mit C3H/HeJ- und C57BL/6J-Hintergrund unter Standarddiät und atherogener Diät für maximal 40 Wochen ergab verschiedene Gengruppen, die im Verlauf der Atherosklerose in ihrer Expression zu- oder abnahmen. Die in ihrem Expressionsniveau gestiegenen Gene konnten zu einem großen Teil den im C57BL/6J-WT, diejenigen aus den Gruppen mit kleiner werdendem Expressionsniveau den im C3H/HeJ-WT exprimierten Genen zugeordnet werden. Die Unterschiede in der Genexpression deuten darauf hin, dass beim Vorliegen eines entsprechenden atherogenen Stimulus im C57BL/6J-WT vorwiegend Gene exprimiert werden, die mit entzündlichen und Immunreaktionen assoziiert sind (Tabibiazar, Wagner et al. 2005).

Morphologische Untersuchungen von ApoE^{-/-}-Mäusen mit dem ebenfalls weitestgehend atherosklerose-resistenten FVB/NJ-Hintergrund im Vergleich zum suszeptiblen C57BL/6J-Hintergrund zeigten, dass die ApoE^{-/-}-FVB/NJ-Mäuse eine verminderte Ausprägung von atherosklerotischen Läsionen gegenüber ApoE^{-/-}-C57BL/6J-Mäusen sowohl unter Normalfutter als auch unter atherogener Diät (Western Diät) aufwiesen, obwohl die Cholesterolspiegel im Plasma der ApoE^{-/-}-FVB/NJ-Mäuse deutlich höher waren. Die Kreuzung der beiden unterschiedlich atherosklerose-suszeptiblen ApoE^{-/-}-Mausstämme und die Untersuchung der F1-Generation zeigte die Ausprägung intermediärer atherosklerotischer Läsionen (Dansky, Charlton et al. 1999) was für eine mögliche kodominante Vererbung der Resistenz bzw. der Suszeptibilität gegenüber der Atherosklerose sprechen würde.

4.4 Morphologische Charakterisierung der Gefäßveränderungen nach Endothelschädigung

Die mechanische intraluminale Schädigung der Gefäßwand der A. carotis communis, die in Anlehnung an die von Lindner et al. beschriebene Methode erfolgte, führte zu einer fast vollständigen Entfernung des Gefäßendothels; die Deendothelialisierung wurde *in vivo* durch Färbung mit Evans Blau nachgewiesen. Im Gegensatz zu Lindner et al., die eine vollständige Reendothelialisierung des Gefäßes erst nach 21 Tagen feststellten (Lindner, Fingerle et al. 1993), konnten wir diese anhand der Evans Blau-Markierung bereits nach 14 Tagen beobachten. Auch Cheung et al. konnten nach 14 Tagen noch keine vollständige Reendothelialisierung der A. carotis beobachten; die Evans Blau-Färbung zeigte, dass erst 80 % des Gefäßes mit einer neuen Endothelzellschicht bedeckt waren (Cheung, D'Andrea et al. 1999). Wir konnten an Gefäßschnitten durch die Markierung von Endothelzellen mit dem Marker von Willebrand Faktor zeigen, dass durch die intraluminale Schädigung das Gefäßendothel nahezu vollständig entfernt wurde; die Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Zhu et al. überein (Zhu, Kuhel et al. 2000). Nach 14 Tagen konnten wir mit der von Willebrand Faktor-Markierung wieder eine intakte Endothelzellschicht nachweisen.

Die Deendothelialisierung induzierte die Proliferation von Zellen in der Media; 5 Tage nach der Schädigung waren in der *Lamina media* der *A. carotis communis* BrdU-positive, proliferierende Zellen nachweisbar, während die scheinoperierten Kontrollgefäße BrdU-negativ waren. Diese Befunde stimmen mit Angaben aus der Literatur überein (Cheung, D'Andrea et al. 1999; Harada, Komuro et al. 1999); in diesen Arbeiten wurden proliferierende Zellen 5 – 7 Tage nach einer Gefäßwandschädigung in der Intima und Media detektiert. Im Gegensatz zu anderen Autoren (Zhu, Kuhel et al. 2000; Zhu, Reardon et al. 2002) fanden wir jedoch keine Unterschiede zwischen WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen in der Anzahl proliferierender Zellen. Die ermittelte Proliferationsrate der SMCs in der Media 5 Tage nach der Schädigung betrug sowohl in WT- als auch in ApoE^{-/-}-Mäusen ca. 40 %. Dies ist deutlich mehr als von Lindner et al. und Kumar et al. beschrieben, die eine maximale Zellproliferation in der Media ebenfalls 5 Tage nach der Schädigung beobachteten, aber nur eine Proliferationsrate von 10 bzw. 23 % fanden (Lindner, Fingerle et al. 1993; Kumar and Lindner 1997). Die Zellproliferation in der Intima erreichte ihr Maximum 8 Tage nach der Schädigung mit einer Proliferationsrate von ca. 66 % (Lindner, Fingerle et al. 1993) bzw. war eine Zellproliferation in der *Lamina intima* auch 4 Wochen nach der Schädigung noch nachweisbar (Kumar and Lindner 1997). Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen konnten Lindner et al. auch nach 14 Tagen noch proliferierende Zellen in der Media detektieren. Jedoch verwendeten diese Autoren für die Versuche Swiss Webster-Mäuse, so dass die Unterschiede möglicherweise auf die Verwendung verschiedener Mausstämme zurückzuführen sind. An der *A. carotis* der Maus durchgeführte Untersuchungen zeigten einen entscheidenden Einfluss des genetischen Hintergrundes auf das arterielle Remodeling nach einer Gefäßwandschädigung (siehe 4.2).

Es gibt jedoch Untersuchungen, die entgegen unseren und auch von anderen Autoren beschriebenen Ergebnissen in C57BL/6J-Mäusen die Bildung einer Neointima in der *A. carotis* nach intraluminarer Endothelschädigung nachweisen konnten (Zhu, Kuhel et al. 2000; Vazquez-Padron, Lasko et al. 2004). Die Endothelschädigung (*resin probe*) führte nicht nur bei WT- sondern auch bei ApoE^{-/-}-Mäusen zur Neointimabildung, wobei diese in den ApoE^{-/-}-Tieren wesentlich stärker ausgeprägt war. In einer weiteren Studie der mechanischen Endothelschädigung der *A. carotis* (*guide wire*) konnte nur bei ApoE^{-/-}-, jedoch nicht bei C57BL/6J-WT-Mäusen die Bildung einer Neointima nachgewiesen werden (De Geest, Zhao et al. 1997; Zhu, Reardon et al. 2002) bzw. wurde eine verminderte Neointima in WT- gegenüber ApoE^{-/-}-Tieren beobachtet (Condorelli, Ayccock et al. 2001). Aufgrund der fehlenden Neointima in der *A. carotis communis* nach intraluminarer Gefäßwandschädigung wurde in unserem experimentellen System die *Lamina media* hinsichtlich ihrer morphometrischen Veränderungen an Gefäßquerschnitten untersucht. In den geschädigten Gefäßen wurde ein positives arterielles Remodeling nachgewiesen, das durch eine Zunahme der Mediafläche und des Gefäßlumens charakterisiert war. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Gefäßreaktivität durch die ApoE-Defizienz beeinflusst wird, da die morphometrischen Veränderungen bei ApoE^{-/-}-Tieren wesentlich stärker ausgeprägt waren. Diese Beobachtungen stimmen mit Untersuchungen von Zhu et al. überein, die ebenfalls durch intraluminale Schädigung der *A. carotis* (*resin probe*) einen signifikanten Unterschied in der Mediadicke und -fläche der geschädigten Gefäße zwischen WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen feststellten und in ihrem Modell die Bildung einer Neointima und eine damit assoziierten Stenose der Gefäße induzierten (Zhu, Kuhel et al. 2000), die wir in unseren Untersuchungen nicht beobachten. Die von Zhu et al. verwendeten Tiere waren im Alter von 6 – 8 Wochen; dagegen wurden in unseren Experimenten Tiere im Alter von 32 Wochen verwendet. Jedoch zeigten von uns

durchgeführte vorläufige Untersuchungen zur Altersabhängigkeit, dass bei Verwendung von 12 Wochen alten Tieren die morphologischen Unterschiede zwischen WT- und ApoE^{-/-}-Tieren wesentlich schwächer ausgeprägt waren und dass erst mit zunehmendem Alter der Tiere (bis zu 1 Jahr) die Gefäßreaktivität in den ApoE^{-/-}-Mäusen sich weiter verstärkte (Daten nicht dargestellt). Durch die Endothelschädigung wurde in den alten ApoE^{-/-}-Mäusen in einigen Fällen die Bildung einer atherosklerose-ähnlichen Läsion induziert, die durch eine verdickte Intima und Media, eingelagerte Lipide und Schaumzellen sowie durch die Zerstörung von elastischen Fasern in Media und Basalmembran, wie dies auch in fortgeschrittenen Plaques zu beobachten ist, gekennzeichnet war. Die mögliche Altersabhängigkeit der Gefäßreaktivität wird durch Untersuchungen von Vazquez-Padron et al. an der A. carotis von C57BL/6J-WT-Mäusen unterstützt. Eine intraluminale Endothelschädigung bei 2 und 18 Monate alten Tieren führte zu deutlichen Unterschieden in der Neointimabildung, die bei den alten Tieren stärker ausgeprägt war. Außerdem wurde *in vitro* für die SMCs der alten Mäuse eine größere Proliferationsrate und eine verminderte Apoptose-Suszeptibilität nachgewiesen (Vazquez-Padron, Lasko et al. 2004). Die in unseren Untersuchungen nachgewiesene verstärkte Gefäßreaktivität in ApoE^{-/-}- gegenüber WT-Mäusen wird wahrscheinlich direkt durch den ApoE-Knockout bedingt. Experimente von Zhu et al. zeigten, dass in transgenen, ApoE-überexprimierenden Mäusen nach intraluminale Schädigung der A. carotis die Neointimabildung im Vergleich zu WT-Tieren deutlich reduziert war (Zhu, Kuhel et al. 2000). Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Wientgen et al. gemacht, die bei WT-, ApoE^{-/-}- und transgenen ApoE^{-/-}-Mäusen eine intraluminale Schädigung der Femoralarterie durchführten (Wientgen, Thorngate et al. 2004). Die transgenen ApoE^{-/-}-Mäuse exprimierten in der Nebenniere ApoE. In ApoE^{-/-}- gegenüber WT-Mäusen war die Neointima stärker ausgeprägt, während in den transgenen ApoE^{-/-}-Mäusen, die ApoE exprimierten, im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Tieren, die kein ApoE exprimierten, die Neointima reduziert war (Wientgen, Thorngate et al. 2004). Die Bedeutung von ApoE für die Reaktion des Gefäßes auf eine Schädigung wird durch Untersuchungen von Moore et al. deutlich; immunhistochemische Untersuchungen wiesen die Expression von ApoE in der Media geschädigter Gefäße nach, während nichtgeschädigte Gefäße kein ApoE exprimierten (Moore, Zhu et al. 2004).

Immunfluoreszenzfärbungen der A. carotis zeigten in der Media geschädigter Gefäße Zellen, die positiv für den Stammzellmarker CD34 waren. Hinzu kommt, dass die Markierung mit α -Aktin, einem Marker für SMCs, in der Media geschädigter Gefäße gegenüber entsprechenden Kontrollgefäßen vermindert war und dass die CD34-positiven Zellen α -Aktin-negativ waren, was auf eine mögliche Dedifferenzierung von proliferierenden SMCs in der Media hinweist. In geschädigten Gefäßen waren nach 5 Tagen einige Bereiche in der Media nicht mit α -Aktin markiert, in Parallelschnitten dieser Gefäßabschnitte konnten BrdU-positive, proliferierende Zellen detektiert werden. Auch nach 14 Tagen wurden noch CD34-positive, α -Aktin-negative Zellen in der Media beobachtet, jedoch ohne den Nachweis einer Zellproliferation bzw. einer BrdU-Markierung. Die Dedifferenzierung von SMCs verbunden mit dem Verlust von SMC-spezifischen Markern wurde auch von Thyberg et al. *in vitro* an humanen SMCs und von Regan et al. *in vivo* in der A. carotis der Maus nach Endothelschädigung beobachtet (Thyberg, Blomgren et al. 1997; Regan, Adam et al. 2000).

Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass die Schädigung des Endothels zur Infiltration der *Lamina media* mit Makrophagen führte, die in den scheinoperierten Gefäßen der WT- und ApoE^{-/-}-Mäuse nicht beobachtet wurden. Die Beobachtungen stimmen mit denen von anderen Autoren überein; nach

Ligation der A. carotis traten CD45-positive Leukozyten in der Media auf (Kumar, Hoover et al. 1997). Die Infiltration der Gefäßwand mit Lymphozyten wurde ebenfalls von anderen Autoren beschrieben, die Lymphozyten waren jedoch im Gefäßlumen lokalisiert (Zhu, Reardon et al. 2002), während wir B- und T-Zellen im perivaskulären Gewebe fanden. Jedoch führten wir unsere Untersuchungen 5 und 14 Tage nach der Schädigung durch, während die von Zhu et al. dokumentierte Adhäsion von CD4- und CD8-positiven Zellen unmittelbar (1 Stunde) nach der Schädigung auftrat. Allerdings wurden 14 Tage nach der Gefäßwandschädigung weder Makrophagen noch CD4- oder CD8-positiv Zellen detektiert (Zhu, Reardon et al. 2002), das wir in unseren Untersuchungen nicht bestätigen konnten.

4.5 Bedeutung immunologischer Reaktionen für arterielles Remodeling und Atherosklerose

Die Auswertung der genomweiten Expressionsstudien der Aorten von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen zeigte sowohl in den GO-Analysen (Affymetrix™) als auch in den Signalweg-Analysen (KEEG), dass auffällig viele der regulierten Gene mit immunologischen Prozessen assoziiert sind; so war die Genexpression von Zytokinen, Chemokinen, Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen in atherosklerotischen Aorten von ApoE^{-/-}- gegenüber WT-Mäusen signifikant erhöht. Unsere GO-Auswertungen der Microarraydaten bestätigten die von anderen Autoren beschriebenen Ergebnisse und zeigten sogar teilweise Übereinstimmungen in den differentiell exprimierten Genen (Tabibiazar, Wagner et al. 2005). Die von uns beobachtete signifikante Erhöhung der Expression der Chemokine Mcp-1 und Mip-1α und der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 in den Aorten der ApoE^{-/-}-Mäuse stimmt mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Veillard et al. überein, bei der ApoE^{-/-}-Tiere 14 Wochen mit einer atherogenen Diät, beginnend im Alter von 10 Wochen, gefüttert wurden. Es wurde gezeigt, dass unter atherogener Diät die Expression von Mcp-1, Mip-1α, Ccr1, Ccr2 und Ccr5 mit fortschreitender Atherosklerose ansteigt, wobei das Expressionsmaximum nach 10 Wochen Fütterung erreicht wurde (Veillard, Steffens et al. 2004). In früheren Untersuchungen haben wir bereits die Korrelation der Mip-1α-Expression mit dem Progressionsgrad der Atherosklerose in der Aorta unabhängig von einer atherogenen Diät nachgewiesen (Moos, John et al. 2005). Die Chemokinrezeptoren Ccr1 und Ccr5, die sowohl in atherosklerotischen Gefäßen als auch nach intraluminaler Schädigung der A. carotis exprimiert bzw. induziert wurden, binden verschiedene Chemokine: Ccr1 interagiert z.B. mit Mip-1α, RANTES, Mcp-3 und Mip-1γ; Ccr5 bindet Mip-1α und -1β sowie RANTES (Kim 2004); alle genannten Chemokine waren mit Ausnahme von RANTES in den atherosklerotischen Aorten der ApoE^{-/-}-Mäuse signifikant hochreguliert. Versuche mit Ccr1- bzw. Ccr5-defizienten ApoE^{-/-}-Mäusen unter atherogener Diät zeigten einen deutlichen Unterschied in der Neointimabildung nach intraluminaler Schädigung der A. carotis (Zernecke, Liehn et al. 2006) und der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen (Braunersreuther, Zernecke et al. 2007). Während in ApoE^{-/-}/Ccr1^{-/-}-Doppelknockout-Mäusen weder die Neointimabildung noch die Progression der Atherosklerose beeinflusst wurde, zeigten ApoE^{-/-}/Ccr5^{-/-}-Doppelknockout-Mäuse einen drastischen Rückgang der intimalen Hyperplasie nach Endothelschädigung und eine Reduktion der Atherosklerose (Zernecke, Liehn et al. 2006; Braunersreuther, Zernecke et al. 2007). Obwohl beide Rezeptoren teilweise die gleichen Liganden binden können, scheinen die nachfolgenden Signalwege verschiedene Funktionen zu haben. So zeigten unsere Untersuchungen, dass beide Rezeptoren durch die intraluminaler Endothelschädigung induziert wurden, jedoch war nur die Expression von Ccr5 zu allen untersuchten Zeitpunkten

gegenüber den Kontrollgefäßen erhöht, was die Hypothese einer Beteiligung des Ccr5-Rezeptors an Remodeling-prozessen stützen würde.

Die Untersuchung der Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und deren Rezeptoren in geschädigten Karotisarterien zeigte, dass durch die Deendothelialisierung die Expression der untersuchten Gene induziert bzw. die Expression signifikant gegenüber den individuellen Kontrollgefäßen erhöht wurde. Der Vergleich zwischen WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen ergab, dass im zeitlichen Verlauf des arteriellen Remodelings weder in den Kontrollgefäßen noch in den geschädigten Gefäßen der beiden Mauspopulationen Unterschiede im Expressionsniveau messbar waren. Andere Autoren fanden hingegen eine signifikant höhere Expression der Chemokine Mcp-1, Mip-1 α und -1 β sowie von Cxcl1 in der A. carotis von 12 Monate alten ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Tieren (Furnkranz, Schober et al. 2005). Die Expressionsunterschiede der Chemokine beruhen möglicherweise auf dem Fortschreiten der Atherosklerose. In der A. carotis 12 Monate alter ApoE^{-/-}-Mäuse sind bereits atherosklerotische Plaques vorhanden und aufgrund fortgeschrittener Läsionen können Gefäßstenosen auftreten (Seo, Lombardi et al. 1997), während die A. carotis der von uns verwendeten Tiere (32 Wochen) keine makroskopisch sichtbaren Plaques aufwies. Wir fanden sowohl bei WT- als auch bei ApoE^{-/-}-Mäusen einen signifikanten Anstieg der Expression von Mcp-1 und des Rezeptors Ccr2 in der Arterienwand geschädigter Gefäße mit einem Expressionsmaximum 24 Stunden nach der Schädigung. Unsere Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Schober et al. überein, die beschrieben, dass eine Gefäßwandschädigung bei ApoE^{-/-}-Mäusen zu einem Anstieg der Expression von Mcp-1 sowie zu einer kurzzeitigen Zunahme der Mcp-1-Konzentration im Serum führte. Der Nachweis des Mcp-1-Proteins in der Arterienwand zeigte ebenfalls ein Maximum 24 Stunden nach der Schädigung, wobei Mcp-1 vor allem von SMCs und adhären Plättchen exprimiert wurde (Schober, Zernecke et al. 2004). Andere Untersuchungen dieser Forschergruppe demonstrierten eine Beteiligung des Chemokins SDF-1 α an der Neointimabildung und am arteriellen Remodeling nach intraluminaler Endothelschädigung der A. carotis in der ApoE^{-/-}-Maus (Schober, Knarren et al. 2003). Diese Befunde konnten wir in unseren Untersuchungen nicht bestätigen. SDF-1 α war in der A. carotis von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen bereits auf sehr hohem Niveau exprimiert und es bestand kein Unterschied in der Expression zwischen der geschädigten A. carotis und den Kontrollgefäßen bzw. zwischen den Mauspopulationen (Daten nicht gezeigt). Da in unserem experimentellen System im Gegensatz zu dem von Schober et al. verwendeten Modell keine Neointimabildung induziert werden konnte, könnten die Ergebnisse ein Hinweis darauf sein, dass SDF-1 α direkt in die Neointimabildung involviert bzw. an der Migration und Proliferation der SMCs in der Intima beteiligt ist. Aufgrund der von uns beobachteten hohen Expression von SDF-1 α in der A. carotis kann eine Bedeutung für das arterielle Remodeling nicht ausgeschlossen werden.

Durch die Deendothelialisierung wurde die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 in der A. carotis induziert; das Expressionsmaximum wurde 24 Stunden nach der Schädigung gemessen. Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit den Untersuchungen von Rectenwald et al. überein. In dem von diesen Autoren verwendeten Ligationsmodell wurde ebenfalls die Expression von TNF α in der A. carotis nachgewiesen, das Expressionsmaximum wurde jedoch erst 7 Tage nach Ligation der A. carotis erreicht (Rectenwald, Moldawer et al. 2000). Hinzu kommt, dass wir in den Kontrollgefäßen eine geringere Basisexpression von TNF α feststellten. Möglicherweise sind diese Unterschiede auf die verwendeten Modelle der Schädigung (intraluminal vs. Ligation) und/oder den unterschiedlichen

genetischen Hintergrund der Mauspopulationen (C57BL/6J vs. gemischter Hintergrund BL6x129) zurückzuführen. Bei TNF α -defizienten Mäusen war die intimale Hyperplasie nach Ligation der A. carotis (Rectenwald, Moldawer et al. 2000) bzw. intraluminaler Schädigung (Zimmerman, Selzman et al. 2002) im Vergleich zum Wildtyp 14- bzw. 7-fach reduziert ebenso wie in TNF α -Rezeptor-defizienten Mäusen nach intraluminaler Schädigung (Zimmerman, Reznikov et al. 2003). Zur Bedeutung von TNF α für die Atherogenese gibt es in der Literatur unterschiedliche Aussagen. In humanen atherosklerotischen Plaques wird TNF α in geringer Menge in fibrösen Plaques und in großer Menge in instabilen Plaques exprimiert, während in nicht-atherosklerotischen Gefäßen keine Expression von TNF α nachweisbar war (Sukhova, Schonbeck et al. 1999). In der Maus konnten Schreyer et al. bei Verwendung von TNF α -defizienten ApoE $^{-/-}$ -Mäusen die mit atherogener Diät gefüttert wurden keinen Einfluss auf die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen feststellen (Schreyer, Vick et al. 2002), während Branen et al. und Ohta et al. in ApoE $^{-/-}$ /TNF α $^{-/-}$ -Doppelknockout-Mäusen eine Verminderung der atherosklerotischen Läsionen beobachteten (Branen, Hovgaard et al. 2004; Ohta, Wada et al. 2005). In unseren Untersuchungen konnten wir mittels qRT-PCR lediglich eine geringe Basisexpression von TNF α in WT- und ApoE $^{-/-}$ -Aorten messen, ein Unterschied zwischen den Mauspopulationen bestand nicht. Diese Ergebnisse würden die Hypothese stützen, dass TNF α keinen bedeutenden Einfluss auf die Atherosklerose in der ApoE $^{-/-}$ -Maus hat. Jedoch konnten wir die Expression des als atheroprotektiv angesehenen Zytokins TGF β in atherosklerotischen ApoE $^{-/-}$ -Aorten nachweisen; die Expression war im Vergleich zu WT-Aorten signifikant erhöht (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist die Expression von TGF β für einen stabilen Plaque-Phänotyp mit verantwortlich (Cipollone, Fazio et al. 2004), da wir ebenfalls die Expression der plaque-destabilisierenden Proteinase Mmp-12 und -13 nachweisen konnten (Deguchi, Aikawa et al. 2005; Johnson, George et al. 2005), aber histologisch keine Plaquerupturen beobachteten.

In der A. carotis von IL-1 β -defizienten Mäusen war die Neointimabildung nach Ligation des Gefäßes vermindert, während bei IL-1 α -defizienten Mäusen keine Veränderungen im Vergleich zu WT-Mäusen feststellbar waren (Chamberlain, Evans et al. 2006). Diese Daten weisen auf eine spezifische Beteiligung von IL-1 β bei vaskulären Remodelingprozessen hin. IL-1R1 (*IL-1 signaling receptor type 1*)-defiziente Mäuse zeigten ebenfalls eine Reduktion der intimalen Hyperplasie im Vergleich zu WT-Tieren. Ähnliche Wirkungen konnten in IL-1R1-positiven Mäusen erreicht werden, denen der endogene Antagonist IL-1ra (*IL-1 receptor antagonist*) verabreicht wurde (Chamberlain, Evans et al. 2006). Der von Endothelzellen, SMCs und Makrophagen gebildete IL-1ra spielt eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase und ist in die Atherogenese und den Cholesterolverstoffwechsel involviert (Isoda and Ohsuzu 2006). Eine Schädigung der Gefäßwand mittels einer Manschette verursachte bei IL-1ra-defizienten Mäusen eine um das 2 - 3-fach stärkere intimale Hyperplasie als bei den IL-1ra-positiven WT-Tieren (Isoda, Shiigai et al. 2003). Bei ApoE $^{-/-}$ -Mäusen mit einer heterozygoten IL-1ra-Defizienz (ApoE $^{-/-}$ /IL-1ra $^{+/-}$) wurde die Entwicklung der Atherosklerose gefördert und die Plaquezusammensetzung moduliert; insbesondere kam es zu einer Depletion der SMCs sowie zur verstärkten Akkumulation von Makrophagen in den Plaques und zur erhöhten Expression von Vcam-1, Icam-1 und Mcp-1 (Isoda, Sawada et al. 2004). Bei völligem Fehlen des endogenen antiinflammatorischen IL-1ra entstehen letale Entzündungen der Arterienwand mit einer massiven transmuralen Infiltration der Gefäßwand mit Makrophagen, Neutrophilen und CD4-positiven T-Zellen, die insbesondere an Atherosklerose-Prädilektionsstellen zu Stenosen und Aneurysmen der Aorta sowie deren Rupturen führen (Nicklin,

Hughes et al. 2000). Die Expression von IL-1 β war sowohl nach Endothelschädigung als auch in atherosklerotischen Gefäßen signifikant gegenüber den entsprechenden Kontrollen erhöht. Die an der Maus erhobenen Daten deuten auf eine essentielle Bedeutung des IL-1-Signalwegs für Atherosklerose- und Remodelingprozesse hin.

Das vor allem von Fibroblasten, Monozyten/Makrophagen und Endothelzellen produzierte und sezernierte proinflammatorische Zytokin IL-6 ist ein multifunktionales Zytokin, das unter anderem eine Schlüsselposition bei der Regulation von Immunantworten einnimmt und an der Pathogenese verschiedener Autoimmun- und chronisch-entzündlicher proliferativer Erkrankungen beteiligt ist (Ishihara and Hirano 2002; Kishimoto 2006). Darüber hinaus wird IL-6 auch im Nervensystem und in endokrinen Organen exprimiert (Kamimura, Ishihara et al. 2003; Kishimoto 2005). Obwohl die Wirkungen von IL-6 noch nicht bis ins Einzelne geklärt sind, kann man davon ausgehen, dass dieses Zytokin auch bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen und beim vaskulären Remodeling eine wichtige Rolle spielt. So führte die Injektion von IL-6 bei jungen WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen unter atherogener Diät zu einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine im Plasma und zur Bildung früher atherosklerotischer Läsionen (*fatty streaks*) (Huber, Sakkinen et al. 1999). Andererseits wurden bei einem Jahr alten ApoE^{-/-}/IL-6^{-/-}-Doppelknockout-Mäusen unter Fütterung einer Standarddiät eine signifikant stärker ausgeprägte Atherosklerose in der Aorta sowie erhöhte Plasmacholesterolverte nachgewiesen, während die Akkumulation von Makrophagen und Leukozyten in den atherosklerotischen Plaques sowie die Expression von Mmp-9, Timp-1 und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 signifikant niedriger als bei den zugehörigen Wildtyp-, ApoE^{-/-}- und IL-6^{-/-}-Mäusen war (Schieffer, Selle et al. 2004). Ähnliche Wirkungen von IL-6 im Sinne einer verminderten Bildung atherosklerotischer Läsionen wurden bei 24 Wochen alten ApoE^{-/-}-Mäusen durch exogene Gabe des Zytokins hervorgerufen. Durch Suppression der IL-6-Expression mittels Dexamethason-Injektion konnte hingegen eine verstärkte Atherosklerose induziert werden (Tous, Ribas et al. 2006).

Der IL-6-Signalweg wird über ein negatives Feedback durch Socs3 gesteuert (Crocker, Krebs et al. 2003). IL-6 aktiviert nach Bindung an die α -Untereinheit Glykoprotein 80 (gp80) seines Rezeptors und der nachfolgenden Homodimerisierung der Untereinheit Glykoprotein 130 (gp130) die gp130-assoziierten zyttoplasmatischen Protein-Tyrosinkinasen JAK1 und JAK2 (*Janus Kinase*), die nachfolgend STAT1 und STAT3 (*signal transducer and activator of transcription*) phosphorylieren. Die phosphorylierten STATs translozieren in den Zellkern, wo sie die Transkription von Genen aktivieren, die für die Kodierung z.B. der Akut-Phase-Proteine aber auch der Socs1- und Socs3-Proteine verantwortlich sind (Alexander and Hilton 2004; Rakesh and Agrawal 2005; Tan and Rabkin 2005; Yoshimura, Nishinakamura et al. 2005). Das Socs3-Protein kann über die Bindung an die zytoplasmatische Domäne des IL-6-Rezeptors die JAK-bedingte Phosphorylierung der STATs hemmen, wodurch die Zytokin-Signaltransduktion abgeschwächt wird (Alexander, Starr et al. 1999). Es wurde gezeigt, dass in Socs3-defizienten Mäusen die Aktivierung von STAT1 und STAT3 nach Stimulation mit IL-6 verlängert ist (Crocker, Krebs et al. 2003) und dass in Makrophagen von Socs3-defizienten Mäusen eine kontinuierliche Zytokin-Stimulation in einer anhaltenden Aktivierung der STATs resultiert (Wormald, Zhang et al. 2006). Die Auswertung unserer Microarraydaten mittels KEGG zeigte, dass der JAK-STAT-Signalweg zu den 14 Signalwegen gehört, die mehr als 3 der in den atherosklerotischen Aorten signifikant hochregulierten Gene aufwiesen und dass in den atherosklerotischen Aorten der ApoE^{-/-}-Mäuse sowohl Socs3 als auch IL-6 signifikant hochreguliert

waren. Darüber hinaus ergab die Auswertung von Microarraydaten 6 Wochen alter ApoE^{-/-}-Mäuse ohne Atherosklerose, dass IL-6 eines der Gene war, das mit zunehmenden Alter und der damit verbundenen Progression der Atherosklerose am stärksten hochreguliert wurde (Daten nicht gezeigt). Sukovich et al. beschrieben eine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der Atherosklerose und der Sekretion von IL-6 in der Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen im Alter von 6, 16, 32 und 48 Wochen. Bei 20 – 24 Wochen alten ApoE^{-/-}-Tieren konnte im Aortenbogen, der in diesem Alter bereits Plaques aufweist, die Expression von IL-6 nachgewiesen werden, während in der thorakalen Aorta und in der Aorta von gleichaltrigen WT-Tieren IL-6 nicht vorhanden war. Immunohistochemische Untersuchungen der Arterienwand zeigten eine Kolo-kalisation der Expression von IL-6 mit CD68-positiven Makrophagen (Sukovich, Kauser et al. 1998). In der über 12 Jahre laufenden „Edinburgh Artery Study“, die 1592 Personen einschloss, wurden IL-6, C-reaktives Protein und Icam-1 als molekulare Marker für das Auftreten und die Progression einer Atherosklerose identifiziert; IL-6 war unter den inflammatorischen Markern am beständigsten und am meisten unabhängig von anderen Faktoren (Tzoulaki, Murray et al. 2005).

Neben den „klassischen“ Zytokinen und Chemokinen wurde die Expression von Osteopontin in der geschädigten A. carotis und den entsprechenden Kontrollgefäßen untersucht. Osteopontin wird von einer Vielzahl Zellen exprimiert und übt vielfältige Funktionen im Organismus aus; unter anderem wird ihm auch eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen zugeschrieben. Osteopontin wird als Antwort auf mechanischen Stress exprimiert und beschleunigt den kardiovaskulären Remodeling-Prozess (Okamoto 2006). Es fördert die Rekrutierung und Retention von Makrophagen und T-Zellen im entzündeten Gewebe und reguliert die Bildung inflammatorischer Zytokine (Singh, Ananthula et al. 2007). Osteopontin ist daher von großer Bedeutung für pathologische Prozesse, die mit der Proliferation arterieller SMCs wie Atherosklerose und Restenose assoziiert sind. Wir konnten zeigen, dass Osteopontin in der A. carotis von WT-Mäusen durch die intraluminale Schädigung induziert wurde; der Unterschied zu den nichtgeschädigten Gefäßen war signifikant. Dagegen war bei ApoE^{-/-}-Mäusen Osteopontin sowohl in Kontroll- als auch in geschädigten Gefäßen auf ähnlichem Niveau exprimiert (entsprach dem von geschädigten WT-Gefäßen), eine Steigerung der Expression durch die Schädigung konnte nicht nachgewiesen werden. Die erhöhte Expression von Osteopontin in den nichtgeschädigten Karotisarterien der ApoE^{-/-}-Mäuse könnte durch den ApoE-Knockout bzw. die vorhandene starke Hyperlipidämie bedingt sein. Experimente mit transgenen, Osteopontin-überexprimierenden Mäusen haben gezeigt, dass eine durch atherogene Diät verursachte Hyperlipidämie die Bildung atherosklerotischer Läsionen (*fatty streaks*) bei diesen Tieren im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe begünstigte (Chiba, Okamoto et al. 2002; Isoda, Kamezawa et al. 2003). Untersuchungen an transgenen Mäusen mit einer Überexpression von Osteopontin weisen darauf hin, dass Osteopontin auch eine entscheidende Rolle beim vaskulären Remodeling und bei der Restenose nach Angioplastie *in vivo* spielen könnte. In der Aorta von 16 und 32 Wochen, aber nicht von 6 Wochen alten osteopontin-überexprimierenden Tieren fand sich ohne vorherige Schädigung des Gefäßes eine Verdickung der Media ohne intimale Hyperplasie; in der A. femoralis von 16 Wochen alten Mäusen nach Schädigung mittels einer Gefäßmanschette wurde eine verstärkte Neointimabildung nachgewiesen (Isoda, Nishikawa et al. 2002). Die erhöhte Expression von Osteopontin in den unbehandelten Kontrollgefäßen der ApoE^{-/-}-Tiere könnte auch durch die beginnende Bildung von atherosklerotischen Läsionen bedingt sein. Obwohl die Karotisarterien makroskopisch frei von sichtbaren Läsionen waren (*fatty streaks* sind makroskopisch nicht sichtbar), konnte die

A. innominata einschließlich der Aufzweigung in A. subclavia dextra und A. carotis dextra histologisch als Prädilektionsstelle für die Atherosklerose identifiziert werden. In älteren Tieren (> 32 Wochen) waren auch makroskopisch sichtbare Plaques vorhanden (nicht gezeigt). Für diese Annahme würde ebenfalls sprechen, dass Osteopontin auch in der Aorta der ApoE^{-/-}-Mäuse in hohem Maße exprimiert war, obwohl die makroskopisch sichtbaren Plaques im Verhältnis zur gesamten Aorta relativ gering waren. Bei den von uns verwendeten ApoE^{-/-}-Tieren waren im Alter von 32 Wochen maximal 10 – 12 % der gesamten Aortenfläche mit makroskopisch sichtbaren atherosklerotischen Plaques bedeckt (Moos 2005).

4.6 Arteriell Remodeling, Atherosklerose und ECM-degradierende Proteinase

Die genomweiten Expressionsanalysen der Aorta von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen haben eine signifikant erhöhte Expression verschiedener ECM-degradierender Proteinase in den Aorten der ApoE^{-/-}- im Vergleich zu WT-Mäusen gezeigt. Dies betraf insbesondere Gene für verschiedene Kollagenasen (Mmp-13), Elastasen (Mmp-12, Cathepsin S, K und L), der membran-gebundenen Proteinase Mmp-14 und Adam-8 (*a disintegrin and metalloproteinase domain 8*) und des endogenen Mmp-Inhibitors Timp-1. Neben der Expression dieser ECM-degradierenden Proteinase waren auch verschiedene Gene von Kollagenvorstufen in den ApoE^{-/-}-Mausarten hochreguliert.

Matrixmetalloproteinase wird eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen und insbesondere der Ausprägung eines stabilen oder instabilen Plaquephänotyps zugeschrieben. So zeigten Untersuchungen an ApoE^{-/-}-Mäusen mit einem zusätzlichen Knockout für Mmp-3, -7, -9 oder -12, dass Mmps unterschiedliche, zum Teil konträre Wirkungen auf die Stabilität atherosklerotischer Plaques hervorrufen (Johnson, George et al. 2005). Die bei ApoE^{-/-}/Mmp-3^{-/-}- und ApoE^{-/-}/Mmp-9^{-/-}-Doppelknockout-Mäusen beobachtete signifikant stärkere Plaquebildung in der A. innominata im Vergleich zu den entsprechenden ApoE^{-/-}-Kontrollen und die auf einen instabilen Plaque-Phänotyp deutenden Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung weisen auf eine protektive Rolle dieser Mmps im Sinne einer Plaquelimitierung und eines stabilen Plaque-Phänotyps hin. Andererseits kam es bei ApoE^{-/-}/Mmp12^{-/-}-Doppelknockout-Mäusen zu einer Verminderung der Plaquebildung sowie zu einem Anstieg von SMCs und einer Verminderung von Makrophagen im Plaque und somit zu einem stabilen Plaque-Phänotyp, was darauf deutet, dass Mmp-12 *in vivo* für die Expansion atherosklerotischer Läsionen und die Destabilisierung des Plaques von Bedeutung ist. Bei ApoE^{-/-}/Mmp7^{-/-}-Doppelknockout-Mäusen waren weder die Größe der Plaques noch deren Stabilität verändert (Johnson, George et al. 2005). Bei ApoE^{-/-}/Mmp-13^{-/-}-Doppelknockout-Mäusen wurde nach Fütterung einer atherogenen Diät eine Akkumulation von Kollagen im Plaque, aber keine Vergrößerung der Plaquefläche beobachtet, was auf eine Rolle von Mmp-13 bei der Regulation und Organisation von Kollagen im atherosklerotischen Plaque hinweist (Deguchi, Aikawa et al. 2005). Die Expression von Mmp-12 und Mmp-13 scheint demzufolge eher einen instabilen Plaque zu begünstigen; in humanen rupturierten Plaques wurde ein deutlicher Anstieg der Mmp-12-Expression im Vergleich zu nicht-rupturierten Plaques gemessen (Morgan, Rerkasem et al. 2004), ebenso zeigte die Inhibierung von Mmp-12 und -13 in LDL-R^{-/-}-Mäusen eine Reduktion der Degradation von elastischen Fasern der Media im Bereich der atherosklerotischen Läsion (Prescott, Sawyer et al. 1999). Darüber hinaus führte die Inhibierung der Proteinase zu einer reduzierten Migration von SMCs in die Intima bzw. zu einer

verminderten Neointimabildung nach Ballondilatation der A. carotis der Ratte (Prescott, Sawyer et al. 1999). Unsere Untersuchungen zeigten eine deutliche mRNA-Expression von Mmp-12 und -13 in der Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen unter Standarddiät; die Plaques waren morphologisch unauffällig. Dagegen konnten Jeng et al. die Expression von Mmp-13 nur nach Gabe einer atherogenen Diät nachweisen, während eine geringe Basisexpression von Mmp-12 und -3 durch die Diät verstärkt wurde (Jeng, Chou et al. 1999). Die Untersuchungen von Jeng et al. wurden jedoch an 20 Wochen alten Tieren durchgeführt, so dass der Altersunterschied und die noch nicht so weit fortgeschrittene Atherosklerose eine mögliche Erklärung für die Expressionsunterschiede sein kann. Die von uns verwendeten Tiere waren 32 Wochen alt; größere Läsionen waren nur im Aortenbogen bzw. in der Aortenwurzel und der A. innominata vorhanden, während in der thorakalen und abdominalen Aorta zu diesem Zeitpunkt erste kleine Plaques makroskopisch sichtbar waren (Daten nicht gezeigt). Es ist nicht auszuschließen, dass es mit der weiteren Entwicklung der Plaques auch zu Rupturen kommt, wobei anzumerken ist, dass Plaquerupturen in der Maus nur selten auftreten und z.B. die Gabe einer atherogenen Diät über einen sehr langen Zeitraum erfordern (Johnson and Jackson 2001).

Als endogene Mmp-Inhibitoren spielen Timps eine wichtige Rolle in atherosklerose-assoziierten und experimentell induzierten Remodelingprozessen, an denen Mmps beteiligt sind. Bisher sind für die Maus 4 Timps bekannt. So führte eine perivaskuläre elektrische Endothelschädigung *in vivo* an der A. femoralis bei Timp-1^{-/-}-Knockout-Mäusen zu einer stärker ausgeprägten Neointimabildung und einer erhöhten Aktivität von Mmp-2 und Mmp-9 im Vergleich zu den dazugehörigen Wildtyp-Kontrollen. In einem *in vitro*-Migrationsassay wurde eine beschleunigte Migration kultivierter SMCs von Timp-1^{-/-}-Knockout- im Vergleich zu derjenigen von WT-Mäusen beobachtet (Lijnen, Soloway et al. 1999). Eine Überexpression von Timp-1 in der A. carotis von Ratten durch einen Adenovirus-vermittelten Gentransfer reduzierte die Neointimabildung nach Schädigung des Gefäßes mittels Ballonkatheterdilatation. *In vitro* wurde durch Transfektion von SMCs der Ratte mit Timp-1 deren Migration im Vergleich zu virus-transfizierten Kontroll-SMCs ebenfalls vermindert (Dollery, Humphries et al. 1999). Studien zum Einfluss von Timp-1 auf die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen zeigten widersprüchliche Ergebnisse. So führte eine Überexpression des Timp-1-Gens bei ApoE^{-/-}-Mäusen, die mit atherogener Diät gefüttert wurden, zu einer Reduktion der Plaquegröße im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen ohne Timp-1-Überexpression; außerdem wurde ein erhöhter Gehalt an Kollagen, Elastin und α -Aktin sowie eine reduzierte Anzahl von Makrophagen in der Gefäßwand beobachtet (Rouis, Adamy et al. 1999). Andererseits zeigten auch ApoE^{-/-}/Timp-1^{-/-}-Doppelknockout-Mäuse unter atherogener Diät im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Kontrollmäusen eine Plaquereduktion; außerdem wurde bei diesen Tieren eine verstärkte Degradation von elastischen Fasern, eine erhöhte Mmp-Aktivität und die Bildung von Aneurysmen in der Aorta nachgewiesen (Silence, Collen et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse wurden von Lemaitre et al. beschrieben, die ebenfalls eine verstärkte Degradation der Media und die Bildung von Aneurysmen bei ApoE^{-/-}/Timp-1^{-/-}-Doppelknockout-Mäusen beobachteten, jedoch keine Unterschiede in der Plaquegröße fanden (Lemaitre, Soloway et al. 2003). Es muss jedoch angemerkt werden, dass in der Studie von Silence et al. die atherogene Diät über einen längeren Zeitraum appliziert wurde als in der Studie von Lemaitre et al., was die unterschiedliche Ausprägung der atherosklerotischen Plaques erklären könnte. Die Untersuchungen weisen auf eine Beteiligung der Timps als endogene Mmp-Inhibitoren an Remodelingprozessen hin, da sie die Migration von SMCs beeinflussen können und die Degradation von Bestandteilen der ECM

verhindern, während der Einfluss auf die Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen noch unklar ist. Die in unseren eigenen Untersuchungen nachgewiesene erhöhte Expression von Timp-1 in den Aorten der ApoE^{-/-}-Mäuse und die signifikant erhöhte Expression des Mmp-Inhibitors nach der Gefäßwandschädigung in der A. carotis deuten auf eine Beteiligung von Timp-1 an beiden Prozessen hin. Die Überexpression in der Aorta könnte einer übermäßigen Degradation der ECM und somit einer Plaqueruptur oder Aneurysmabildung entgegenwirken.

Neben Mmps und Timps können auch andere Proteinasen an der Degradation von ECM bzw. an Remodelingprozessen beteiligt sein, wie z.B. die lysosomalen Cathepsine. Es sind eine Vielzahl von Cathepsinen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten bekannt (z.B. Cathepsin B, D, E, F, K, L, S). In unseren Untersuchungen waren die Cathepsine S, L und K in den atherosklerotischen Aorten der ApoE^{-/-}-Mäuse signifikant hochreguliert. In anderen Studien wurde auch in humanen atherosklerotischen Läsionen eine Expression von Cathepsin S und K in Makrophagen und SMCs der Intima nachgewiesen. *In vitro* konnte in humanen SMCs durch Stimulation mit atherosklerose-assoziierten Zytokinen wie IL-1 β oder IFN γ die Aktivität dieser Proteinasen induziert werden (Sukhova, Shi et al. 1998). In intimalen SMCs, Endothelzellen und Makrophagen humaner Aneurysmen und atherosklerotischer Läsionen wurde auch eine erhöhte Expression von Cathepsin L beobachtet. *In vitro* führte die Stimulation dieser humanen Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen oder Wachstumsfaktoren ebenfalls zur Expression von Cathepsin L (Liu, Sukhova et al. 2006).

Jormsjo et al. demonstrierten die Expression verschiedener Cathepsine (B, D, L und S) während der Entstehung atherosklerotischer Läsionen in der Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen. Während die Expression von Cathepsin S auf Gefäßabschnitte mit atherosklerotischen Läsionen beschränkt war, konnte die Expression der Cathepsine B, D und L auch in nicht-atherosklerotischen Gefäßbereichen nachgewiesen werden; in atherosklerotischen Abschnitten war die Expression von Cathepsin B und D jedoch erhöht. Immunhistochemische Untersuchungen lokalisierten die Expression der Cathepsine in der Intima und der fibrösen Kappe; nur Cathepsin S wurde auch in der Media exprimiert (Jormsjo, Wuttge et al. 2002). Cathepsin S wird eine wichtige Rolle bei der Destabilisierung und Ruptur atherosklerotischer Plaques zugeschrieben. So zeigten ApoE^{-/-}/Cathepsin S^{-/-}-Doppelknockout-Mäuse unter atherogener Diät einen drastischen Rückgang (> 70 %) von Plaquerupturen verbunden mit einer verdickten fibrösen Kappe sowie eine geringere Ausprägung der Atherosklerose gegenüber den entsprechenden ApoE^{-/-}-Kontrolltieren (Rodgers, Watkins et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse wurden bei ApoE^{-/-}/Cathepsin K^{-/-}-Doppelknockout-Mäusen beschrieben, die ebenfalls eine verminderte Atherosklerose und einen verstärkten Kollagengehalt im Plaque aufwiesen (Lutgens, Lutgens et al. 2006). Cathepsine sind nicht nur für die Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen sondern auch für vaskuläre Remodelingprozesse von Bedeutung. In unseren Untersuchungen wurde in der A. carotis von WT-Mäusen durch die intraluminale Endothelschädigung die Expression von Cathepsin S induziert. Ähnliche Ergebnisse wurden von Cheng et al. beschrieben, die an der A. carotis der Ratte nach einer Gefäßwandschädigung mittels Ballondilatation eine erhöhte Expression der Cathepsine S und K während der Neointimabildung nachweisen konnten (Cheng, Kuzuya et al. 2004). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen bei WT-Mäusen führte die Schädigung der A. carotis bei ApoE^{-/-}-Mäusen zu keiner nachweisbaren Änderung der Cathepsin S-Expression. Das Expressionsniveau in den nichtgeschädigten Gefäßen der ApoE^{-/-}-Tiere entsprach bereits demjenigen, das in WT-Mäusen nach der

Gefäßwandschädigung gemessen wurde. Möglicherweise führten die Hyperlipidämie und/oder bereits bestehende makroskopisch nicht sichtbare frühe Atherosklerosestadien zu einer erhöhten Expression von Cathepsin S, so dass die Endothelschädigung keinen zusätzlichen Effekt mehr auslöste. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für Mmp-13 gefunden, dessen Expression in der A. carotis nach Endothelschädigung ebenfalls nur in WT- aber nicht in ApoE^{-/-}-Mäusen induziert werden konnte, was die Hypothese eines bereits vorhandenen, atherosklerose-assoziierten Remodelings in den Gefäßen der ApoE^{-/-}-Tiere unterstützen würde.

Neben der Funktion als ECM-degradierende Proteinasen spielen sowohl Mmps als auch Cathepsine eine wichtige Rolle bei Immunprozessen. Mmps sind in der Lage durch proteolytische Spaltung Chemokine, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren zu (de)aktivieren und auf diesem Weg die Progression verschiedener inflammatorischer Prozesse zu beeinflussen (McCawley and Matrisian 2001; Overall, McQuibban et al. 2002; Parks, Wilson et al. 2004; Berahovich, Miao et al. 2005; Cauwe, Van den Steen et al. 2007; Van Lint and Libert 2007). Zytokine können ihrerseits die Sekretion von proteolytischen Enzymen induzieren; *in vitro* wurde in humanen Endothelzellen die Expression von Mmp-14 nach Stimulation mit TNF α , IL-1 α und -1 β nachgewiesen. Darüber hinaus konnte die Mmp-14-Expression auch durch oxLDL induziert werden (Rajavashisth, Liao et al. 1999). Eine direkte Expression von Mmp-14 wurde in humanen atherosklerotischen Plaques in Kollokalisierung mit SMCs und Makrophagen beobachtet (Rajavashisth, Xu et al. 1999). Matias-Roman et al. zeigten, dass Mmp-14 für die transendotheliale Migration von Monozyten, die ein Schlüsselereignis bei inflammatorischen Prozessen darstellt, von Bedeutung ist (Matias-Roman, Galvez et al. 2005). Wir konnten zeigen, dass die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, die an der Adhäsion und Migration von Leukozyten durch das Endothel beteiligt sind, in atherosklerotischen Aorten signifikant erhöht waren. Die in unseren Untersuchungen im Vergleich zur WT-Aorta nachgewiesene erhöhte Expression von Mmp-14 in atherosklerotischen Mausaorten könnte somit Ausdruck der mit der Atherosklerose einhergehenden entzündlichen Reaktionen sein. Cathepsine besitzen eine essentielle Funktion bei der intrazellulären endosomalen proteolytischen Spaltung von Antigenen und ihrer anschließenden Präsentation auf der Oberfläche von antigen-präsentierenden Zellen über MHC II-Moleküle (Liu and Spero 2004; Hsing and Rudensky 2005). Sie sind in zwei Schritte des MHC II-Signalwegs involviert: i) in die Antigenpräsentation durch die Degradation der invariablen Untereinheit (*invariant chain, chaperone molecules*) des MHC II-Komplexes; ii) in die Antigenprozessierung in Lysosomen bzw. Endosomen (siehe Abb. 34). MHC II-Moleküle assoziieren im endoplasmatischen Retikulum mit der invariablen Untereinheit, die für den Transport des Komplexes in die Endosomen essentiell ist und die Peptidbindung an das MHC II-Molekül blockiert, um eine zu frühe Bindung von Peptidfragmenten auf dem Weg zur Zelloberfläche zu verhindern (Honey and Rudensky 2003; Rudensky and Beers 2006; Zavasnik-Bergant and Turk 2006). Die Präsentation von MHC II auf der Zelloberfläche aktiviert antigen-spezifische, CD4-positive T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor und löst damit eine antigen-spezifische Immunantwort aus (siehe Abb. 34) (Monaco, Andreakos et al. 2004).

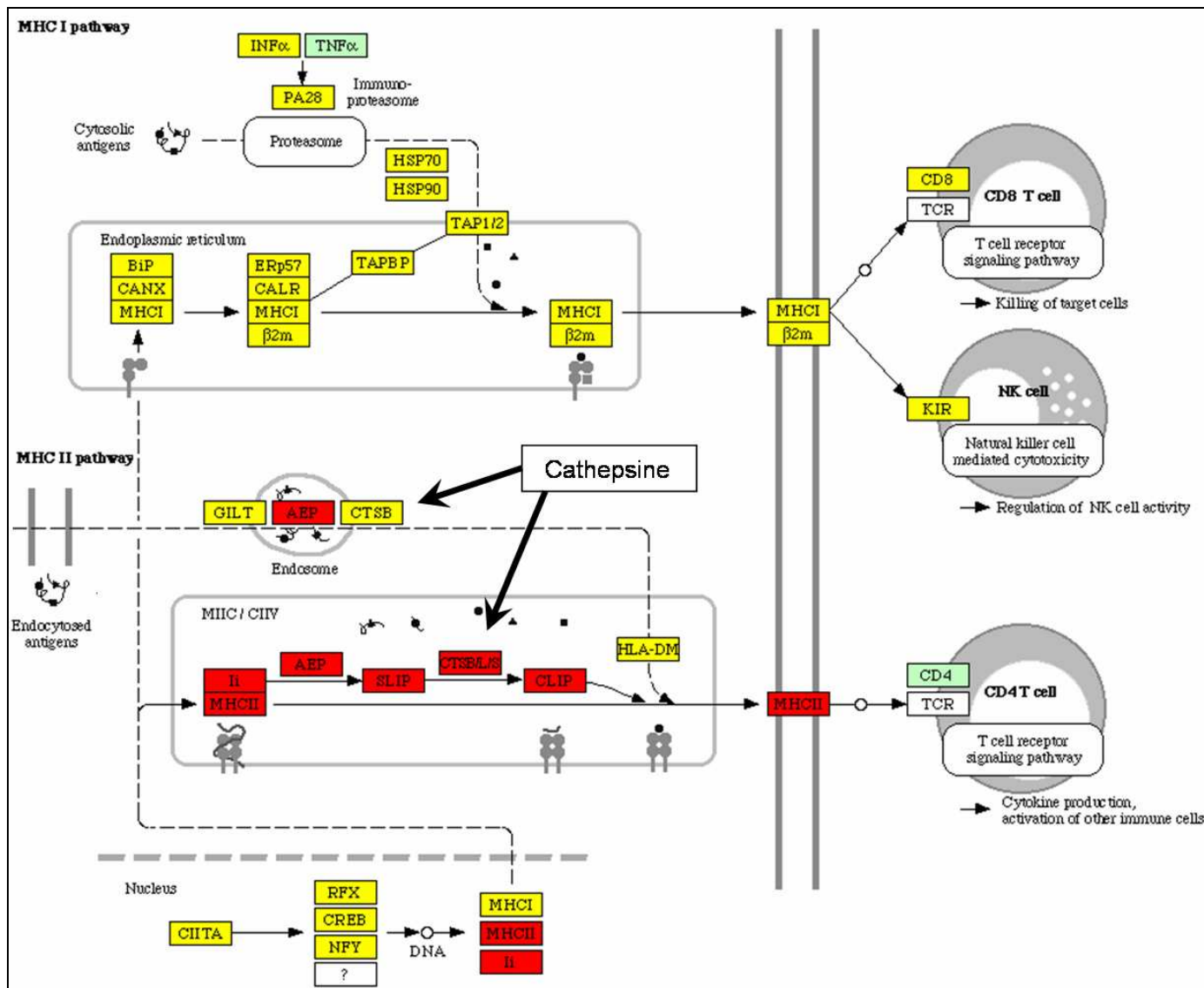


Abb. 34: KEGG-Signalweg der Antigenpräsentation über MHC I- und MHC II-Moleküle.

In der Abbildung sind schematisch die bekannten Gene gezeigt, die an der Antigenpräsentation beteiligt sind. Die Gene, die in atherosklerotischen Aorten von ApoE^{-/-} im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant hochreguliert waren, sind rot dargestellt. Alle Gene, die in der Aorta der ApoE^{-/-}-Tiere konstitutiv exprimiert bzw. *present* waren, sind gelb dargestellt. Für grün dargestellte Gene wurde mittels Microarray keine Expression nachgewiesen; zu weiß dargestellten Genen sind in der Datenbank keine Informationen vorhanden. Die am MHC II-Signalweg beteiligten Proteinasen sind durch Pfeile gekennzeichnet, der obere Pfeil weist auf Cathepsine, die an der Antigenprozessierung in den Endosomen beteiligt sind (CTSB), der untere Pfeil weist auf die Cathepsine, die an der Abspaltung der invariablen Untereinheit des MHC II-Komplexes beteiligt sind (CTSB/L/S).

Die von uns nachgewiesene Hochregulation von Cathepsine S, L und K in atherosklerotischen Mausarten gegenüber WT-Arten könnte auf eine Bedeutung der Prozessierung und Präsentation von Antigenen in der Atherosklerose weisen. Die Rolle von Autoantigenen für die Entstehung und Progression der Atherosklerose wurde von Mandal und Jahangiri beschrieben (Mandal, Jahangiri et al. 2005). Atherosklerotische Plaques enthalten Autoantigene; Risikofaktoren für die Atheroskleroseentstehung wie Bluthochdruck und Hypercholesterolämie fördern die Expression von Autoantigenen im Plaque (Mandal, Jahangiri et al. 2005). *In vitro* zeigten Makrophagen in Anwesenheit von Cholesteroldie vermehrte Antigenpräsentation über MHC II-Moleküle (Hughes, Townsend et al. 1992). Die gegenüber WT-Tieren um bis zu 10-fach erhöhten Cholesterolkonzentrationen im Serum von

ApoE^{-/-}-Mäusen, die wir auch ohne atherogene Diät fanden, begünstigen nicht nur die Entstehung der Atherosklerose bzw. die Schaumzellbildung (Plump, Smith et al. 1992; Nakashima, Plump et al. 1994); die vorhandene Hyperlipidämie fördert möglicherweise auch die Präsentation von Autoantigenen im Plaque. Insbesondere die Antigen-präsentation über MHC II scheint in der atherosklerotischen Mauseorta von Bedeutung zu sein, da die Auswertung der genomweiten Expressionsstudien mittels GO-Analyse zeigte, dass die GO-Begriffe „*antigen presentation, exogenous antigen via MHC class II*“ (GO-Kategorie „*biological process*“) und „*MHC class II receptor activity*“ (GO-Kategorie „*molecular function*“) hohe Chi-Quadrat-Werte aufwiesen bzw. dass die mit diesen GO-Begriffen annotierten Gene überrepräsentiert waren.

Abbildung 34 zeigt den MHC I- und MHC II-Signalweg (KEGG) der Antigenpräsentation. Während die am MHC I-Signalweg beteiligten Gene in der Aorta der ApoE^{-/-}-Mäuse konstitutiv exprimiert waren bzw. keine Regulation gegenüber WT-Aorten aufwiesen, waren fast alle Gene, die in den MHC II-Signalweg involviert sind, in den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Aorten signifikant hochreguliert. Die vielfältigen Funktionen, die die untersuchten Proteinasen in Remodeling- und Immunprozessen haben und ihre signifikant erhöhte Expression in atherosklerotischen Gefäßen der Maus lassen darauf schließen, dass diese eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose bzw. vaskulärem Remodeling spielen.

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die nähere Charakterisierung der mit einem arteriellen Remodeling einhergehenden Veränderungen in tierexperimentellen Modellen kann zu einem besseren Verständnis der pathogenetischen Mechanismen des arteriellen Remodelings insbesondere auf molekularer Ebene beitragen. In unseren Untersuchungen wurde das arterielle Remodeling in der A. carotis communis nach intraluminaler Schädigung der Gefäßwand sowie in der atherosklerotisch veränderten Aorta der Maus untersucht. Obwohl es Unterschiede im arteriellen Remodeling in den verschiedenen Gefäßbereichen und insbesondere zwischen normalen und atherosklerotischen Gefäßen gibt, existieren auch zahlreiche Gemeinsamkeiten sowohl in morphologischer Hinsicht als auch in der Genexpression. Einen Schwerpunkt für zukünftige Arbeiten könnte die Untersuchung altersabhängiger Veränderungen im arteriellen Remodeling von normalen und atherosklerotischen Gefäßen darstellen, über die es gegenwärtig nahezu keine Informationen gibt. Desweiteren können tierexperimentelle morphologische und molekularbiologische Untersuchungen zur alters-abhängigen Entstehung und Progression der Atherosklerose und insbesondere die Auswertung von genomweiten Expressionsstudien einen Beitrag zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Atherosklerose leisten und zur Definition Atherosklerose- bzw. Remodeling- und Hyperlipidämie-assoziiierter Gene beitragen.

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehen mit Veränderungen der Morphologie und der strukturellen Integrität der Gefäßwand einher; die im Gefäß stattfindenden Umbauprozesse werden als Remodeling bezeichnet. Arteriell Remodeling, das auch unter physiologischen Bedingungen als Anpassung an veränderte hämodynamische Bedingungen erfolgt, ist von besonderer Bedeutung bei pathologischen Prozessen wie atherosklerotischen Gefäßveränderungen oder einer intimalen Hyperplasie. Dabei wird unterschieden zwischen expansivem (positivem) Remodeling, das kompensatorisch einer Gefäßstenose entgegenwirkt, und konstriktivem (negativem) Remodeling, das eine Gefäßstenose begünstigt. In der vorliegenden Arbeit wurden Remodelingprozesse in arteriellen Gefäßen von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen untersucht. Hierzu wurde einerseits in der A. carotis communis experimentell ein arterielles Remodeling induziert und andererseits wurde die mit arteriellem Remodeling assoziierte Atherosklerose in der Aorta charakterisiert. Durch eine intraluminale Schädigung des Gefäßendothels der A. carotis communis konnte in beiden Mauspopulationen ein positives arterielles Remodeling erzeugt und nachgewiesen werden, das durch die intraluminale Schädigung, nicht aber durch die äußere Manipulation am Gefäß während der Operation induziert wurde. Das Gefäßendothel wurde durch die intraluminale Schädigung nahezu vollständig entfernt bzw. zerstört. Die Deendothelialisierung induzierte morphologische Veränderungen in der geschädigten A. carotis communis wie die Proliferation von Zellen in der *Lamina media*, die Infiltration der *Lamina media* mit Makrophagen und das Auftreten von B- und T-Lymphozyten im perivaskulären Gewebe. In scheinoperierten Arterien sowie in unbehandelten Gefäßen wurden derartige Veränderungen nicht beobachtet. Zwischen WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen gab es deutliche Unterschiede in der Reaktion der Gefäße auf die Endothelschädigung. Die Deendothelialisierung führte in der A. carotis communis der ApoE^{-/-}-Maus zur Lipidablagerung bzw. Schaumzellbildung in der *Lamina media* und zu einer stärkeren Mediahypertrophie und somit zu einem stärkeren positiven arteriellen Remodeling als in den entsprechenden Gefäßen der WT-Maus. Die gemessenen morphometrischen Parameter deuten darauf hin, dass die Karotisarterien der hyperlipidämischen ApoE^{-/-}-Tiere eine erhöhte Sensibilität gegenüber der Endothelschädigung aufweisen. Molekularbiologische Untersuchungen von geschädigten und nichtgeschädigten Karotisarterien zeigten ebenfalls Unterschiede zwischen den Mauspopulationen, insbesondere in der Expression von Inhibitoren von Zytokinsignalwegen, antiapoptotischen Proteinen sowie von Proteinasen, die extrazelluläre Matrix degradieren und an immunologischen Prozessen wie Zytokin(in)-aktivierung und Antigenprozessierung mitwirken. Diese Gene wurden durch die Endothelschädigung nur in der A. carotis von WT-Mäusen induziert; sie waren in den nichtgeschädigten Gefäßen der ApoE^{-/-}-Mäuse bereits konstitutiv exprimiert. Die Expression von Chemokinen, Chemokinrezeptoren und proinflammatorischen Zytokinen wurde nicht durch den Genotyp beeinflusst. Eine erhöhte Expression dieser Gene in geschädigten im Vergleich zu nichtgeschädigten Gefäßen wurde sowohl bei ApoE^{-/-}- als auch bei WT-Tieren nachgewiesen, wobei es weder im Niveau noch im zeitlichen Verlauf der Expression Unterschiede zwischen den beiden Mauspopulationen gab. Mit Ausnahme von TNF α wurde für alle in der A. carotis untersuchten Gene eine erhöhte Expression in der atherosklerotischen Aorta von ApoE^{-/-}- im Vergleich zur nicht-atherosklerotischen Aorta von WT-Mäusen nachgewiesen. Darüber hinaus zeigten die mit Hilfe des Microarray (Affymetrix™) erhaltenen genomweiten Expressionsdaten der Aorta von WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen, dass in der ApoE^{-/-}- gegenüber der WT-Aorta eine Vielzahl von Genen signifikant

hochreguliert waren. Die Auswertung der Expressionsdaten zeigte, dass auffällig viele Gene mit immunologischen Prozessen, die sowohl zur innate als auch zur adaptiven Immunität gehören, assoziiert sind. Dazu zählen die Prozessierung und Präsentation von Antigenen über MHC II-Moleküle, die Aktivität von Zytokinen, Chemokin(rezeptor)en, TLRs und Scavenger-Rezeptoren, die Bindung von Immunglobulinen, die humorale Immunantwort bzw. eine Komplementaktivität sowie die Adhäsion und Migration von Leukozyten durch das Endothel. Die Befunde weisen auf eine mögliche Bedeutung dieser immunologischen Prozesse für die Atherosklerose bzw. das atherosklerose-assoziierte arterielle Remodeling hin. Mit zunehmendem Wachstum der atherosklerotischen Läsionen findet ein positives arterielles Remodeling in der Aorta statt, das einer möglichen Gefäßstenose entgegenwirkt. ApoE^{-/-}-Mäuse bilden spontan unter Standarddiät atherosklerotische Läsionen aus; die hier verwendeten 32 Wochen alten Mäuse wiesen ausgeprägte atherosklerotische Plaques im Aortenbogen und in der Abdominalaorta im Bereich der Nierenarterien und an der Bifurkation der Beckenarterien auf. Dagegen waren die Karotisarterien der ApoE^{-/-}-Mäuse makroskopisch frei von atherosklerotischen Läsionen. Sowohl die experimentell induzierte Deendothelialisierung der A. carotis und die atherosklerotischen Veränderungen in der Aorta sind mit einem positiven arteriellen Remodeling assoziiert, wobei zwischen den beiden pathologischen Prozessen zahlreiche Gemeinsamkeiten bestehen. Dies betrifft insbesondere die Expression von Chemokinen, Chemokinrezeptoren, Zytokinen, Mmps und ihren Inhibitoren, Cysteinproteinasen sowie Inhibitoren von Zytokinsignalwegen und antiapoptotischen Proteinen. Die dargestellten Befunde zur Genexpression bei atherosklerose-unabhängigen und atherosklerose-assoziierten Remodelingprozessen können einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen des pathologischen arteriellen Remodelings leisten.

Summary

Cardiovascular disorders are associated with morphological changes in the vessel wall and a loss of its structural integrity. The term “arterial remodeling” specifically refers to structural changes in the vessel wall which represent either an adaptation on physiological conditions such as changes in blood pressure or are associated with pathological conditions such as atherosclerosis or intima proliferation. Inward (constrictive, negative) remodeling denotes a reduction, outward (expansive, positive) remodeling an increase in vessel size. Restenosis after angioplasty is determined primarily by inward arterial remodeling rather than by intimal hyperplasia. Outward remodeling may be associated with plaque rupture, myocardial infarction, and sudden death. The aim of the work presented was to investigate arterial remodeling processes in arterial vessels of wild type (wt) and apolipoprotein E (apoE^{-/-})-deficient mice by i) experimental induction of arterial remodeling in the carotid artery of mice by means of a mechanical vessel wall damage, and ii) characterization of the arterial remodeling process in atherosclerotic aortae of hyperlipidemic mice. Intraluminal damage of the vessel wall resulting in the removal of the endothelium induced a positive arterial remodeling in carotid arteries of both wt and apoE^{-/-} mice, which was not found in sham-operated or non-treated control mice. The deendothelialization induced morphological changes in the damaged vessels such as cell proliferation and infiltration of the lamina media with macrophages as well as the presence of B and T cells in the perivascular tissue which were not found in sham-operated or untreated vessels. The vessel wall reaction after endothelial damage was clearly different between wt and apoE^{-/-} mice: The hypertrophy of the lamina media in the carotid artery and, thus, the positive arterial remodeling, was significantly stronger in apoE^{-/-} than in wt mice. Carotid arteries of hyperlipidemic apoE^{-/-} mice showed an age-dependent higher sensitivity against endothelial damage than wt mice. Endothelial damage induced in 32 weeks old apoE^{-/-} mice the formation of atherosclerotic lesions, whereas the morphologic changes in 12 weeks old apoE^{-/-} and wt mice after deendothelialization were nearly identical.

Biomolecular studies of damaged and non-damaged carotid arteries revealed differences between the two mouse populations in the expression of cytokines, inhibitors of cytokine signaling pathways, antiapoptotic proteins as well as extracellular matrix degrading proteinases which are involved in immunological processes such as cytokine activation and antigen processing. These genes were induced by endothelial damage only in the carotid artery of wt mice whereas they have already been expressed constitutively in non-damaged arteries of apoE^{-/-} mice. The expression of chemokines, chemokine receptors and proinflammatory cytokines was not influenced by the mouse genotype. An increased expression of these genes was found in damaged carotid arteries of both wt and apoE^{-/-} mice in comparison with non-damaged vessels; there were no differences in both the degree and the time-course of expression between the mouse populations. Except for TNF α there was an increased expression of all genes studied in the carotid artery in atherosclerotic aortae of apoE^{-/-} mice compared to non-atherosclerotic aortae of wt mice. Furthermore, genome-wide microarray expression analysis (AffymetrixTM) of the aortae from wt and apoE^{-/-} mice revealed a differential expression of numerous genes in the aorta of apoE^{-/-} compared to wt mice. Many of these genes are associated to both innate and adaptive immune responses such as MHC II antigen processing and presentation pathway, cytokine activities, chemokines and their receptors as well as scavenger receptors, binding von immune

globulines, the humoral immune answer as well as complement activity and adhesion and migration of leukocytes through the endothelium. The findings demonstrate a possible role of immune processes for atherosclerosis and atherosclerosis-associated arterial remodeling. Hyperlipidemic apoE^{-/-} mice spontaneously develop atherosclerotic lesions already under standard diet. The 32 weeks old apoE^{-/-} mice used in our studies had atherosclerotic plaques in the abdominal aorta, especially at the bifurcations of renal and iliac arteries. Further growth of atherosclerotic lesions is associated with a positive arterial remodeling which counteracts the development of a vessel stenosis. Macroscopic investigation of the carotid arteries of hyperlipidemic apoE^{-/-} mice did not reveal the presence of atherosclerotic lesions. Reactions of the vessel wall after experimental deendothelialization and the development of atherosclerotic lesions are associated with a positive arterial remodeling. Both pathological processes show common features with regard to the expression of chemokines and their receptors, cytokines, matrix metalloproteinases and their inhibitors as well as cysteine proteinases and inhibitors of cytokine signaling pathways and antiapoptotic proteins. The knowledge of the expression of defined genes in atherosclerosis-independent and atherosclerosis-associated remodeling processes may contribute to a better understanding of the molecular mechanisms of arterial remodeling.

- Aiello, R. J., P. A. Bourassa, et al. (1999). "Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(6): 1518-25.
- Alexander, W. S. and D. J. Hilton (2004). "The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response." *Annu Rev Immunol* 22: 503-29.
- Alexander, W. S., R. Starr, et al. (1999). "Suppressors of cytokine signaling (SOCS): negative regulators of signal transduction." *J Leukoc Biol* 66(4): 588-92.
- Ashkar, S., G. F. Weber, et al. (2000). "Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity." *Science* 287(5454): 860-4.
- Aslanian, A. M. and I. F. Charo (2006). "Targeted disruption of the scavenger receptor and chemokine CXCL16 accelerates atherosclerosis." *Circulation* 114(6): 583-90.
- Benaglio, M., M. M. D'Elia, et al. (2005). "Human 60-kDa heat shock protein is a target autoantigen of T cells derived from atherosclerotic plaques." *J Immunol* 174(10): 6509-17.
- Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). "Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing." *Journal of the Royal Statistical Society (Series B)* 57 (1): 289-300.
- Bentzon, J. F., G. Pasterkamp, et al. (2003). "Expansive remodeling is a response of the plaque-related vessel wall in aortic roots of apoE-deficient mice: an experiment of nature." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(2): 257-62.
- Berahovich, R. D., Z. Miao, et al. (2005). "Proteolytic activation of alternative CCR1 ligands in inflammation." *J Immunol* 174(11): 7341-51.
- Blankenberg, S., S. Barbaux, et al. (2003). "Adhesion molecules and atherosclerosis." *Atherosclerosis* 170(2): 191-203.
- Bobik, A., A. Agrotis, et al. (1999). "Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development." *Circulation* 99(22): 2883-91.
- Bobryshev, Y. V. (2006). "Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis." *Micron* 37(3): 208-22.
- Bobryshev, Y. V. and T. Watanabe (1997). "Ultrastructural evidence for association of vascular dendritic cells with T-lymphocytes and with B-cells in human atherosclerosis." *J Submicrosc Cytol Pathol* 29(2): 209-21.
- Boisvert, W. A., D. M. Rose, et al. (2006). "Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO-alpha in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression." *Am J Pathol* 168(4): 1385-95.
- Bonthu, S., D. D. Heistad, et al. (1997). "Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11): 2333-40.
- Branen, L., L. Hovgaard, et al. (2004). "Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(11): 2137-42.
- Braunersreuther, V., A. Zernecke, et al. (2007). "Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(2): 373-9.
- Caligiuri, G., B. Levy, et al. (1999). "Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12): 6920-4.
- Caligiuri, G., M. Rudling, et al. (2003). "Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice." *Mol Med* 9(1-2): 10-7.

- Canfield, A. E., C. Farrington, et al. (2002). "The involvement of matrix glycoproteins in vascular calcification and fibrosis: an immunohistochemical study." *J Pathol* 196(2): 228-34.
- Carmeliet, P., L. Moons, et al. (1997). "Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice." *Am J Pathol* 150(2): 761-76.
- Cauwe, B., P. E. Van den Steen, et al. (2007). "The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42(3): 113-85.
- Chamberlain, J., D. Evans, et al. (2006). "Interleukin-1beta and signaling of interleukin-1 in vascular wall and circulating cells modulates the extent of neointima formation in mice." *Am J Pathol* 168(4): 1396-403.
- Cheng, X. W., M. Kuzuya, et al. (2004). "Increased expression of elastolytic cysteine proteases, cathepsins S and K, in the neointima of balloon-injured rat carotid arteries." *Am J Pathol* 164(1): 243-51.
- Cheung, W. M., M. R. D'Andrea, et al. (1999). "Altered vascular injury responses in mice deficient in protease-activated receptor-1." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(12): 3014-24.
- Chiba, S., H. Okamoto, et al. (2002). "Development of atherosclerosis in osteopontin transgenic mice." *Heart Vessels* 16(3): 111-7.
- Choudhury, R. P., Z. A. Fayad, et al. (2003). "Serial, noninvasive, in vivo magnetic resonance microscopy detects the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice and its progression by arterial wall remodeling." *J Magn Reson Imaging* 17(2): 184-9.
- Cipollone, F., M. Fazio, et al. (2004). "Increased expression of transforming growth factor-beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques." *Stroke* 35(10): 2253-7.
- Coleman, R., T. Hayek, et al. (2006). "A mouse model for human atherosclerosis: long-term histopathological study of lesion development in the aortic arch of apolipoprotein E-deficient (E0) mice." *Acta Histochem* 108(6): 415-24.
- Condorelli, G., J. K. Aycock, et al. (2001). "Mutated p21/WAF/CIP transgene overexpression reduces smooth muscle cell proliferation, macrophage deposition, oxidation-sensitive mechanisms, and restenosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E knockout mice." *Faseb J* 15(12): 2162-70.
- Croker, B. A., D. L. Krebs, et al. (2003). "SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo." *Nat Immunol* 4(6): 540-5.
- d'Uscio, L. V., T. A. Baker, et al. (2001). "Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(6): 1017-22.
- Dai, G., M. R. Kaazempur-Mofrad, et al. (2004). "Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(41): 14871-6.
- Dansky, H. M., S. A. Charlton, et al. (1999). "Genetic background determines the extent of atherosclerosis in ApoE-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(8): 1960-8.
- Daugherty, A. (2002). "Mouse models of atherosclerosis." *Am J Med Sci* 323(1): 3-10.
- Daugherty, A., N. R. Webb, et al. (2005). "Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokine regulation of macrophage functions in atherogenesis." *J Lipid Res* 46(9): 1812-22.
- Davies, M. J. (1996). "The contribution of thrombosis to the clinical expression of coronary atherosclerosis." *Thromb Res* 82(1): 1-32.
- Dawson, T. C., W. A. Kuziel, et al. (1999). "Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Atherosclerosis* 143(1): 205-11.

- De Geest, B., Z. Zhao, et al. (1997). "Effects of adenovirus-mediated human apo A-I gene transfer on neointima formation after endothelial denudation in apo E-deficient mice." *Circulation* 96(12): 4349-56.
- Deguchi, J. O., E. Aikawa, et al. (2005). "Matrix metalloproteinase-13/collagenase-3 deletion promotes collagen accumulation and organization in mouse atherosclerotic plaques." *Circulation* 112(17): 2708-15.
- Denhardt, D. T., M. Noda, et al. (2001). "Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival." *J Clin Invest* 107(9): 1055-61.
- Dhalla, N. S., R. M. Temsah, et al. (2000). "Role of oxidative stress in cardiovascular diseases." *J Hypertens* 18(6): 655-73.
- Dollery, C. M., S. E. Humphries, et al. (1999). "Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 by use of an adenoviral vector inhibits smooth muscle cell migration and reduces neointimal hyperplasia in the rat model of vascular balloon injury." *Circulation* 99(24): 3199-205.
- Dollery, C. M. and P. Libby (2006). "Atherosclerosis and proteinase activation." *Cardiovasc Res* 69(3): 625-35.
- Drew, A. F., H. L. Tucker, et al. (2000). "Plasminogen is a critical determinant of vascular remodeling in mice." *Circ Res* 87(2): 133-9.
- Dudoit, S., Y. H. Yang, et al. (2002). "Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments." *Statistica Sinica* 12 %8 2002(1): 111-139.
- Eefting, D., A. Schepers, et al. (2007). "The effect of interleukin-10 knock-out and overexpression on neointima formation in hypercholesterolemic APOE*3-Leiden mice." *Atherosclerosis* 193(2): 335-42.
- Eisen, E. J. and J. P. Hanrahan (1974). "Genetic drift and inbreeding depression measured from control populations of mice." *Can J Genet Cytol* 16(1): 91-104.
- Febbraio, M., E. A. Podrez, et al. (2000). "Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice." *J Clin Invest* 105(8): 1049-56.
- Feingold, K. R., P. M. Elias, et al. (1995). "Apolipoprotein E deficiency leads to cutaneous foam cell formation in mice." *J Invest Dermatol* 104(2): 246-50.
- Furnkranz, A., A. Schober, et al. (2005). "Oxidized phospholipids trigger atherogenic inflammation in murine arteries." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(3): 633-8.
- Gabay, C. (2006). "Interleukin-6 and chronic inflammation." *Arthritis Res Ther* 8 Suppl 2: S3.
- Galis, Z. S., G. K. Sukhova, et al. (1995). "Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(2): 402-6.
- Galis, Z. S., G. K. Sukhova, et al. (1994). "Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques." *J Clin Invest* 94(6): 2493-503.
- Garcia-Touchard, A., T. D. Henry, et al. (2005). "Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(6): 1119-27.
- Getz, G. S. (2000). "Mouse model of unstable atherosclerotic plaque?" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(12): 2503-5.
- Gimbrone, M. A., Jr. (1999). "Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis." *Am J Pathol* 155(1): 1-5.
- Glass, C. K. and J. L. Witztum (2001). "Atherosclerosis. the road ahead." *Cell* 104(4): 503-16.
- Gough, P. J., I. G. Gomez, et al. (2006). "Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice." *J Clin Invest* 116(1): 59-69.

- Grainger, D. J., P. R. Kemp, et al. (1995). "The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis." *Nat Med* 1(1): 74-9.
- Grainger, D. J., D. E. Mosedale, et al. (2000). "Dietary fat and reduced levels of TGFbeta1 act synergistically to promote activation of the vascular endothelium and formation of lipid lesions." *J Cell Sci* 113 (Pt 13): 2355-61.
- Greenow, K., N. J. Pearce, et al. (2005). "The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis." *J Mol Med* 83(5): 329-42.
- Greve, J. M., A. S. Les, et al. (2006). "Allometric scaling of wall shear stress from mice to humans: quantification using cine phase-contrast MRI and computational fluid dynamics." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(4): H1700-8.
- Gu, L., Y. Okada, et al. (1998). "Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice." *Mol Cell* 2(2): 275-81.
- Gupta, S., A. M. Pablo, et al. (1997). "IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice." *J Clin Invest* 99(11): 2752-61.
- Hagiwara, H., M. Mitsumata, et al. (1998). "Laminar shear stress-induced GRO mRNA and protein expression in endothelial cells." *Circulation* 98(23): 2584-90.
- Hamasaki, A., F. Sendo, et al. (1998). "Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene." *J Exp Med* 188(11): 1985-92.
- Han, C. I., G. R. Campbell, et al. (2001). "Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation." *J Vasc Res* 38(2): 113-9.
- Hansson, G. K., L. Jonasson, et al. (1989). "Immune mechanisms in atherosclerosis." *Arteriosclerosis* 9(5): 567-78.
- Hansson, G. K. and P. Libby (2006). "The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword." *Nat Rev Immunol* 6(7): 508-19.
- Hansson, G. K., P. Libby, et al. (2002). "Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis." *Circ Res* 91(4): 281-91.
- Harada, K., I. Komuro, et al. (1999). "Vascular injury causes neointimal formation in angiotensin II type 1a receptor knockout mice." *Circ Res* 84(2): 179-85.
- Harmon, K. J., L. L. Couper, et al. (2000). "Strain-dependent vascular remodeling phenotypes in inbred mice." *Am J Pathol* 156(5): 1741-8.
- Harvey, E. J. and D. P. Ramji (2005). "Interferon-gamma and atherosclerosis: pro- or anti-atherogenic?" *Cardiovasc Res* 67(1): 11-20.
- Hill, J. M., P. S. Bhattacharjee, et al. (2006). "Apolipoprotein E alleles can contribute to the pathogenesis of numerous clinical conditions including HSV-1 corneal disease." *Exp Eye Res* 84(5): 801-11.
- Hoebe, K., E. Janssen, et al. (2004). "The interface between innate and adaptive immunity." *Nat Immunol* 5(10): 971-4.
- Hoi-Sen, Y. (1972). "Is subline differentiation a continuing process in inbred strains of mice?" *Genet Res* 19(1): 53-9.
- Hollestelle, S. C., M. R. De Vries, et al. (2004). "Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling." *Circulation* 109(3): 393-8.
- Honey, K. and A. Y. Rudensky (2003). "Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation." *Nat Rev Immunol* 3(6): 472-82.

- Horiba, M., K. Kadomatsu, et al. (2000). "Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice." *J Clin Invest* 105(4): 489-95.
- Houtkamp, M. A., O. J. de Boer, et al. (2001). "Adventitial infiltrates associated with advanced atherosclerotic plaques: structural organization suggests generation of local humoral immune responses." *J Pathol* 193(2): 263-9.
- Hsing, L. C. and A. Y. Rudensky (2005). "The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation." *Immunol Rev* 207: 229-41.
- Huang, A. L. and J. A. Vita (2006). "Effects of systemic inflammation on endothelium-dependent vasodilation." *Trends Cardiovasc Med* 16(1): 15-20.
- Huber, S. A., P. Sakkinen, et al. (1999). "Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(10): 2364-7.
- Hughes, D. A., P. J. Townsend, et al. (1992). "Enhancement of the antigen-presenting function of monocytes by cholesterol: possible relevance to inflammatory mechanisms in extrinsic allergic alveolitis and atherosclerosis." *Clin Exp Immunol* 87(2): 279-86.
- Hulthe, J. (2004). "Antibodies to oxidized LDL in atherosclerosis development--clinical and animal studies." *Clin Chim Acta* 348(1-2): 1-8.
- Ignarro, L. J. and C. Napoli (2004). "Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis." *Curr Atheroscler Rep* 6(4): 281-7.
- Ikeda, U. (2003). "Inflammation and coronary artery disease." *Curr Vasc Pharmacol* 1(1): 65-70.
- Inoue, S., K. Egashira, et al. (2002). "Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice." *Circulation* 106(21): 2700-6.
- Ishibashi, S., J. L. Goldstein, et al. (1994). "Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice." *J Clin Invest* 93(5): 1885-93.
- Ishihara, K. and T. Hirano (2002). "IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease." *Cytokine Growth Factor Rev* 13(4-5): 357-68.
- Isoda, K., Y. Kamezawa, et al. (2003). "Osteopontin transgenic mice fed a high-cholesterol diet develop early fatty-streak lesions." *Circulation* 107(5): 679-81.
- Isoda, K., K. Nishikawa, et al. (2002). "Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation." *Circ Res* 91(1): 77-82.
- Isoda, K. and F. Ohsuzu (2006). "The effect of interleukin-1 receptor antagonist on arteries and cholesterol metabolism." *J Atheroscler Thromb* 13(1): 21-30.
- Isoda, K., S. Sawada, et al. (2004). "Lack of interleukin-1 receptor antagonist modulates plaque composition in apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(6): 1068-73.
- Ivan, E., J. J. Khatri, et al. (2002). "Expansive arterial remodeling is associated with increased neointimal macrophage foam cell content: the murine model of macrophage-rich carotid artery lesions." *Circulation* 105(22): 2686-91.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." *Nat Immunol* 5(10): 987-95.
- Jang, M. K., J. Y. Kim, et al. (2004). "Oxidized low-density lipoproteins may induce expression of monocyte chemotactic protein-3 in atherosclerotic plaques." *Biochem Biophys Res Commun* 323(3): 898-905.

- Jawien, J., P. Nastalek, et al. (2004). "Mouse models of experimental atherosclerosis." *J Physiol Pharmacol* 55(3): 503-17.
- Jeng, A. Y., M. Chou, et al. (1999). "Enhanced expression of matrix metalloproteinase-3, -12, and -13 mRNAs in the aortas of apolipoprotein E-deficient mice with advanced atherosclerosis." *Ann N Y Acad Sci* 878: 555-8.
- Johnson, C. D., Y. Balagurunathan, et al. (2003). "Genomic profiles and predictive biological networks in oxidant-induced atherogenesis." *Physiol Genomics* 13(3): 263-75.
- Johnson, J., K. Carson, et al. (2005). "Plaque rupture after short periods of fat feeding in the apolipoprotein E-knockout mouse: model characterization and effects of pravastatin treatment." *Circulation* 111(11): 1422-30.
- Johnson, J. L. and C. L. Jackson (2001). "Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse." *Atherosclerosis* 154(2): 399-406.
- Jormsjo, S., D. M. Wuttge, et al. (2002). "Differential expression of cysteine and aspartic proteases during progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Am J Pathol* 161(3): 939-45.
- Kadar, A. and S. Bjorkerud (1985). "Arterial remodeling following mechanical injury. The role and nature of smooth muscle cells." *Pathol Res Pract* 180(4): 342-7.
- Kamimura, D., K. Ishihara, et al. (2003). "IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149: 1-38.
- Kanzaki, T., K. Tamura, et al. (1995). "In vivo effect of TGF- beta 1. Enhanced intimal thickening by administration of TGF- beta 1 in rabbit arteries injured with a balloon catheter." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(11): 1951-7.
- Karsan, A., E. Yee, et al. (1996). "Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor-alpha is inhibited by the Bcl-2 family member, A1." *J Biol Chem* 271(44): 27201-4.
- Kerber, R. E., D. D. McPherson, et al. (1989). "What have we learned about coronary artery disease from high-frequency epicardial echocardiography?" *Int J Card Imaging* 4(2-4): 169-76.
- Kim, C. H. (2004). "Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking." *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 4(4): 343-61.
- Kishimoto, T. (2005). "Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology." *Annu Rev Immunol* 23: 1-21.
- Kishimoto, T. (2006). "Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine." *Arthritis Res Ther* 8 Suppl 2: S2.
- Kobayashi, K., L. R. Lopez, et al. (2005). "The role of innate and adaptive immunity to oxidized low-density lipoprotein in the development of atherosclerosis." *Ann N Y Acad Sci* 1051: 442-54.
- Korshunov, V. A. and B. C. Berk (2004). "Strain-dependent vascular remodeling: the "Glagov phenomenon" is genetically determined." *Circulation* 110(2): 220-6.
- Kubo, M., T. Hanada, et al. (2003). "Suppressors of cytokine signaling and immunity." *Nat Immunol* 4(12): 1169-76.
- Kuhel, D. G., B. Zhu, et al. (2002). "Distinction in genetic determinants for injury-induced neointimal hyperplasia and diet-induced atherosclerosis in inbred mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(6): 955-60.
- Kumar, A. and V. Lindner (1997). "Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(10): 2238-44.

- Kuzuya, M. and A. Iguchi (2003). "Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling." *J Atheroscler Thromb* 10(5): 275-82.
- Kwon, H. M., B. K. Hong, et al. (2000). "Expression of osteopontin in calcified coronary atherosclerotic plaques." *J Korean Med Sci* 15(5): 485-93.
- Landmesser, U., B. Hornig, et al. (2004). "Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?" *Circulation* 109(21 Suppl 1): II27-33.
- Laskowitz, D. T., D. M. Lee, et al. (2000). "Altered immune responses in apolipoprotein E-deficient mice." *J Lipid Res* 41(4): 613-20.
- Lau, P. P., L. Li, et al. (2006). "Nicotine induces proinflammatory responses in macrophages and the aorta leading to acceleration of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor(-/-) mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(1): 143-9.
- Laurat, E., B. Poirier, et al. (2001). "In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice." *Circulation* 104(2): 197-202.
- Leidenfrost, J. E., M. F. Khan, et al. (2003). "A model of primary atherosclerosis and post-angioplasty restenosis in mice." *Am J Pathol* 163(2): 773-8.
- Leitinger, N. (2005). "Oxidized phospholipids as triggers of inflammation in atherosclerosis." *Mol Nutr Food Res* 49(11): 1063-71.
- Lemaitre, V., P. D. Soloway, et al. (2003). "Increased medial degradation with pseudo-aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice deficient in tissue inhibitor of metalloproteinases-1." *Circulation* 107(2): 333-8.
- Lessner, S. M., D. E. Martinson, et al. (2004). "Compensatory vascular remodeling during atherosclerotic lesion growth depends on matrix metalloproteinase-9 activity." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(11): 2123-9.
- Lijnen, H. R., P. Soloway, et al. (1999). "Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 impairs arterial neointima formation after vascular injury in mice." *Circ Res* 85(12): 1186-91.
- Lindner, V. (2001). "Vascular repair processes mediated by transforming growth factor-beta." *Z Kardiol* 90 Suppl 3: 17-22.
- Lindner, V., J. Fingerle, et al. (1993). "Mouse model of arterial injury." *Circ Res* 73(5): 792-6.
- Liu, J., G. K. Sukhova, et al. (2006). "Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells." *Atherosclerosis* 184(2): 302-11.
- Liu, W. and D. M. Spero (2004). "Cysteine protease cathepsin S as a key step in antigen presentation." *Drug News Perspect* 17(6): 357-63.
- Loftus, I. M., A. R. Naylor, et al. (2002). "Matrix metalloproteinases and atherosclerotic plaque instability." *Br J Surg* 89(6): 680-94.
- Lord, R. S. and Y. V. Bobryshev (2002). "Hallmarks of atherosclerotic lesion development with special reference to immune inflammatory mechanisms." *Cardiovasc Surg* 10(4): 405-14.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." *Nature* 407(6801): 233-41.
- Lutgens, E., E. D. de Muinck, et al. (2001). "Compensatory enlargement and stenosis develop in apoE(-/-) and apoE*3-Leiden transgenic mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(8): 1359-65.
- Lutgens, E., B. Faber, et al. (2005). "Gene profiling in atherosclerosis reveals a key role for small inducible cytokines: validation using a novel monocyte chemoattractant protein monoclonal antibody." *Circulation* 111(25): 3443-52.

- Lutgens, E., M. Gijbels, et al. (2002). "Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(6): 975-82.
- Lutgens, E., S. P. Lutgens, et al. (2006). "Disruption of the cathepsin K gene reduces atherosclerosis progression and induces plaque fibrosis but accelerates macrophage foam cell formation." *Circulation* 113(1): 98-107.
- Lutgens, S. P., K. B. Cleutjens, et al. (2007). "Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease." *Faseb J* 21(12): 3029-41.
- Madamanchi, N. R., A. Vendrov, et al. (2005). "Oxidative stress and vascular disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(1): 29-38.
- Majesky, M. W., V. Lindner, et al. (1991). "Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury." *J Clin Invest* 88(3): 904-10.
- Malek, A. M., S. L. Alper, et al. (1999). "Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis." *Jama* 282(21): 2035-42.
- Mallat, Z., S. Besnard, et al. (1999). "Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis." *Circ Res* 85(8): e17-24.
- Mallat, Z., A. Gojova, et al. (2003). "Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice." *Circulation* 108(10): 1232-7. Epub 2003 Aug 11.
- Mallat, Z., A. Gojova, et al. (2001). "Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice." *Circ Res* 89(10): 930-4.
- Mandal, K., M. Jahangiri, et al. (2005). "Autoimmune mechanisms of atherosclerosis." *Handb Exp Pharmacol*(170): 723-43.
- Matias-Roman, S., B. G. Galvez, et al. (2005). "Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in migration of human monocytes and is regulated through their interaction with fibronectin or endothelium." *Blood* 105(10): 3956-64.
- Maurer, M. and E. von Stebut (2004). "Macrophage inflammatory protein-1." *Int J Biochem Cell Biol* 36(10): 1882-6.
- McCawley, L. J. and L. M. Matrisian (2001). "Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!" *Curr Opin Cell Biol* 13(5): 534-40.
- McFadden, E. P., L. Chaabane, et al. (2004). "In vivo magnetic resonance imaging of large spontaneous aortic aneurysms in old apolipoprotein E-deficient mice." *Invest Radiol* 39(10): 585-90.
- McQuibban, G. A., G. S. Butler, et al. (2001). "Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1." *J Biol Chem* 276(47): 43503-8.
- McQuibban, G. A., J. H. Gong, et al. (2002). "Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo." *Blood* 100(4): 1160-7.
- Menten, P., A. Wuyts, et al. (2002). "Macrophage inflammatory protein-1." *Cytokine Growth Factor Rev* 13(6): 455-81.
- Michelsen, K. S., T. M. Doherty, et al. (2004). "TLR signaling: an emerging bridge from innate immunity to atherogenesis." *J Immunol* 173(10): 5901-7.
- Miller, Y. I., M. K. Chang, et al. (2003). "Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors." *Curr Opin Lipidol* 14(5): 437-45.

- Moghadasian, M. H., B. M. McManus, et al. (2001). "Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans." *Faseb J* 15(14): 2623-30.
- Moghadasian, M. H., L. B. Nguyen, et al. (1999). "Histologic, hematologic, and biochemical characteristics of apo E-deficient mice: effects of dietary cholesterol and phytosterols." *Lab Invest* 79(3): 355-64.
- Moiseeva, E. P. (2001). "Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions." *Cardiovasc Res* 52(3): 372-86.
- Monaco, C., E. Andreacos, et al. (2004). "T-cell-mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases." *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3(1): 35-42.
- Moore, Z. W., B. Zhu, et al. (2004). "Vascular apolipoprotein e expression and recruitment from circulation to modulate smooth muscle cell response to endothelial denudation." *Am J Pathol* 164(6): 2109-16.
- Moos, M. P., N. John, et al. (2005). "The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(11): 2386-91.
- Moreb, J. S. and M. Schweder (1997). "Human A1, a Bcl-2-related gene, is induced in leukemic cells by cytokines as well as differentiating factors." *Leukemia* 11(7): 998-1004.
- Morgan, A. R., K. Rerkasem, et al. (2004). "Differences in matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 transcript levels among carotid atherosclerotic plaques with different histopathological characteristics." *Stroke* 35(6): 1310-5.
- Mori, E., K. Komori, et al. (2002). "Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits." *Circulation* 105(24): 2905-10.
- Moroi, M., L. Zhang, et al. (1998). "Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice." *J Clin Invest* 101(6): 1225-32.
- Myers, D. L., K. J. Harmon, et al. (2003). "Alterations of arterial physiology in osteopontin-null mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(6): 1021-8.
- Nabel, E. G., L. Shum, et al. (1993). "Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22): 10759-63.
- Nakashima, Y., A. S. Plump, et al. (1994). "ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree." *Arterioscler Thromb* 14(1): 133-40.
- Napoli, C., F. P. D'Armiento, et al. (1997). "Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions." *J Clin Invest* 100(11): 2680-90.
- Nicklin, M. J., D. E. Hughes, et al. (2000). "Arterial inflammation in mice lacking the interleukin 1 receptor antagonist gene." *J Exp Med* 191(2): 303-12.
- Nishina, P. M., J. Verstuyft, et al. (1990). "Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse." *J Lipid Res* 31(5): 859-69.
- Ohta, H., H. Wada, et al. (2005). "Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice." *Atherosclerosis* 180(1): 11-7.
- Okamoto, H. (2006). "Osteopontin and cardiovascular system." *Mol Cell Biochem* 300(1-2): 1-7.

- Oorni, K., M. Sneek, et al. (2004). "Cysteine protease cathepsin F is expressed in human atherosclerotic lesions, is secreted by cultured macrophages, and modifies low density lipoprotein particles in vitro." *J Biol Chem* 279(33): 34776-84.
- Page-McCaw, A., A. J. Ewald, et al. (2007). "Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(3): 221-33.
- Paigen, B., A. Morrow, et al. (1985). "Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice." *Atherosclerosis* 57(1): 65-73.
- Paigen, B., A. Morrow, et al. (1987). "Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice." *Atherosclerosis* 68(3): 231-40.
- Park, I. K., Y. He, et al. (2002). "Differential gene expression profiling of adult murine hematopoietic stem cells." *Blood* 99(2): 488-98.
- Parks, W. C., C. L. Wilson, et al. (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." *Nat Rev Immunol* 4(8): 617-29.
- Pasterkamp, G., A. H. Schoneveld, et al. (1997). "The impact of atherosclerotic arterial remodeling on percentage of luminal stenosis varies widely within the arterial system. A postmortem study." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11): 3057-63.
- Pasterkamp, G., J. K. Van Keulen, et al. (2004). "Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease." *Eur J Clin Invest* 34(5): 328-34.
- Peters, W. and I. F. Charo (2001). "Involvement of chemokine receptor 2 and its ligand, monocyte chemoattractant protein-1, in the development of atherosclerosis: lessons from knockout mice." *Curr Opin Lipidol* 12(2): 175-80.
- Piedrahita, J. A., S. H. Zhang, et al. (1992). "Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10): 4471-5.
- Pinderski, L. J., M. P. Fischbein, et al. (2002). "Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient Mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes." *Circ Res* 90(10): 1064-71.
- Plump, A. S., J. D. Smith, et al. (1992). "Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells." *Cell* 71(2): 343-53.
- Poirier, J. (2005). "Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 26(3): 355-61.
- Potteaux, S., B. Esposito, et al. (2004). "Leukocyte-derived interleukin 10 is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(8): 1474-8.
- Pyo, R., J. K. Lee, et al. (2000). "Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms." *J Clin Invest* 105(11): 1641-9.
- R project (2006). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria {ISBN} 3-900051-07-0, R Foundation for Statistical Computing.
- Rader, D. J. and E. Pure (2000). "Genetic susceptibility to atherosclerosis: insights from mice." *Circ Res* 86(10): 1013-5.
- Raines, E. W. (2000). "The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease." *Int J Exp Pathol* 81(3): 173-82.
- Raines, E. W. and N. Ferri (2005). "Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease." *J Lipid Res* 46(6): 1081-92.

- Rajavashisth, T. B., X. P. Xu, et al. (1999). "Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators." *Circulation* 99(24): 3103-9.
- Rakesh, K. and D. K. Agrawal (2005). "Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors." *Biochem Pharmacol* 70(5): 649-57.
- Reckless, J., E. M. Rubin, et al. (1999). "Monocyte chemoattractant protein-1 but not tumor necrosis factor-alpha is correlated with monocyte infiltration in mouse lipid lesions." *Circulation* 99(17): 2310-6.
- Rectenwald, J. E., R. M. Minter, et al. (2002). "Interleukin-10 fails to modulate low shear stress-induced neointimal hyperplasia." *J Surg Res* 102(2): 110-8.
- Rectenwald, J. E., L. L. Moldawer, et al. (2000). "Direct evidence for cytokine involvement in neointimal hyperplasia." *Circulation* 102(14): 1697-702.
- Reddick, R. L., S. H. Zhang, et al. (1994). "Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression." *Arterioscler Thromb* 14(1): 141-7.
- Reddick, R. L., S. H. Zhang, et al. (1998). "Aortic atherosclerotic plaque injury in apolipoprotein E deficient mice." *Atherosclerosis* 140(2): 297-305.
- Regan, C. P., P. J. Adam, et al. (2000). "Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury." *J Clin Invest* 106(9): 1139-47.
- Robert, C. G., J. C. Vincent, et al. (2004). "Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics." *Genome Biology* 5: R80.
- Robertson, A. K., M. Rudling, et al. (2003). "Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis." *J Clin Invest* 112(9): 1342-50.
- Robertson, A. K., X. Zhou, et al. (2004). "Severe hypercholesterolaemia leads to strong Th2 responses to an exogenous antigen." *Scand J Immunol* 59(3): 285-93.
- Rodgers, K. J., D. J. Watkins, et al. (2006). "Destabilizing role of cathepsin S in murine atherosclerotic plaques." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(4): 851-6.
- Roque, M., J. T. Fallon, et al. (2000). "Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(2): 335-42.
- Roque, M., W. J. Kim, et al. (2002). "CCR2 deficiency decreases intimal hyperplasia after arterial injury." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(4): 554-9.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." *N Engl J Med* 340(2): 115-26.
- Rouis, M., C. Adamy, et al. (1999). "Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice." *Circulation* 100(5): 533-40.
- Rudensky, A. and C. Beers (2006). "Lysosomal cysteine proteases and antigen presentation." *Ernst Schering Res Found Workshop*(56): 81-95.
- Ryan, S. T., V. E. Kotliansky, et al. (2003). "Transforming growth factor-beta-dependent events in vascular remodeling following arterial injury." *J Vasc Res* 40(1): 37-46.
- Sasaki, T., M. Kuzuya, et al. (2006). "A simple method of plaque rupture induction in apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(6): 1304-9.
- Sata, M., Y. Maejima, et al. (2000). "A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia." *J Mol Cell Cardiol* 32(11): 2097-104.

- Sata, M., A. Saiura, et al. (2002). "Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis." *Nat Med* 8(4): 403-9.
- Schieffer, B., T. Selle, et al. (2004). "Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis." *Circulation* 110(22): 3493-500.
- Schober, A., S. Knarren, et al. (2003). "Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice." *Circulation* 108(20): 2491-7.
- Schober, A., D. Manka, et al. (2002). "Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury." *Circulation* 106(12): 1523-9.
- Schober, A., A. Zerneck, et al. (2004). "Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets." *Circ Res* 95(11): 1125-33.
- Schoneveld, A. H., M. M. Oude Nijhuis, et al. (2005). "Toll-like receptor 2 stimulation induces intimal hyperplasia and atherosclerotic lesion development." *Cardiovasc Res* 66(1): 162-9.
- Schreyer, S. A., C. M. Vick, et al. (2002). "Loss of lymphotoxin-alpha but not tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in mice." *J Biol Chem* 277(14): 12364-8.
- Seo, H. S., D. M. Lombardi, et al. (1997). "Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. Potential roles of lipid deposition, medial atrophy, and adventitial inflammation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(12): 3593-601.
- Sheikine, Y. and G. K. Hansson (2004). "Chemokines and atherosclerosis." *Ann Med* 36(2): 98-118.
- Silence, J., D. Collen, et al. (2002). "Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene." *Circ Res* 90(8): 897-903.
- Simon, D. I., Z. Dhen, et al. (2000). "Decreased neointimal formation in Mac-1(-/-) mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty." *J Clin Invest* 105(3): 293-300.
- Simper, D., P. G. Stalboerger, et al. (2002). "Smooth muscle progenitor cells in human blood." *Circulation* 106(10): 1199-204.
- Singh, M., S. Ananthula, et al. (2007). "Osteopontin: a novel inflammatory mediator of cardiovascular disease." *Front Biosci* 12: 214-21.
- Singh, N. N. and D. P. Ramji (2006). "The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis." *Cytokine Growth Factor Rev* 17(6): 487-99.
- Sluijter, J. P., D. P. de Kleijn, et al. (2006). "Vascular remodeling and protease inhibition--bench to bedside." *Cardiovasc Res* 69(3): 595-603.
- Smeglin, A. and W. H. Frishman (2004). "Elastolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors as therapeutic targets in atherosclerotic plaque instability." *Cardiol Rev* 12(3): 141-50.
- Smith, J. D., D. James, et al. (2003). "In silico quantitative trait locus map for atherosclerosis susceptibility in apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(1): 117-22.
- Stary, H. C., A. B. Chandler, et al. (1994). "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." *Circulation* 89(5): 2462-78.
- Steinberg, D. and J. L. Witztum (2002). "Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis?" *Circulation* 105(17): 2107-11.

- Storm van's Gravesande, K., M. D. Layne, et al. (2002). "IFN regulatory factor-1 regulates IFN-gamma-dependent cathepsin S expression." *J Immunol* 168(9): 4488-94.
- Sukhova, G. K., U. Schonbeck, et al. (1999). "Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques." *Circulation* 99(19): 2503-9.
- Sukhova, G. K., Y. Zhang, et al. (2003). "Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice." *J Clin Invest* 111(6): 897-906.
- Sukovich, D. A., K. Kauser, et al. (1998). "Expression of interleukin-6 in atherosclerotic lesions of male ApoE-knockout mice: inhibition by 17beta-estradiol." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(9): 1498-505.
- Suzuki, H., Y. Kurihara, et al. (1997). "A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection." *Nature* 386(6622): 292-6.
- t Hoen, P. A., C. A. Van der Lans, et al. (2003). "Aorta of ApoE-deficient mice responds to atherogenic stimuli by a prelesional increase and subsequent decrease in the expression of antioxidant enzymes." *Circ Res* 93(3): 262-9.
- Tabibiazar, R., R. A. Wagner, et al. (2005). "Mouse strain-specific differences in vascular wall gene expression and their relationship to vascular disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(2): 302-8.
- Takeya, M., T. Yoshimura, et al. (1993). "Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody." *Hum Pathol* 24(5): 534-9.
- Tan, J. C. and R. Rabkin (2005). "Suppressors of cytokine signaling in health and disease." *Pediatr Nephrol* 20(5): 567-75.
- Tanaka, K., M. Sata, et al. (2003). "Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries." *Circ Res* 93(8): 783-90.
- Tani, S., P. C. Dimayuga, et al. (2004). "Aberrant antibody responses to oxidized LDL and increased intimal thickening in apoE^{-/-} mice exposed to cigarette smoke." *Atherosclerosis* 175(1): 7-14.
- Tedgui, A. and Z. Mallat (2006). "Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways." *Physiol Rev* 86(2): 515-81.
- Thyberg, J., K. Blomgren, et al. (1997). "Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin." *J Histochem Cytochem* 45(6): 837-46.
- Tous, M., V. Ribas, et al. (2006). "Manipulation of inflammation modulates hyperlipidemia in apolipoprotein E-deficient mice: a possible role for interleukin-6." *Cytokine* 34(3-4): 224-32.
- Traber, M. G., A. van der Vliet, et al. (2000). "Tobacco-related diseases. Is there a role for antioxidant micronutrient supplementation?" *Clin Chest Med* 21(1): 173-87, x.
- Trieu, V. N., R. K. Narla, et al. (2000). "EGF-genistein inhibits neointimal hyperplasia after vascular injury in an experimental restenosis model." *J Cardiovasc Pharmacol* 35(4): 595-605.
- Tzoulaki, I., G. D. Murray, et al. (2005). "C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study." *Circulation* 112(7): 976-83.
- van Dijk, K. W., M. H. Hofker, et al. (1999). "Dissection of the complex role of apolipoprotein E in lipoprotein metabolism and atherosclerosis using mouse models." *Curr Atheroscler Rep* 1(2): 101-7.
- Van Lint, P. and C. Libert (2007). "Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation." *J Leukoc Biol* 82(6): 1375-81.

- Vanderlaan, P. A. and C. A. Reardon (2005). "Thematic review series: the immune system and atherogenesis. The unusual suspects: an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis." *J Lipid Res* 46(5): 829-38.
- Vazquez-Padron, R. I., D. Lasko, et al. (2004). "Aging exacerbates neointimal formation, and increases proliferation and reduces susceptibility to apoptosis of vascular smooth muscle cells in mice." *J Vasc Surg* 40(6): 1199-207.
- Veillard, N. R., S. Steffens, et al. (2004). "Differential expression patterns of proinflammatory and antiinflammatory mediators during atherogenesis in mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(12): 2339-44.
- Vink, A., D. P. de Kleijn, et al. (2004). "Functional role for toll-like receptors in atherosclerosis and arterial remodeling." *Curr Opin Lipidol* 15(5): 515-21.
- Wahl, S. M., D. A. Hunt, et al. (1987). "Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(16): 5788-92.
- Wang, X., X. Li, et al. (2000). "Expression of monocyte chemotactic protein-3 mRNA in rat vascular smooth muscle cells and in carotid artery after balloon angioplasty." *Biochim Biophys Acta* 1500(1): 41-8.
- Ward, M. R., G. Pasterkamp, et al. (2000). "Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications." *Circulation* 102(10): 1186-91.
- Watanabe, N. and U. Ikeda (2004). "Matrix metalloproteinases and atherosclerosis." *Curr Atheroscler Rep* 6(2): 112-20.
- Weinberg, P. D. and C. Ross Ethier (2007). "Twenty-fold difference in hemodynamic wall shear stress between murine and human aortas." *J Biomech* 40(7): 1594-8.
- Whitman, S. C. and T. A. Ramsamy (2006). "Participatory role of natural killer and natural killer T cells in atherosclerosis: lessons learned from in vivo mouse studies." *Can J Physiol Pharmacol* 84(1): 67-75.
- Whitman, S. C., P. Ravisankar, et al. (2000). "Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice." *Am J Pathol* 157(6): 1819-24.
- Wientgen, H., F. E. Thorngate, et al. (2004). "Subphysiologic apolipoprotein E (ApoE) plasma levels inhibit neointimal formation after arterial injury in ApoE-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(8): 1460-5.
- Williams, H., J. L. Johnson, et al. (2002). "Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(5): 788-92.
- Wormald, S., J. G. Zhang, et al. (2006). "The comparative roles of suppressor of cytokine signaling-1 and -3 in the inhibition and desensitization of cytokine signaling." *J Biol Chem* 281(16): 11135-43.
- Wuttge, D. M., P. Eriksson, et al. (2001). "Expression of interleukin-15 in mouse and human atherosclerotic lesions." *Am J Pathol* 159(2): 417-23.
- Wuttge, D. M., X. Zhou, et al. (2004). "CXCL16/SR-PSOX is an interferon-gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(4): 750-5.
- Yamamoto, K., R. Morishita, et al. (2000). "Ribozyme oligonucleotides against transforming growth factor-beta inhibited neointimal formation after vascular injury in rat model: potential application of ribozyme strategy to treat cardiovascular disease." *Circulation* 102(11): 1308-14.
- Yasuda, Y., Z. Li, et al. (2004). "Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages." *J Biol Chem* 279(35): 36761-70.
- Yoshimura, A., H. Nishinakamura, et al. (2005). "Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins." *Arthritis Res Ther* 7(3): 100-10.

- Yoshimura, A., H. M. Ohishi, et al. (2004). "Regulation of TLR signaling and inflammation by SOCS family proteins." *J Leukoc Biol* 75(3): 422-7.
- Young, J. L., P. Libby, et al. (2002). "Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis." *Thromb Haemost* 88(4): 554-67.
- Yu, R., J. S. Park, et al. (2002). "Alteration of a macrophages inflammatory protein-related protein-2 (MRP-2) response by high fat and cholesterol diet in mice." *Life Sci* 70(21): 2535-45.
- Zaltsman, A. B. and A. C. Newby (1997). "Increased secretion of gelatinases A and B from the aortas of cholesterol fed rabbits: relationship to lesion severity." *Atherosclerosis* 130(1-2): 61-70.
- Zavasnik-Bergant, T. and B. Turk (2006). "Cysteine cathepsins in the immune response." *Tissue Antigens* 67(5): 349-55.
- Zernecke, A., E. A. Liehn, et al. (2006). "Deficiency in CCR5 but not CCR1 protects against neointima formation in atherosclerosis-prone mice: involvement of IL-10." *Blood* 107(11): 4240-3.
- Zhou, X. and G. K. Hansson (1999). "Detection of B cells and proinflammatory cytokines in atherosclerotic plaques of hypercholesterolaemic apolipoprotein E knockout mice." *Scand J Immunol* 50(1): 25-30.
- Zhou, X., G. Paulsson, et al. (1998). "Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice." *J Clin Invest* 101(8): 1717-25.
- Zhu, B., D. G. Kuhel, et al. (2000). "Apolipoprotein E inhibits neointimal hyperplasia after arterial injury in mice." *Am J Pathol* 157(6): 1839-48.
- Zimmerman, M. A., L. L. Reznikov, et al. (2004). "Interleukin-10 attenuates the response to vascular injury." *J Surg Res* 121(2): 206-13.
- Zimmerman, M. A., L. L. Reznikov, et al. (2003). "Relative contribution of the TNF-alpha receptors to murine intimal hyperplasia." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284(5): R1213-8.
- Zimmerman, M. A., C. H. Selzman, et al. (2002). "Lack of TNF-alpha attenuates intimal hyperplasia after mouse carotid artery injury." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(2): R505-12.
- Zohlhofer, D., T. Richter, et al. (2001). "Transcriptome analysis reveals a role of interferon-gamma in human neointima formation." *Mol Cell* 7(5): 1059-69.
- Zubilewicz, T., J. Wronski, et al. (2001). "Injury in vascular surgery--the intimal hyperplastic response." *Med Sci Monit* 7(2): 316-24.

A.1 Abkürzungsverzeichnis

A. carotis, A. femoralis,	Arteria carotis bzw. Arteria femoralis bzw. Arteria innominata
A. innominata	
ApoE ^{-/-}	Apolipoprotein E-Knockout
Bcl2A1a	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a</i>
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-desoxy-uridin
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
Ccr	C-C-Chemokin-Rezeptor
Cxcl	C-X-C-Chemokin
DAPI	4',6-Diaminidin-2-Phenylindol
DNA, cDNA	Desoxyribonukleinsäure; komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
EEL	Membrana elastica externa (<i>external elastic lamina</i>)
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GO	<i>Gene Ontology</i>
h	Stunde
HDL	<i>high density Lipoproteins</i>
Icam	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IEL	Membrana elastica interna (<i>internal elastic lamina</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IL-1R1	<i>IL-1 signaling receptor type 1</i>
IL-1ra	<i>IL-1 receptor antagonist</i>
JAK	Janus Kinase
LDL, oxLDL	<i>low density Lipoproteins</i> ; oxidiertes LDL
LDL-R ^{-/-}	<i>low density Lipoprotein receptor</i> , LDL-Rezeptor-Knockout
LPS	Lipopolysaccharid
Mcp	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
M-Csf	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MHC I und II	<i>major histocompatibility complex class I und II</i>
min	Minute
Mip	<i>macrophage inflammatory protein</i>
Mmps	<u>Matrix</u> metalloproteinasen
Mrp	<i>macrophage inflammatory protein-related protein</i>
n	Stichprobenumfang
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
RANTES	<i>regulated upon activation, normal t-cell expressed, and presumably secreted</i>
RNA, mRNA, rRNA	Ribonukleinsäure, messenger RNA, ribosomale RNA
ROS	Reaktive freie (Sauerstoff)radikale (<i>reactive oxygen species</i>)
s	Sekunde
SMA	<i>smooth muscle actin</i>
SMCs	glatte Gefäßmuskelzellen (<i>smooth muscle cells</i>)
Socs	<i>supressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TH	T-Helferzellen
Timps	Matrixmetalloproteinase-Inhibitor (<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>)
Tlrs	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
U	Einheit
Vcam	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VLDL	<i>Very low density lipoproteins</i>
vs.	Versus (Vergleich)
WT	Wildtyp

A.2 Übersicht der verwendeten Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer System	Agilent Technologies, Waldbronn/Deutschland
Affymetrix™ Fluidics Station	Affymetrix™, Santa Clara/Kalifornien
Affymetrix™ Hybridization Oven	Affymetrix™, Santa Clara/Kalifornien
Fotodokumentationssystem	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen/Deutschland
Gefriermikrotom HM 500 OMV	Microm GmbH, Walldorf/Deutschland
Gelelektrophorese Bio-Rad 250/2.5	Bio-Rad Laboratories GmbH, München/Deutschland
GeneAmp® PCR System 2400	Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH/Darmstadt
GeneChip® Scanner 3000 7G	Affymetrix™, Santa Clara/Kalifornien
ISMATEC MV-CA 4 Schlauch-Pumpe	ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld/Deutschland
Laser Scanning-Mikroskop Axiovert 200 M	Carl Zeiss AG, Oberkochen/Deutschland
Mikroskop Axiolab drb KT	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena/Deutschland
NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer	G. Kisker GbR, Steinfurt/Deutschland
Omni EZ Dispergierwerkzeug	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting/Deutschland
Präzisionsheizplatte	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf/Deutschland
Rotor Gene 200 Real-Time Cycler	Corbett Research, Mortlake/Australia
Rührschüttler VF2	IKA® Laborbedarf, Staufen/Deutschland
Stereomikroskop OPMI® 1 FR	Carl Zeiss Jena GmbH/Deutschland
Stereomikroskop STEMI® 200-C	Carl Zeiss Jena GmbH/Deutschland
UV-Handlampe	Konrad Benda Laborgeräte und Ultraviolettstrahler/Vertrieb und Handel, Wiesloch/Deutschland
Waage	Sartorius AG, Göttingen/Deutschland
Zentrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg/Deutschland
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus Sepatech, Hanau/Deutschland
Zentrifuge Sigma 3K12	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode/Deutschland

A.3 Übersicht der verwendeten Chemikalien

4',6-Diaminidin-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/Deutschland
10 % Tween 20	Pierce Biotechnology, Inc., Rockford/USA
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
5-Brom-2'-desoxy-uridin (BrdU)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/Deutschland
ABA(mouse)-Komplex	DAKO Corporation, Carpinteria/USA
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
Agarose	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/Deutschland
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/Deutschland
AMV Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Biotin	DAKO Corporation, Carpinteria/USA
Biotinylated Horseradish Peroxidase	DAKO Corporation, Carpinteria/USA
biotinyliertes anti-Streptavidin	Vector Laboratories, Burlingame/Kalifornien
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/Deutschland
Desoxinukleotidtriphosphat-Mix (dNTP-Mix)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)-Wasser	Ambion, Inc., Austin/Texas
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	VEB Laborchemie, Apolda/Deutschland
Dithiotreit (DTT)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland
DNA Mass Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland
E. coli DNA-Ligase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland
E. coli DNA-Polymerase 1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland
Ethanol für Histologie	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
Ethanol für Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland
Evans Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/Deutschland
Fuchsin Activating Agent	DAKO Corporation, Carpinteria/USA
Fuchsin Buffered Substrate	DAKO Corporation, Carpinteria/USA
Fuchsin Chromogen	DAKO Corporation, Carpinteria/USA

Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland
Hämatoxylin	Dako Cytomation, Glostrup/Dänemark
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	VEB Laborchemie, Apolda/Deutschland
Kaninchen-Normalserum	DAKO Corporation, Carpinteria/USA
Levamisole	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/Deutschland
Magnesiumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/Deutschland
MES free acid, Monohydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/Deutschland
MES sodium salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/Deutschland
Natriumchlorid für Microarray	Ambion [®] , Inc., Austin/USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland
n-Pentan	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
Oil Red O	Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee/USA
Orcein	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
Phenol-Chloroform (Ultra Pur)	Ambion [®] , Inc., Austin/Texas
Isoamylalkohol	
Platinum Taq DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Poly-Desoxy-Thymin (p(dT)-Primer)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Ribonuclease H	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Rinderserum-Albumin (10 %-iges BSA-c) für Immunhistologie	Aurion, Wageningen/Niederlande
Rinderserum-Albumin (BSA) für Molekularbiologie	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland
RNAse freies Wasser	
Roti [®] -Histofix	Qiagen GmbH, Hilden/Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Streptavidin-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE)	DAKO Corporation, Carpinteria/USA
Sucrose	MoBiTec GmbH, Göttingen/Deutschland
Superscript [™] II RNaseH ⁻ Reverse Transkriptase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/Deutschland
Sybr Green	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland
T4 DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/Deutschland
T7-oligo(dT)-Primer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland
TRIS [Tris(hydroxymethyl)-aminomethan] für Immunhistochemie	Affymetrix [™] , Santa Clara/Kalifornien
TRIS [Tris(hydroxymethyl)-aminomethan] für Molekularbiologie	Fluka Chemie GmbH Buchs/Schweiz
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	
Trizol [®]	AppliChem GmbH, Darmstadt/Deutschland
UltraPure [™] 20x SSPE	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/Deutschland
Water, Molecular Biology Grade	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland
	BioWhittaker Inc., Walkersville/USA

A.4 Verbrauchsmaterialien

Wundklammern	CONMED [®] Utica/New York
1 ml Spritze (Omnifix [®] -F)	B. Braun Melsungen AG/Deutschland
23 G Katheter (0,65 mm Venofix [®] S)	B. Braun Melsungen AG/Deutschland
27 G x 1/2" Kanüle	B. Braun Melsungen AG/Deutschland
3-Wege-Hahn (Discofix [®] B.)	B. Braun Melsungen AG/Deutschland
5 ml Reaktionsgefäß	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht/Deutschland
65 mm Omni-Tip	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting/Deutschland
Cryomold Biopsy Schalen	Miles Inc. Diagnostic Division, Elkhart/USA
Deckgläser	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig/Deutschland
Einwegskalpelle	P. J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln/Deutschland
Fluoromount-G	Fluoreszent Mounting Medium, Dako Corporation, Carpinteria/USA

<i>Mounting Medium for AEC</i>	Immunotech, Marseille/Frankreich
PCR-Reaktionsgefäß	LTF-Labortechnik GmbH & Co.KG, Wasserburg/Deutschland
<i>Phase Lock Gel</i> (PLG)-Reaktionsgefäß	Eppendorf AG, Hamburg/Deutschland
Polysine™ Objektträger	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig/Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg/Deutschland
Softasept® N	B. Braun Melsungen AG/Deutschland
<i>TissueTek</i>	Sakura Finetek, Zoeterwoude/Niederlande
U430 2.0 GeneChip® (Mouse Genome 430 2.0 Array)	Affymetrix™, Santa Clara/Kalifornien
Zellkulturschale	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht/Deutschland

A.5 Übersicht der verwendeten kommerziellen Kits

- RNeasy® Micro-Kit und RNeasy® Mini-Kit (Qiagen GmbH, Hilden/Deutschland)
- RNA 6000 Nano LabChip Kit und RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent Technologies, Waldbronn/Deutschland)
- Syringe Kit (Agilent Technologies, Waldbronn/Deutschland)
- Invisorb PCRapid Kit® (InViTek Gesellschaft für Biotechnik & Bidesign mbH, Berlin/Deutschland)
- GeneChip® T7-Oligo(dT) Promotor Primer Kit (Affymetrix™, Santa Clara/Kalifornien)
- BioArray™ HighYield™ RNA Transcript Labeling Kit (T7) (Enzo Life Sciences, Inc., New York/USA)
- GeneChip® Eukaryotic poly-A RNA Control Kit (Affymetrix™, Santa Clara/Kalifornien)
- Eukaryotic Hybridization Control Kit (Affymetrix™, Santa Clara/Kalifornien)
- 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/Deutschland)

A.6 Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen

A.6.1 PBS-Puffer für die Histologie und Immunhistochemie

0,01 M Na₂HPO₄ x 2 H₂O
0,0027 M KH₂PO₄
0,137 M NaCl
in Aqua bidest gelöst
ph = 7,2

A.6.2 PBS-Puffer für die BrdU-Färbung

PBS-Tabletten der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München/Deutschland) wurden nach Vorschrift in destilliertem Wasser gelöst

A.6.3 PBS-Puffer für die Präparation der Mäuse

Gebrauchsfertig von GIBCO® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland)

A.6.4 TBS-Puffer (0,5 M Stammlösung) für die Immunhistochemie

60,57 g TRIS
380 ml Salzsäure 1 mol/L
1000 ml Aqua dest
pH = 7,5

Die Stammlösung wurde steril filtriert und in 100 ml Portionen bei -20 °C eingefroren
Vor Verwendung wurden 100 ml Stammlösung mit 900 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt

A.6.5 ASB-Puffer für die BrdU-Färbung

100 mM TRIS
100 mM NaCl
50 mM MgCl x 6 H₂O
in Aqua bidest

A.6.6 5x cDNA Synthesis Buffer (Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland)

250 mM TRIS-Acetat (pH 8,4)
40 mM Magnesiumacetat
375 mM Kaliumacetat

A.6.7 10x PCR Buffer (Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland)

200 mM TRIS HCl (pH 8,4)
500 mM KCl

A.6.8 Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) für die Molekularbiologie

40 mM TRIS
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA
pH = 8,0

A.6.9 Stop-Mix für die PCR

0,05 % Bromphenolblau
48 % Glycerin
0,1 % Natrium-Dodecylsulfat
0,1 M EDTA

A.6.10 Fragmentierungspuffer für Microarray

400 mM Tris-Acetat
1 M Kaliumacetat
300 mM Magnesiumacetat
RNase-freies Wasser

A.6.11 Hybridisierungspuffer für Microarray

5 M NaCl
0,5 M EDTA
10% Tween 20
12x MES Puffer (1,22 M MES free acid, Monohydrate, 0,89 M MES sodium salt, Molecular Biology Grade UltraPure™ 20x SSPE Water, pH 6,5 – 6,7)
Molecular Biology Grade Water

A.6.12 Waschpuffer für Microarray

Puffer A (nicht stringent)

6x SSPE
0,01 % Tween 20
Molecular Biology Grade Water

Puffer B (stringent)

100 mM MES Puffer
0,1 M NaCl
0,01 % Tween 20
Molecular Biology Grade Water

A.7 Antikörper für Immunhistologie und Immunfluoreszenz

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind alle kommerziell erhältlich und sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

A.7.1 primäre Antikörper

Primärer Antikörper	Klon	Spenderorganismus	Hersteller	Verdünnung
B220 (CD45) B-Zellen	RA3-6B2 (IgG2a)	Ratte	Pharmingen San Jose/USA	1:500
BrdU proliferierende Zellen	BMG 6H8	Maus	Roche Diagnostics Mannheim/Deutschland	1:10
Cd3e T-Zellen	145-2C11 (IgG1)	Armenischer Hamster	Pharmingen San Jose/USA	1:200
FA-11 (CD68) Makrophagen	FA11 (IgG2a)	Ratte	Serotec Düsseldorf/Deutschland	1:100
GR-1 Granulozyten	RB6-8C5 (IgG2b)	Ratte	Pharmingen San Jose/USA	1:100
vWF Endothelzellen	polyklonal	Kaninchen	DakoCytomation Glostrup/Dänemark	1:200
CD34 Stammzellen	RAM34 (IgG2a)	Ratte	Pharmingen San Jose/USA	1:50

A.7.2 sekundäre Antikörper

Konjugierter sekundärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Ziege anti armenischer Hamster IgG Cy3/Cy5	Dianova, Hamburg	1:300
Esel anti Kaninchen IgG Cy3/Cy5	Dianova, Hamburg	1:300
Esel anti Ratte IgG Cy3/Cy5	Dianova, Hamburg	1:300
Ziege anti Kaninchen IgG Cy3/Cy5	Dianova, Hamburg	1:300
Esel anti Ziege IgG Cy2	Dianova, Hamburg	1:100

A.8 PCR-Primer, die in der quantitativen Real Time PCR eingesetzt wurden

Gen	Fragmentlänge	Annealing-Temperatur	Primer-Sequenzen
Bcl2A1a	157 bp	65°C	5' CGGCAGAATGGAGGTTGGGAAG 3' CCATTCTCGTGGGAGCCAAGG
Ccr1	159 bp	65°C	5' GCAGCTGTTTCAAAGGCATGTGG 3' CCTTCCTTGTTGACACCTATGGTCTG
Ccr2	150 bp	65°C	5' TGGGACAGAGGAAGTGGTGTGC 3' GAGGCAGTTGCAAAGGTAAGGAG
Ccr5	230 bp	65°C	5' TCCAGATGGCTTCTCCACACAAAC 3' CCAGGCCTCTGGTTTACAATCG
Ctss (Cathepsin S)	219 bp	64°C	5' GGC GGCTACATGACCGAAGC 3' GGC GTCGATGCCACAGAGA
IL-1β	204 bp	66°C	5' CCTGCTGGTGTGTGACGTTCC 3' TTGAGGCCCAAGGCCACAGG
IL-6	152 bp	65°C	5' TGGAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAGG 3' GACCACAGTGAGGAATGTCCACAAAC
Mcp-1	245 bp	65°C	5' CAGCACCAGCACCAGCCAAC 3' CAGCTTCTTTGGGACACCTGCTG
Mip-1α	230 bp	61°C	5' CTGACAAGCTCACCTCTGTG 3' GAAAATGACACCTGGCTGGG
Mmp-13	228 bp	61°C	5' GCCTGCACCCTCAGCAGGTT 3' CCGCAGCGCTCAGTCTCTTCA
RANTES	213 bp	62°C	5' CCGCCAAGTGTGTGCCAACC 3' GTCGGAGCGGATGGAGATGC
Socs3	155 bp	64°C	5' TGGGAAGACATTGGCCAGTCC 3' GCTGCTGCATTCCCGTGAGG
Spp1 (Osteopontin)	211 bp	66°C	5' CCCAACGGCCGAGGTGATAG 3' CATGGCTGCCCTTTCCGTTG
Timp-1	207 bp	65°C	5' TCACGGGCCGCTAAGGAAC 3' CGAGGACCTGATCCGTCCACAA
TNFα	182 bp	65°C	5' TGTCCTGGAGGACCCAGTGTGG 3' GCGACAGCCTGGTCACCAAATC
Vcam-1	186 bp	65°C	5' ACACCATCCGCCAGGCACAG 3' TCCCGATGGCAGGTATTACCAAGG

A.9 Gene, die in der ApoE^{-/-} im Vergleich zur WT-Aorta differentiell exprimiert waren
für Probesets ohne Genbezeichnung war zum Zeitpunkt der Auswertung keine Annotation vorhanden

Genname	Gensymbol	MW WT	MW ApoE ^{-/-}	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
matrix metalloproteinase 12	Mmp12	34,7	5738,3	190,0	0,0061	1449153_at
secreted phosphoprotein 1	Spp1	99,7	11942,0	120,0	0,0009	1449254_at
interleukin 7 receptor	Il7r	12,7	530,0	44,0	0,0071	1448576_at
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit D2	Atp6v0d2	77,7	2562,3	43,0	0,0110	1444176_at
CD5 antigen-like	Cd5l	201,3	8563,3	42,0	0,0017	1449193_at
matrix metalloproteinase 13	Mmp13	22,7	1274,7	38,0	0,0190	1417256_at
brain expressed gene 1	Bex1	54,0	1848,3	35,0	0,0110	1448595_a_at
lipocalin 2	Lcn2	104,7	3893,0	34,0	0,0061	1427747_a_at
mucolipin 3	Mcoln3	10,0	317,7	29,0	0,0061	1437540_at
interleukin 6	Il6	13,3	303,0	29,0	0,0085	1450297_at
triggering receptor expressed on myeloid cells 2	Trem2	27,3	762,7	28,0	0,0061	1421792_s_at
solute carrier family 15, member 3	Slc15a3	48,3	1192,7	24,0	0,0070	1420697_at
Cd200 receptor 4	Cd200r4	17,0	308,7	22,0	0,0170	1435313_at
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit D2	Atp6v0d2	118,0	2394,3	19,0	0,0061	1434798_at
chloride channel calcium activated 2	Clca2	25,3	399,3	19,0	0,0098	1419463_at
growth arrest-specific 2 like 3	Gas2l3	25,0	237,0	18,0	0,0340	1455980_a_at
ring finger protein 128	Rnf128	87,7	1459,7	16,0	0,0077	1418318_at
paired-Ig-like receptor A1	Pira1	40,0	562,3	16,0	0,0110	1418809_at
ring finger protein 128	Rnf128	74,3	1153,7	16,0	0,0083	1449036_at
RIKEN cDNA 9930013L23 gene	9930013L23 Rik	32,3	466,3	15,0	0,0051	1429987_at
chemokine (C-C motif) ligand 12	Ccl12	30,3	394,0	13,0	0,0061	1419282_at
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	Serpina3g	23,0	307,3	13,0	0,0061	1424923_at
procollagen, type II, alpha 1	Col2a1	89,3	1400,0	13,0	0,0110	1450567_a_at
glycoprotein (transmembrane) nmb	Gpnmb	787,0	9909,0	12,0	0,0030	1448303_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
DNA methyltransferase 3A	Dnmt3a	17,3	251,7	12,0	0,0120	1423064_at
		318,3	3798,3	12,0	0,0061	1436530_at
		23,7	271,7	11,0	0,0043	1434638_at
lectin, galactose binding, soluble 3	Lgals3	827,7	9391,3	11,0	0,0051	1426808_at
G protein-coupled receptor 176	Gpr176	47,3	543,0	11,0	0,0061	1442116_at
leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3	Lilrb3	49,7	578,0	11,0	0,0093	1424302_at
integrin alpha X	Itgax	179,7	2050,0	11,0	0,0061	1419128_at
B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a	Bcl2a1a	157,3	1723,7	10,0	0,0076	1419004_s_at
RIKEN cDNA 0610039P13 gene	0610039P13 Rik	49,0	503,7	9,9	0,0061	1424032_at
leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4	Lilrb4	614,3	6177,7	9,8	0,0055	1420394_s_at
lectin, galactose binding, soluble 3	Lgals3	59,7	624,7	9,6	0,0071	1445626_at
CD72 antigen	Cd72	109,0	1079,0	9,6	0,0061	1426112_a_at
complement component 3a receptor 1	C3ar1	210,0	2116,7	9,5	0,0061	1442082_at
serum amyloid A 3	Saa3	114,0	1232,3	9,5	0,0120	1450826_a_at
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N	Serpina3n	331,3	3083,7	9,5	0,0081	1419100_at
cytoplasmic tyrosine kinase, Dscr28C related (Drosophila)	Tec	41,7	365,7	9,5	0,0110	1460204_at
membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D	Ms4a6d	169,0	1629,0	8,8	0,0076	1419598_at
		49,0	426,7	8,7	0,0083	1458943_at
CD84 antigen	Cd84	186,0	1775,3	8,7	0,0082	1422875_at
NCK associated protein 1 like	Nckap1l	98,3	843,0	8,7	0,0110	1428787_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
protein kinase inhibitor beta, cAMP dependent, testis specific	Pkib	36,7	272,0	8,6	0,0190	1421137_a_at
ecotropic viral integration site 2b	Evi2b	55,0	413,3	8,6	0,0200	1426505_at
macrophage scavenger receptor 1	Msr1	51,0	429,7	8,6	0,0078	1425434_a_at
proteoglycan 4 (megakaryocyte stimulating factor, articular superficial zone protein)	Prg4	397,3	3909,0	8,6	0,0120	1449824_at
membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7	Ms4a7	380,3	3341,7	8,6	0,0061	1424754_at
C-type lectin domain family 7, member a	Clec7a	399,0	3395,0	8,3	0,0061	1420699_at
DNA methyltransferase 3A	Dnmt3a	29,3	300,7	8,3	0,0170	1423066_at
pleckstrin homology, Sec7 and coiled/coil domains 4	Pscd4	125,0	1023,3	8,2	0,0070	1460437_at
secreted frizzled-related sequence protein 1	Sfrp1	49,0	396,7	8,0	0,0030	1416594_at
chemokine (C-C motif) ligand 2	Ccl2	63,3	454,0	8,0	0,0230	1420380_at
coactosin-like 1 (Dictyostelium)	Cotl1	190,3	1523,0	7,7	0,0061	1437811_x_at
macrophage expressed gene 1	Mpeg1	771,3	6081,0	7,6	0,0061	1427076_at
interleukin 7 receptor	Il7r	159,0	1292,7	7,6	0,0081	1448575_at
paired-Ig-like receptor A6	Pira6	176,3	1385,3	7,6	0,0061	1420464_s_at
fatty acid binding protein 5, epidermal	Fabp5	1085,3	7825,3	7,6	0,0096	1416022_at
CD68 antigen	Cd68	459,0	3631,3	7,5	0,0061	1449164_at
coactosin-like 1 (Dictyostelium)	Cotl1	375,0	2839,3	7,4	0,0061	1436838_x_at
colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)	Csf2rb2	163,3	1288,0	7,3	0,0075	1449360_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
vascular cell adhesion molecule 1	Vcam1	185,3	1409,7	7,3	0,0061	1436003_at
heme oxygenase (decycling) 1	Hmox1	57,0	380,0	7,0	0,0150	1448239_at
colony stimulating factor 2 receptor, beta 1, low-affinity (granulocyte-macrophage)	Csf2rb1	94,3	661,0	7,0	0,0150	1421326_at
annexin A8	Anxa8	123,7	900,7	7,0	0,0068	1425789_s_at
complement component 3a receptor 1	C3ar1	238,7	1616,0	6,6	0,0077	1419482_at
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	182,3	1229,0	6,5	0,0075	1419209_at
eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 3	Ear3	38,7	196,3	6,5	0,0440	1422412_x_at
interferon regulatory factor 8	Irf8	79,3	501,0	6,4	0,0110	1448452_at
complement component 3a receptor 1	C3ar1	362,3	2394,3	6,3	0,0078	1419483_at
membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D	Ms4a6d	220,3	1464,0	6,1	0,0083	1419599_s_at
arylacetamide deacetylase-like 1	Aadacl1	143,3	909,0	6,1	0,0093	1455227_at
macrophage scavenger receptor 1	Msr1	81,0	491,7	6,1	0,0120	1422062_at
protein kinase C, beta 1	Prkcb1	31,7	202,7	6,0	0,0083	1423478_at
lymphocyte cytosolic protein 1	Lcp1	541,0	3358,3	5,9	0,0077	1415983_at
chemokine (C-X-C motif) ligand 16	Cxcl16	172,3	1050,7	5,9	0,0061	1449195_s_at
phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	Pla2g7	307,0	1491,3	5,9	0,0370	1430700_a_at
lymphocyte cytosolic protein 1	Lcp1	335,7	2046,0	5,9	0,0061	1448160_at
cathepsin S	Ctss	1934,7	11059,3	5,6	0,0050	1448591_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
chemokine (C-C motif) receptor 5	Ccr5	132,3	763,0	5,6	0,0110	1424727_at
coactosin-like 1 (Dictyostelium)	Cotl1	276,7	1597,7	5,5	0,0070	1416002_x_at
fatty acid binding protein 5, epidermal	Fabp5	1988,7	10184,7	5,5	0,0110	1416021_a_at
interleukin 18 binding protein	Il18bp	102,0	482,7	5,5	0,0450	1450424_a_at
B-cell linker	Blnk	195,3	1092,7	5,4	0,0070	1451780_at
tissue inhibitor of metalloproteinase 1	Timp1	844,7	4676,0	5,3	0,0075	1460227_at
TYRO protein tyrosine kinase binding protein	Tyrobp	970,7	5273,7	5,3	0,0070	1450792_at
PCTAIRE-motif protein kinase 3	Pctk3	74,0	372,3	5,2	0,0130	1449151_at
integrin beta 2	Itgb2	545,7	3058,3	5,2	0,0096	1450678_at
ATP-binding cassette, sub- family G (WHITE), member 1	Abcg1	86,0	463,0	5,2	0,0110	1455221_at
lysosomal-associated protein transmembrane 5	Laptm5	858,3	4501,0	5,2	0,0061	1436905_x_at
G protein-coupled receptor 137B	Gpr137b	374,0	2008,0	5,1	0,0070	1429775_a_at
Fc receptor, IgG, low affinity III	Fcgr3	374,7	1999,3	5,1	0,0110	1448620_at
lipoma HMGIC fusion partner-like 2	Lhfpl2	215,7	1174,3	5,1	0,0096	1434129_s_at
hepatocyte growth factor	Hgf	49,7	220,3	5,1	0,0230	1451866_a_at
annexin A8	Anxa8	181,7	894,3	5,1	0,0096	1417732_at
a disintegrin and metallopeptidase domain 8	Adam8	223,7	1185,3	5,1	0,0083	1416871_at
pleckstrin	Plek	169,3	828,7	5,1	0,0190	1417523_at
brain abundant, membrane attached signal protein 1	Basp1	332,3	1716,3	4,9	0,0083	1428572_at
frizzled-related protein	Frzb	377,3	1870,3	4,9	0,0061	1448424_at
coronin, actin binding protein 1A	Coro1a	345,7	1705,3	4,8	0,0150	1416246_a_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
colony stimulating factor 2 receptor, beta 1, low-affinity (granulocyte-macrophage)	Csf2rb1	286,7	1407,3	4,8	0,0061	1455660_at
expressed sequence AA467197	AA467197	71,7	359,3	4,8	0,0110	1434046_at
complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	C1qb	1158,3	5541,3	4,7	0,0061	1417063_at
RIKEN cDNA 6330416G13 gene	6330416G13 Rik	66,7	297,0	4,6	0,0220	1426316_at
chemokine (C-C motif) ligand 8	Ccl8	659,3	3139,0	4,6	0,0110	1419684_at
CD48 antigen	Cd48	186,7	910,0	4,6	0,0150	1427301_at
chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Cxcr4	120,3	599,7	4,6	0,0150	1448710_at
CD38 antigen	Cd38	132,7	631,3	4,6	0,0110	1450136_at
complement component 1, q subcomponent, C chain	C1qc	1690,0	7878,7	4,5	0,0070	1449401_at
cholesterol 25-hydroxylase	Ch25h	124,7	579,0	4,5	0,0085	1449227_at
coronin, actin binding protein 1A	Coro1a	351,3	1628,7	4,5	0,0120	1455269_a_at
Ena-vasodilator stimulated phosphoprotein	Evl	110,7	504,3	4,5	0,0096	1450106_a_at
leukocyte-associated Ig-like receptor 1	Lair1	45,3	180,3	4,4	0,0350	1439067_at
uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	Ucp2	225,0	922,0	4,3	0,0110	1459740_s_at
G-protein coupled receptor 65	Gpr65	75,3	308,7	4,3	0,0190	1449175_at
histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	H2-Aa	1019,0	4475,0	4,3	0,0070	1438858_x_at
neutrophil cytosolic factor 2	Ncf2	161,7	712,7	4,3	0,0082	1448561_at
chemokine (C-X-C motif) ligand 5	Cxcl5	51,0	216,3	4,2	0,0160	1419728_at
C-type lectin domain family 4, member d	Clec4d	175,0	779,7	4,2	0,0120	1420804_s_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 3	Ear3	208,0	864,7	4,2	0,0093	1422411_s_at
histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	H2-Aa	241,0	972,3	4,2	0,0120	1443783_x_at
G protein-coupled receptor 137B	Gpr137b	878,0	3813,3	4,2	0,0077	1439255_s_at
RIKEN cDNA 1300002K09 gene	1300002K09 Rik	85,3	382,0	4,2	0,0120	1453234_at
lysosomal acid lipase 1	Lip1	403,3	1776,0	4,2	0,0110	1423140_at
G protein-coupled receptor 137B	Gpr137b	459,7	1979,0	4,2	0,0078	1439256_x_at
complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	C1qb	1742,3	7430,0	4,2	0,0061	1437726_x_at
CD53 antigen	Cd53	750,3	3187,7	4,2	0,0081	1448617_at
cytochrome b-245, beta polypeptide	Cybb	383,0	1616,0	4,1	0,0061	1436778_at
CD300 antigen like family member B	Cd300lb	171,7	725,3	4,1	0,0061	1445882_at
selectin, platelet	Selp	120,3	491,7	4,1	0,0062	1440173_x_at
ecotropic viral integration site 2a	Evi2a	97,7	392,3	4,1	0,0170	1443894_at
ecotropic viral integration site 2a	Evi2a	316,7	1335,3	4,1	0,0100	1450241_a_at
pleckstrin	Plek	604,3	2427,0	4,0	0,0250	1448748_at
pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein	Pscdbp	121,7	481,3	4,0	0,0082	1451206_s_at
leukocyte-associated Ig-like receptor 1	Lair1	112,0	461,0	4,0	0,0086	1444040_at
colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)	Csf2ra	233,3	947,0	4,0	0,0061	1420703_at
G protein-coupled receptor 137B	Gpr137b	409,0	1692,3	4,0	0,0082	1449670_x_at
Ena-vasodilator stimulated phosphoprotein	Evl	328,3	1360,7	4,0	0,0096	1434920_a_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
chemokine (C-C motif) receptor 2	Ccr2	162,0	644,0	3,9	0,0061	1421186_at
ATP-binding cassette, sub- family A (ABC1), member 1	Abca1	158,3	611,7	3,9	0,0061	1450392_at
chemokine (C-C motif) ligand 6	Ccl6	512,3	2090,3	3,9	0,0110	1420249_s_at
Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide	Fcer1g	693,7	2811,7	3,9	0,0098	1418340_at
proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1	Pstpip1	110,3	383,7	3,9	0,0370	1424560_at
histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	H2-Ab1	379,0	1518,0	3,9	0,0150	1425477_x_at
procollagen, type VIII, alpha 1	Col8a1	603,0	2320,7	3,8	0,0051	1455627_at
ATP-binding cassette, sub- family A (ABC1), member 1	Abca1	427,7	1676,3	3,8	0,0070	1421839_at
RIKEN cDNA 4933439C20 gene	4933439C20 Rik	422,3	1584,7	3,8	0,0051	1453145_at
CD200 receptor 1	Cd200r1	108,3	392,0	3,8	0,0120	1422191_at
polo-like kinase 2 (Drosophila)	Plk2	144,0	549,7	3,8	0,0093	1427005_at
chemokine (C-C motif) ligand 6	Ccl6	1125,7	4279,3	3,7	0,0110	1417266_at
protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	Ptpre	157,7	606,0	3,7	0,0100	1418539_a_at
Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor	Fcgr3a	239,0	923,3	3,7	0,0081	1425225_at
suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	428,7	1640,3	3,7	0,0082	1456212_x_at
Cd300D antigen	Cd300d	264,3	1002,3	3,7	0,0081	1428018_a_at
phospholipase D family, member 3	Pld3	723,0	2751,7	3,7	0,0083	1416013_at
ATP-binding cassette, sub- family G (WHITE), member 1	Abcg1	610,3	2290,0	3,7	0,0070	1423570_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	C1qa	1777,0	6527,7	3,7	0,0061	1417381_at
chloride channel calcium activated 2	Clca2	151,3	550,0	3,6	0,0100	1460259_s_at
integrin alpha M	Itgam	122,7	458,7	3,6	0,0081	1422046_at
vascular cell adhesion molecule 1	Vcam1	960,3	3543,0	3,6	0,0082	1451314_a_at
complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	C1qb	1542,7	5857,7	3,6	0,0110	1434366_x_at
lymphocyte antigen 86	Ly86	484,0	1822,3	3,6	0,0100	1422903_at
pleckstrin	Plek	536,7	2004,7	3,6	0,0230	1448749_at
interleukin 1 receptor antagonist	Il1rn	157,7	603,0	3,6	0,0130	1451798_at
synaptogyrin 1	Syngr1	269,3	992,3	3,6	0,0120	1419289_a_at
Rho GTPase activating protein 25	Arhgap25	122,3	464,0	3,6	0,0110	1437072_at
G protein-coupled receptor 137B	Gpr137b	498,3	1835,0	3,6	0,0078	1450882_s_at
RasGEF domain family, member 1B	Rasgef1b	96,3	354,3	3,6	0,0071	1454742_at
thrombospondin 1	Thbs1	904,7	3216,0	3,6	0,0061	1460302_at
Fc receptor, IgG, high affinity I	Fcgr1	181,0	651,7	3,5	0,0067	1417876_at
chemokine (C-X-C motif) ligand 13	Cxcl13	97,7	353,7	3,5	0,0120	1417851_at
CD44 antigen	Cd44	181,7	640,7	3,5	0,0077	1452483_a_at
G protein-coupled receptor 35	Gpr35	78,7	281,3	3,5	0,0120	1449976_a_at
plexin C1	Plxnc1	114,3	404,7	3,5	0,0083	1450905_at
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	Ptpns1	975,3	3442,3	3,4	0,0082	1416985_at
solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 2	Slc37a2	146,0	520,0	3,4	0,0380	1452492_a_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	H2-Ab1	619,3	2181,0	3,4	0,0071	1451721_a_at
histocompatibility 2, class II antigen E alpha	H2-Ea	864,7	3077,3	3,4	0,0110	1452431_s_at
toll-like receptor 1	Tlr1	104,3	378,7	3,4	0,0270	1449049_at
Rho GTPase activating protein 9	Arhgap9	93,0	321,7	3,4	0,0120	1419810_x_at
arylacetamide deacetylase-like 1	Aadacl1	126,3	420,3	3,3	0,0082	1435134_at
vascular cell adhesion molecule 1	Vcam1	2128,0	7156,3	3,3	0,0061	1448162_at
hexokinase 3	Hk3	256,3	875,7	3,3	0,0082	1442798_x_at
myosin IF	Myo1f	152,3	519,7	3,3	0,0096	1429524_at
lysosomal-associated protein transmembrane 5	Laptm5	704,3	2376,7	3,3	0,0082	1426025_s_at
CD52 antigen	Cd52	563,0	1882,7	3,3	0,0083	1460218_at
vav 1 oncogene	Vav1	75,7	245,7	3,3	0,0220	1422932_a_at
hepatocyte growth factor	Hgf	88,0	260,0	3,3	0,0250	1425379_at
procollagen, type VIII, alpha 1	Col8a1	417,7	1360,3	3,2	0,0078	1418440_at
chemokine (C-C motif) ligand 9	Ccl9	827,0	2664,0	3,2	0,0190	1417936_at
myosin IF	Myo1f	153,3	524,0	3,2	0,0120	1429525_s_at
G protein-coupled receptor 137B	Gpr137b	908,7	3066,0	3,2	0,0110	1450881_s_at
legumain	Lgmn	1936,0	6372,0	3,2	0,0081	1448883_at
cathepsin L	Ctsl	169,3	573,7	3,2	0,0110	1457724_at
Fc receptor, IgG, low affinity Iib	Fcgr2b	288,7	932,7	3,2	0,0083	1455332_x_at
expressed sequence AI662270	AI662270	124,7	405,7	3,2	0,0120	1434068_s_at
cyclin D1	Ccnd1	141,0	402,3	3,2	0,0440	1417419_at
glucuronidase, beta	Gusb	365,0	1208,7	3,2	0,0110	1430332_a_at
		76,3	245,0	3,2	0,0070	1445385_at
syndecan 3	Sdc3	150,0	475,7	3,2	0,0051	1436482_a_at
lipoma HMGIC fusion partner-like 2	Lhfp12	221,7	753,0	3,2	0,0150	1434130_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	Tnfaip2	593,7	1975,0	3,2	0,0120	1438855_x_at
Fc receptor, IgG, low affinity lib	Fcgr2b	474,7	1544,3	3,2	0,0150	1451941_a_at
toll-like receptor 13	Tlr13	159,3	514,3	3,2	0,0061	1457753_at
		313,0	988,7	3,2	0,0061	1439965_at
protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	Ptpnc	785,7	2537,3	3,2	0,0130	1422124_a_at
glucuronidase, beta	Gusb	880,3	2828,3	3,1	0,0096	1448124_at
cDNA sequence BC013672	BC013672	93,3	277,7	3,1	0,0170	1451777_at
lipoma HMGIC fusion partner-like 2	Lhfp12	234,3	767,3	3,1	0,0140	1454847_at
dedicator of cyto-kinesis 2	Dock2	187,3	578,3	3,1	0,0081	1422808_s_at
antigen identified by monoclonal antibody Ki 67	Mki67	100,7	314,3	3,1	0,0110	1426817_at
frizzled-related protein	Frzb	1437,0	4424,0	3,1	0,0110	1416658_at
C-type lectin domain family 4, member n	Clec4n	187,7	601,7	3,1	0,0150	1419627_s_at
myosin Va	Myo5a	279,7	881,7	3,1	0,0110	1419754_at
N-acetylneuraminatase pyruvate lyase	Npl	183,0	609,7	3,0	0,0220	1424265_at
selectin, platelet	Selp	155,7	468,7	3,0	0,0083	1449906_at
matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	Mmp14	202,3	613,7	3,0	0,0077	1416572_at
chemokine (C-X-C motif) ligand 16	Cxcl16	485,0	1494,3	3,0	0,0077	1418718_at
C-type lectin domain family 4, member a3	Clec4a3	240,0	734,7	3,0	0,0110	1429954_at
Fc receptor, IgG, low affinity IIb	Fcgr2b	722,0	2238,0	3,0	0,0110	1435477_s_at
macrophage scavenger receptor 1	Msrl	260,7	820,0	3,0	0,0170	1448061_at
CD300A antigen	Cd300a	244,7	759,0	3,0	0,0110	1435903_at
protein kinase C, beta 1	Prkcb1	365,3	1123,7	3,0	0,0110	1460419_a_at
arrestin, beta 2	Arrb2	201,3	592,0	3,0	0,0130	1451987_at
spleen tyrosine kinase	Syk	140,3	429,3	3,0	0,0120	1418262_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	Tnfrsf11b	765,3	2264,3	3,0	0,0061	1449033_at
prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Ptgs2	311,0	925,3	3,0	0,0061	1417262_at
centaurin, alpha 2	Centa2	84,3	244,7	2,9	0,0093	1425639_at
chemokine (C-C motif) receptor 2	Ccr2	76,3	224,7	2,9	0,0071	1421187_at
lysosomal acid lipase 1	Lip1	1123,3	3432,3	2,9	0,0140	1450872_s_at
RAS-related C3 botulinum substrate 2	Rac2	476,7	1426,0	2,9	0,0120	1417620_at
tetratricopeptide repeat domain 9	Ttc9	148,3	435,3	2,9	0,0070	1455649_at
RIKEN cDNA 1500015O10 gene	1500015O10 Rik	540,0	1676,0	2,9	0,0210	1460049_s_at
collagen triple helix repeat containing 1	Cthrc1	181,3	540,3	2,9	0,0110	1452968_at
RIKEN cDNA 5430435G22 gene	5430435G22 Rik	311,7	915,7	2,9	0,0083	1424987_at
thrombospondin 1	Thbs1	1704,7	4921,7	2,9	0,0051	1421811_at
CD300 antigen like family member F	Cd300lf	194,3	592,0	2,9	0,0160	1427994_at
ring finger protein 149	Rnf149	762,3	2306,3	2,9	0,0170	1429321_at
chemokine (C-C motif) ligand 9	Ccl9	490,3	1416,7	2,9	0,0170	1448898_at
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	Tnfrsf11b	135,3	409,0	2,9	0,0140	1418309_at
C-type lectin domain family 4, member a2	Clec4a2	166,3	484,7	2,9	0,0130	1425407_s_at
cytochrome b-245, beta polypeptide	Cybb	220,3	641,0	2,9	0,0083	1422978_at
caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	Casp4	311,0	892,3	2,9	0,0070	1449591_at
syndecan 3	Sdc3	649,0	1875,3	2,9	0,0017	1450027_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	Rarres1	350,0	984,7	2,9	0,0078	1438055_at
vascular cell adhesion molecule 1	Vcam1	1182,7	3441,3	2,9	0,0071	1415989_at
allograft inflammatory factor 1	Aif1	241,3	707,0	2,8	0,0086	1418204_s_at
C-type lectin domain family 4, member n	Clec4n	114,7	332,0	2,8	0,0170	1425951_a_at
chloride channel calcium activated 1	Clca1	147,7	414,3	2,8	0,0071	1417852_x_at
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3M	Serpina3m	100,7	323,7	2,8	0,0430	1421921_at
prostaglandin D2 synthase 2, hematopoietic	Ptgds2	85,7	235,7	2,8	0,0200	1421492_at
runt related transcription factor 1	Runx1	80,7	229,3	2,8	0,0210	1440878_at
neuropilin 2	Nrp2	234,0	654,3	2,8	0,0110	1435349_at
interferon regulatory factor 8	Irf8	256,7	746,3	2,8	0,0120	1416714_at
regulator of G-protein signalling 1	Rgs1	152,3	424,3	2,8	0,0070	1417601_at
interleukin 2 receptor, gamma chain	Il2rg	536,7	1500,3	2,8	0,0083	1416295_a_at
suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	604,3	1735,3	2,8	0,0093	1455899_x_at
capping protein (actin filament), gelsolin-like	Capg	978,0	2755,0	2,8	0,0082	1450355_a_at
cDNA sequence BC052328	BC052328	175,3	527,0	2,8	0,0300	1435375_at
cDNA sequence AB124611	AB124611	150,7	421,7	2,8	0,0150	1438475_at
protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	Ptpre	308,3	898,7	2,8	0,0150	1418540_a_at
leukocyte specific transcript 1	Lst1	164,3	469,7	2,8	0,0190	1425548_a_at
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	Nfkbie	107,0	305,3	2,8	0,0150	1458299_s_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
CD83 antigen	Cd83	206,0	589,0	2,8	0,0150	1416111_at
coactosin-like 1 (Dictyostelium)	Cotl1	486,0	1356,7	2,8	0,0076	1436236_x_at
baculoviral IAP repeat- containing 1e	Birc1e	131,7	365,7	2,8	0,0120	1421525_a_at
thrombospondin 1	Thbs1	483,0	1338,0	2,8	0,0061	1450377_at
lysozyme	Lyzs	4387,3	12085,3	2,7	0,0061	1423547_at
cDNA sequence BC004044	BC004044	209,3	562,3	2,7	0,0130	1443827_x_at
suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	353,3	959,0	2,7	0,0100	1416576_at
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)	Mafb	465,3	1333,7	2,7	0,0190	1451716_at
expressed sequence AI662270	AI662270	193,3	548,7	2,7	0,0130	1434067_at
growth arrest and DNA- damage-inducible 45 alpha	Gadd45a	263,7	701,0	2,7	0,0110	1449519_at
CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)	Cd74	2677,0	7363,3	2,7	0,0082	1425519_a_at
macrophage scavenger receptor 2	Msr2	412,3	1154,0	2,7	0,0120	1448891_at
neutrophil cytosolic factor 4	Ncf4	198,7	563,7	2,7	0,0220	1418465_at
dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	Ddah1	223,7	610,3	2,7	0,0061	1429298_at
RIKEN cDNA 2610307O08 gene	2610307O08 Rik	127,7	350,0	2,7	0,0120	1447621_s_at
chemokine (C-C motif) ligand 7	Ccl7	117,7	330,0	2,7	0,0200	1421228_at
DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5	D17H6S56E- 5	129,0	333,0	2,7	0,0150	1417821_at
heparan sulfate 6-O- sulfotransferase 2	Hs6st2	179,3	477,3	2,7	0,0055	1450047_at
tRNA phosphotransferase 1	Trpt1	638,7	1661,0	2,7	0,0370	1456014_s_at
		395,3	1014,0	2,6	0,0180	1435144_at
galactosidase, alpha	Gla	193,0	551,0	2,6	0,0300	1418248_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
ribosomal protein S6 kinase polypeptide 1	Rps6ka1	157,0	423,7	2,6	0,0083	1416896_at
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	Tnfaip2	416,7	1117,0	2,6	0,0083	1416273_at
RIKEN cDNA 1500015O10 gene	1500015O10 Rik	469,7	1252,7	2,6	0,0110	1423261_at
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 2	Tnfaip8l2	142,7	369,7	2,6	0,0061	1452948_at
leukocyte-associated Ig-like receptor 1	Lair1	143,3	381,3	2,6	0,0380	1430447_a_at
RIKEN cDNA 0610011I04 gene	0610011I04 Rik	445,7	1167,7	2,6	0,0091	1441811_x_at
cytochrome b-245, beta polypeptide	Cybb	339,0	897,0	2,6	0,0093	1436779_at
glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	Gatm	146,7	380,7	2,6	0,0120	1423569_at
UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5	B4galt5	333,7	879,7	2,6	0,0160	1433617_s_at
matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	Mmp14	781,7	2050,0	2,6	0,0081	1448383_at
GTP cyclohydrolase 1	Gch1	111,3	286,7	2,6	0,0240	1420499_at
CD44 antigen	Cd44	1242,0	3257,7	2,6	0,0110	1423760_at
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	Ptpns1	450,0	1189,7	2,6	0,0097	1448534_at
cathepsin K	Ctsk	926,7	2517,0	2,6	0,0250	1450652_at
interferon activated gene 202B	Ifi202b	486,0	1234,0	2,6	0,0100	1452348_s_at
CD22 antigen	Cd22	275,7	719,3	2,6	0,0110	1419768_at
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12	Galnt12	92,7	254,3	2,5	0,0360	1437760_at
interferon activated gene 203	Ifi203	226,3	592,0	2,5	0,0110	1457035_at

Gename	Gensymbol	MW WT	MW ApoE-/-	Fold Change	p-Wert	Affymetrix Probeset ID
leupaxin	Lpxn	192,3	503,0	2,5	0,0120	1424965_at
histocompatibility 2, class II antigen E beta	H2-Eb1	1733,3	4405,7	2,5	0,0072	1417025_at
WNT1 inducible signaling pathway protein 1	Wisp1	173,3	429,0	2,5	0,0200	1448593_at
DNA segment, Chr 1, ERATO Doi 471, expressed	D1Ertd471e	135,7	332,3	2,5	0,0110	1436221_at
topoisomerase (DNA) II alpha	Top2a	133,3	335,0	2,5	0,0030	1454694_a_at
sterol O-acyltransferase 1	Soat1	453,7	1161,7	2,5	0,0082	1417696_at
lymphocyte cytosolic protein 2	Lcp2	154,7	384,0	2,5	0,0200	1418641_at

Danksagung

Herr Prof. Dr. Andreas Habenicht, Direktor des Instituts für Vaskuläre Medizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena, danke ich für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes zu Anfertigung meiner Dissertation.

Großer Dank gilt Herr Prof. Dr. Reinhard Wetzker, Leiter der Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für die Vertretung meiner Promotion an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Frau PD Dr. Brigitte Kaiser war während der Dissertation meine Betreuerin und Ansprechpartnerin bei Fragen und Problemen zur Durchführung der Experimente. Für ihre stets freundliche Unterstützung, ihre Diskussionsbereitschaft und ihre positive, konstruktive Kritik bei der Anfertigung meiner Dissertation möchte ich ihr herzlich danken.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Vaskuläre Medizin für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung sowie für die freundliche, angenehme Arbeitsatmosphäre. Herr Dr. Rolf Gräbner danke ich für die Unterstützung bei der Einführung in die Technik der Immunfluoreszenz und der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie. Frau Silke Noßmann danke ich für ihre Hilfe beim Umgang mit den Tieren und die Unterstützung bei der Datenauswertung. Frau Gabriele Weber und Frau Margot Voigt danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der histologischen und immunhistologischen Methoden. Herr Markus Hildner danke ich für die Einführung in die molekularbiologischen Methoden, Frau Maria Franke und Frau Christine Ströhl für die technische Assistenz bei der Durchführung der molekularbiologischen Arbeitstechniken. Frau Dörte Radke und Herr Michael Beer danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Hilfe bei der Auswertung der Microarraydaten.

Besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts für Versuchstierkunde des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Herr Dr. Harald Schubert, Herr Dr. Bernd Günther, Frau Regina Steiner und Herr Volker Dix als persönlicher Ansprechpartner danke ich für die Pflege und Betreuung der Versuchstiere und die Bereitstellung des Narkotikum.

Zuletzt möchte ich noch meiner Familie einen großen Dank für ihre stete Unterstützung aussprechen und all denjenigen danken, die ich möglicherweise vergessen habe zu erwähnen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nicole John
Geburtsdatum: 13.07.1976
Geburtsort: Bad Frankenhausen
Familienstand: ledig, 1 Kind

Schulbildung

09/1983 – 08/1991 Polytechnische Oberschule „Hermann Güntherodt“ in Oldisleben
09/1991 – 07/1995 Kyffhäuser-Gymnasium in Bad Frankenhausen
Abschluss mit Abitur

Studium

09/1995 – 11/2001 Studium der Biologie (Diplom) an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
02/2000 – 02/2001 Anfertigung der Diplomarbeit: "Steuerung der Metamorphose bei Bienen: Isolierung und Charakterisierung des prothorakotropen Hormones (PTTH) der Honigbiene *Apis mellifera* L."
11/2001 Abschluss des Biologiestudiums mit Diplom
03/2002 – 12/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Vaskuläre Medizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena zur Anfertigung der Dissertation
Thema: „Atherogenese und arterielles Remodeling der Maus: „Morphologische und molekularbiologische Untersuchungen an Wildtyp- und Apolipoprotein E-Knockout-Mäusen“

Jena, den 15. Oktober 2007

Publikationen

Originalbeiträge

Zhao L, Moos MP, Gräbner R, Pedrono F, Fan J, Kaiser B, **John N**, Schmidt S, Spanbroek R, Lötzer K, Huang L, Cui J, Rader DJ, Evans JF, Habenicht AJ, Funk CD (2004). The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm. Nat Med **10**(9): 966-73. (IF: 30,550)

Moos MP, **John N**, Uzonyi B, Graebner R, Noßmann S, Guenther B, Vollandt R, Funk C, Kaiser B, Habenicht AJR (2005). The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Nov;**25**(11):2386-91

John N, Lötzer K, Uzonyi B, Jahn S, Kramer C, Kaiser B, Habenicht AJR (2006). 5-Lipoxygenase und Atherosklerose. In: 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2005: Stoffwechsel und Modifikation von Lipiden und Lipoproteinen. H. Heinle, H. Schulte and A. v. Eckardstein (Eds.), Burger-Mannheim, Mannheim, pp. 33-40.

Kurzmitteilungen

Moos M, Gräbner R, Lötzer K, Kaiser B, **John N**, Spanbroek R, Schmidt S, Zhao L, Evans JF, Funk CD und Habenicht AJR (2004). Morphological and functional studies of the 5-lipoxygenase (5-LO) pathway in human and murine atherogenesis. Perfusion **17**(9): 338-339.

Lötzer K, Gräbner R, Kaiser B, **John N**, Moos M, Spanbroek R, Hildner M, Funke H und Habenicht AJR (2004). The 5-lipoxygenase (5-LO) cascade and atherosclerosis in mice and men. Chemistry and Physics of Lipids **130**(1): 21-22.

Lötzer K, Kaiser B, Moos M, Gräbner R, **John N**, Spanbroek R, Funk C, Habenicht A (2005). The 5-Lipoxygenase (5-LO) pathway in human and murine atherogenesis. Haemostaseologie **1**: A6

Kongressbeiträge

John N: 5-Lipoxygenase: Role in arterial remodeling? Seminar IZKF-Schwerpunkt „Hämostaseologie und Kardiovaskuläre Medizin“, 21.04.2004.

John N, Kaiser B, Gräbner R, Rühling K, Günther B, Habenicht A: Role of 5-lipoxygenase in arterial remodeling? 3rd Symposium on Vascular Biology, October 8–10, 2003, Münster

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe und dass keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen sind. Ich habe mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad doctor rerum naturalium beworben und weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt.

Jena, den 15. Oktober 2007