



Aus dem
Deutschen Herzzentrum München
Klinik für Herz- und Kreislaufkrankheiten des Freistaates Bayern
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Lange)

Einfluss des CCR10-Systems auf die Neointimaformation nach Endothelverletzung

Jonas Arno Hartung

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. D. Zohlhöfer-Momm
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 29.08.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 02.04.2014 angenommen.

Meiner Familie

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	KORONARE HERZKRANKHEIT	1
1.1.1	EPIDEMIOLOGIE	1
1.1.2	ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE	1
1.1.3	THERAPIE	2
1.2	RESTENOSE	3
1.2.1	DEFINITION	3
1.2.2	PATHOGENESE DER RESTENOSE	3
1.2.2.1	Arterieller elastischer Rückstoß	4
1.2.2.2	Vaskuläres negatives Remodeling	4
1.2.2.3	Neointimaformation	4
1.3	CHEMOKINSYSTEM	7
1.4	CHEMOKINE UND NEOINTIMAFORMATION	8
1.5	CCR10-SYSTEM	9
1.6	ZIELSETZUNG	11
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	12
2.1	VERSUCHSTIERE	12
2.2	FEMORALISVERLETZUNGSMODELL	12
2.3	EUTHANASIE, PERFUSION UND PROBENGEWINNUNG	13
2.4	HISTOMORPHOMETRISCHE ANALYSE	14
2.4.1	PROBENAUFBEREITUNG	14
2.4.2	FÄRBen DER PARAFFINSCHNITTE	15
2.4.3	HISTOMORPHOMETRISCHE ANALYSE	15
2.5	GENEXPRESSIONSANALYSE	16
2.5.1	MRNA ISOLIERUNG	16
2.5.2	CDNA SYNTHESE	17
2.5.3	TAILING	17
2.5.4	AMPLIFIZIERUNG DER CDNA	17
2.5.5	β-ACTIN-KONTROLL-PCR	18
2.5.6	NICHTRADIOAKTIVE GENEXPRESSIONSANALYSE MIT NYLON ARRAYS	18
2.5.6.1	Hybridisierung der Filter und Dig-11-dUTP-Markierung der cDNA	18
2.5.6.2	Waschen und Entwickeln der Filter	19
2.5.7	AUSWERTUNG DER FILME	19
2.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG	20
3	<u>ERGEBNISSE</u>	23
3.1	ERGEBNISSE DER HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN	23
3.2	ERGEBNISSE DER GENEXPRESSIONSANALYSE	24
3.2.1	DIFFERENZIELLE GENEXPRESSION	24
3.2.2	EINTEILUNG DER DIFFERENTIELL REGULIERTEN GENE	24
3.2.3	INFLAMMATIONS-ASSOZIIERTER GENE	26
3.2.4	APOPTOSE/PROLIFERATIONS-ASSOZIIERTE GENE	26
3.2.5	EXTRAZELLULÄRMATRIX-ASSOZIIERTE GENE	27
3.2.6	DIFFERENZIERUNGS-ASSOZIIERTE GENE	29

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.7	SONSTIGE GENE	30
3.3	ERGEBNISSE DER HISTOMORPHOMETRISCHEN UNTERSUCHUNGEN	30
3.3.1	VERGLEICH DER NEOINTIMAFLÄCHEN	30
3.3.2	VERGLEICH DER GEFÄßLUMENVERLUSTE.....	32
3.3.3	VERGLEICH DER MEDIAFLÄCHEN.....	32
3.3.4	VERGLEICH DER INTIMA/MEDIA-RATIO	33
4	<u>DISKUSSION.....</u>	34
4.1	CCR10-DEFIZIENZ FÜHRT ZU EINEM VERÄNDERTEN VSMC-PHÄNOTYP	35
4.2	CCR10-DEFIZIENZ HAT KEINEN EINFLUSS AUF DAS AUSMAß DER NEOINTIMAFORMATION NACH GEFÄßVERLETZUNG	36
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	37
6	<u>SUMMARY</u>	39
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	41
8	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</u>	50
9	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	51
10	<u>DANKSAGUNG</u>	52
11	<u>LEBENS LAUF.....</u>	53

Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
1x	einfacher Ansatz
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ALP	Abkürzung angelehnt an die Aminosäuresequenz des Chemokins: Alanin-Leucin-Prolin
AP	alkalische Phosphatase
BMS	bare metal stent = unbeschichteter Stent
Bp	basepairs = Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CABG	coronary artery bypass grafting = Koronararterien-Bypass
CCL	Chemokin (C-C motif) Ligand
CCR	Chemokinrezeptor (C-C motif)
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CHD	coronary heart disease = koronare Herzkrankheit
CLA	cutaneous lymphocyte antigen
CTACK	cutaneous T-cell attracting chemokine
d	Tag/Tag
DAB	3,3 Diaminobenzidin
DAPI	Diamindino-2-phenylindol-Dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DES	drug eluting stent = medikamentös beschichteter Stent
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleicacid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dTDP	Desoxythymidindiphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
E. coli	Escherichia coli
E.-v.-G.	Elastica-van-Gieson Färbung
ECM	extracellular matrix = Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESkine	embryonic stem cell chemokine
g	Gramm
GPR-2	G-protein-coupled receptor-2
h	hour = Stunde
H.-E.	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDL	high density lipoprotein
IL	Interleukin
ILC	interleukin-11 receptor alpha-locus chemokine
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	low density lipoprotein
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1

ABKÜRZUNGEN

LiCl	Lithiumchlorid
LiDS	Lithiumdodecylsulfat
M	Molar
M.	Musculus
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MEC	mucosae-associated epithelial chemokine
MIP-1 α / β	macrophage inflammatory protein 1 alpha/beta
MCP-1/2	monocyte chemotactic protein-1/2
mRNA	messenger RNA
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
ng	Nanogramm
O ₂	Sauerstoff
o.g.	oben genannt
op	operierte MausgefäÙe
p	Signifikanzniveau
PCI	percutaneous coronary intervention
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
pH	Potentia hydrogenii
PTCA	perkutane transluminale coronare Angioplastie
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted
RNA	ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.g.	so genannt
SDF-1 α	stem cell derived factor-1 α
SDS	Sodiumdodecylsulfate
sec	second = Sekunde
TAE	Trisacetat-EDTA
Taq	Termus aquaticus
TdT	terminale Desoxyribonucleotidtransferase
TGF- β	transforming growth factor β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TSP-1	Thrombospondin-1
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
U	unit = Einheit
u.a.	unter anderem
U/ μ l	unit/Mikroliter = Einheit pro Mikroliter
V.	Vena
v.a.	vor allem
VSMC	vascular smooth muscle cell
WPI	Waschpuffer Igepal
WPT	Waschpuffer Tween
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Koronare Herzkrankheit

1.1.1 Epidemiologie

In den westlichen Industrienationen ist die Koronare Herzkrankheit (KHK; CHD = coronary heart disease) heutzutage eine der häufigsten Todesursachen⁹⁹. Gerne wird in diesem Zusammenhang von einer modernen Zivilisationskrankheit gesprochen. Neueste Studien allerdings konnten mittels Computertomographie an Mumien zeigen, dass auch vor Tausenden von Jahren in Ägypten die Atherosklerose, Ursache der KHK, schon ein wesentliches Gesundheitsproblem darstellte¹.

Weltweit waren im Jahr 2008 12,8 % der Todesfälle Folgen der KHK und ihrer Manifestationsformen, unter denen sich beispielsweise das Akute Koronarsyndrom befindet, in Deutschland waren es zum Vergleich im Jahr 2010 15,5 %^{84; 99}. Das Lebenszeitrisiko für eine KHK beträgt für eine 40-jährige Frau 31,7 %, für einen Mann gleichen Alters beträgt es sogar 48,6 %⁴⁹.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die KHK ist definiert durch die Manifestation der Atherosklerose im Lumen der Koronargefäße¹⁶. Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine von der Intima auf die Media übergreifende arterielle Erkrankung, die mit Lipid- und Kollagenfaseranhäufungen einhergeht und aus pathologischer Sicht durch Elemente einer chronischen Entzündungsreaktion charakterisiert ist. Sie ist die wichtigste Ursache von kardiovaskulären Erkrankungen^{69; 83}.

Die Risikofaktoren, die die Entstehung der Atherosklerose begünstigen können wurden erstmals Ende der 40er Jahre des vergangenen Jahrhunderts im Rahmen der Einführung des Framingham-Score beschrieben: Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum, systolischer Blutdruck, Gesamt- und HDL-Cholesterin und Diabetes Mellitus⁸⁸. Hinzu kamen durch die im Jahr 2002 veröffentlichte deutsche PROCAM-Studie und den dazugehörigen Score die positive Familienanamnese, das LDL-Cholesterin und die Triglyceride, das Gesamtcholesterin wurde durch den LDL/HDL-Quotienten ersetzt⁴.

Zu Beginn des atherosklerotischen Prozesses steht die Schädigung des Gefäßendothels durch o.g. kardiovaskuläre Risikofaktoren. Gemäß der „Response to injury“-Hypothese hat dies zwei Konsequenzen⁶⁹: Einerseits die erhöhte Permeabilität des Endothels, andererseits dessen Aktivierung, die zur Bildung von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen führt. Daraufhin treten verschiedene Lipoproteine, unter denen das LDL die wichtigste Rolle einnimmt, aus der

Blutbahn in das Gewebe über¹⁷. Nach Durchtritt durch die Intima und anschließender Oxidation des LDLs kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C²¹ sowie NF-κB²⁷. Mehrere proinflammatorische und proadhäsive Vorgänge, beispielsweise die Expression endothelialer adhäsions- und migrations-vermittelnder Oberflächenmoleküle, oder die Anlockung von Thrombozyten, die ihrerseits selbst proinflammatorisch und proadhäsiv wirken, werden dadurch aktiviert²⁷.

Erste histologisch ersichtliche Auswirkungen sind die s.g. „foam cells“, bzw. „fatty streaks“. Infolge der Hochregulierung adhäsiv wirkender Oberflächenproteine kommt es zur gesteigerten Diapedese von Leukozyten, dabei vor allem von Makrophagen und T-Zellen in das umliegende Gewebe. Die Makrophagen nehmen daraufhin große Mengen an subintimal gelegenen Lipiden in ihr Zellinneres auf, woraufhin sie die Gestalt von Schaumzellen (foam cells, fatty streaks) annehmen. Im Inneren der Makrophagen werden die Lipide zersetzt, exozytotisch nach außen transportiert und im Rahmen der Antigen-Präsentation präsentiert. Hierdurch angelockt greifen MHC-II-Rezeptor besetzte T-Zellen in das Geschehen ein, indem sie sich um die Schaumzellen herum anlagern und, durch die Antigen-Präsentation stimuliert, verschiedenste Zytokine und Chemokine ausschütten¹⁷. Neben den T-Zellen werden diese Moleküle zusätzlich auch von Makrophagen und Endothelzellen freigesetzt¹⁰.

In der Media der Gefäße und im Inneren der Läsion verursachen diese proinflammatorischen Zytokine und Chemokine die Proliferation und die Migration von VSMCs. Dabei wandern diese aus der Tunica media, ihrem Ursprungsort, durch die Lamina elastica interna in die Tunica intima des Gefäßes. In der Intima produzieren die migrierten VSMCs vornehmlich ECM, es kommt zur Anhäufung von Kollagen und Proteoglykanen, zwei Bestandteilen der ECM, die wesentlich verantwortlich für die Stabilität des entstehenden Plaques sind¹⁰.

Zudem kommt es zur Rekrutierung von im Knochenmark generierten VSMC-Progenitorzellen, im Wesentlichen vermittelt durch Chemokine. Hierbei spielen insbesondere SDF-1α und der dazugehörige Rezeptor CXCR4 eine wichtige Rolle⁷⁴.

1.1.3 Therapie

Die medikamentöse Standardtherapie der KHK setzt sich aus folgenden Medikamenten zusammen: Hemmer der Thrombozytenaggregation, Betarezeptorenblocker, Nitrate, Kalziumkanalblocker, ACE-Hemmer und Cholesterinsynthesehemmer¹⁶.

Bezüglich der Langzeittherapie, bei der die o.g. Medikation alleine erwiesenermaßen nicht ausreichend ist, gibt es zwei wesentliche Therapieansätze: Aus chirurgischer Sicht ist es die Bypassversorgung (CABG = coronary artery bypass graft), die heutzutage allerdings nur noch

in schweren Fällen, beispielsweise bei einer symptomatischen Drei-Gefäßerkrankung mit komplexen Stenosen Mittel der Wahl ist¹¹.

Aus internistischer Sicht hat sich die perkutane transluminale coronare Angioplastie (PTCA; PCI = percutaneous coronary intervention) als Methode der Wahl zur Reperfusion stenotischer Koronargefäße durchgesetzt. Hierbei wird ein Ballon, der an einem Gefäßkatheter angebracht ist, in das verengte Gefäß eingeführt, welches dann durch Entfaltung des Ballons unter hohem Druck aufgedehnt werden kann^{9; 75}.

Eine entscheidende Etappe auf dem Weg zur Weiterentwicklung der PTCA war deren Erweiterung durch die Einführung von BMS (bare metal stent) und später DES (drug eluting stent). Heutzutage werden Stents zu über 80 % nach erfolgter Ballondilatation eingesetzt²⁴. Eine Herausforderung der PTCA bleibt allerdings die Restenose, die im Folgenden näher erläutert werden soll. Eine PTCA ohne Stentimplantation, eine Maßnahme, die praktisch nicht mehr durchgeführt wird, birgt ein 41 %iges Restenoserisiko. Die Einführung von BMS verringerte die Restenoserate auf 28 %, dank DES konnte sie letztlich auf bis zu unter 10 %, abhängig von der Beschichtung der Stents (Rapamycin: 9,3 %; Paclitaxel: 13,1 %), gesenkt werden^{38; 78; 81; 93}.

1.2 Restenose

1.2.1 Definition

Die Erfindungen der PTCA durch Prof. Dr. A. Grüntzig im Jahr 1977, der BMS durch Prof. Dr. J. Puel und Prof. Dr. U. Sigwart im Jahr 1987 und der DES im Jahr 2002 waren jeweils Meilensteine auf dem Weg zur Verbesserung der interventionellen Therapie der KHK^{3; 8; 79}. Ein Problem der PTCA mit und ohne Stentimplantation ist jedoch die Restenose, bzw. In-Stent-Restenose. Definitionsgemäß ist dies eine wiederaufgetretene Stenose des Gefäßdurchmessers von 50%⁸.

1.2.2 Pathogenese der Restenose

Die Pathogenese der Restenose ist ein äußerst komplexer Prozess, für den RAJAGOPAL et al.⁶⁵ drei wesentliche Phänomene verantwortlich machen:

1. Den elastischen Rückstoß der Arterien
2. Das negative vaskuläre Remodeling
3. Die Neointimaformation

1.2.2.1 Arterieller elastischer Rückstoß

Der elastische Rückstoß der arteriellen Gefäßwände ereignet sich innerhalb der ersten Stunde nach Eröffnung des Gefäßes durch die PTCA. Durch die aktive Aufdehnung des Gefäßes im Rahmen der Ballondilatation wird die elastische Media der Koronararterie unter Spannung gesetzt, die sich nach Entfernung des Ballons in einen passiven Rückstoß umwandelt^{65; 98}.

1.2.2.2 Vaskuläres negatives Remodeling

Hinter dem durch GLAGOV et al.²⁶ geprägten Begriff des negativen vaskulären Remodelings verbergen sich Gefäßwandveränderungen, die in den ersten sechs Monaten postinterventionell stattfinden und maßgeblich an der Restenose beteiligt sind. Hierbei kommt es infolge der im weiteren Verlauf näher beschriebenen Neointimabildung zur Kontraktion des betroffenen Gefäßes und somit zur Verengung des Lumens. Verantwortlich für diese Kontraktion machen STRAUSS et al.⁸⁵ die signifikante, bis zu zehnfach erhöhte Synthese von Kollagen, Elastin, und Proteoglykanen, die nach erfolgter PTCA bei Kaninchen zu beobachten ist.

1.2.2.3 Neointimaformation

Sowohl das Problem des elastischen Rückstoßes, als auch das des negativen Remodelings konnte durch die Einführung von BMS gelöst werden. Die Neointimaformation ist der einzige der drei für die Restenose verantwortlichen Prozesse, der lange nicht hinreichend bekämpft werden konnte – bis schließlich durch die Einführung der DES erste Erfolge hinsichtlich der Verminderung der Neointimaformation erzielt werden konnten.

Ursache der Neointimaformation sind durch die Ballondilatation oder den Stenteinsatz verursachte Rupturen atherosklerotischer Plaques, durch die thrombogene Inhalte offengelegt werden, sowie die Denudation des Endothels. Beide Vorgänge münden einerseits in der Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten, andererseits im Verlust von antithrombotischen Faktoren. Im Folgenden setzen im Rahmen der nun stattfindenden inflammatorischen Reaktion die aktivierten Thrombozyten mitogene Substanzen frei, die zur Folge haben, dass es zur Proliferation und Migration von VSMCs kommt, wobei die Proliferation bereits 24 Stunden nach Verletzung beginnt und mindestens zwei Wochen andauert⁶. Mindestens 20 %-40 % der Tunica media zugehörigen VSMCs sind daran beteiligt. Diese VSMCs vollziehen dann, nach der Wanderung von der Media durch die Membrana elastica interna in die Intima, aufgrund der Anhäufung mitogenetischer Protoonkogene einen Wandel von kontraktilen zu dedifferenzierten, synthetischen VSMCs. Diese produzieren daraufhin vor allem ECM und weitere promigratorische Substanzen⁶. Letztlich besteht die Neointima größtenteils aus ECM, zelluläre Komponenten machen lediglich 11 % des

Volumens der Neointima aus⁷⁶. Dieser Vorgang geschieht vornehmlich 3-14 Tage nach Intervention, proliferationsfördernde Protoonkogene treten sogar schon 30 Minuten nach der Endothelverletzung auf^{6; 90}. Insgesamt kann die Formation von Neointima bis zu 6 Monate nach dem Eingriff andauern⁹⁸.

Von wesentlicher Bedeutung im Prozess der Neointimaformation ist zudem die Rekrutierung muskelzellspezifischer Progenitorzellen. Eine Schlüsselrolle spielen hierbei Chemokine, die im Zusammenspiel mit den dazugehörigen Rezeptoren, angeregt u.a. durch Apoptose und Inflammation, die Chemotaxis der Progenitorzellen regulieren. Ein Beispiel für die chemokinvermittelte Rekrutierung muskelzellspezifischer Progenitorzellen ist wie in der Pathogenese der Atherosklerose bereits beschrieben die Interaktion zwischen dem Liganden SDF-1 α und dem Rezeptor CXCR4⁷⁴. Daneben werden auch endothelzellspezifische Progenitorzellen mithilfe der Chemokine rekrutiert. Exemplarisch soll hier die CCR2-Achse, sowie ebenfalls die CXCR4-Achse genannt werden. Am Ort der Gefäßverletzung sorgen Adhäsionsmoleküle der Integrin-, sowie Selectin-Familie für die Integration der Progenitorzellen³².

Wichtig im Zusammenhang mit der Muskelzellmigration und der Rekrutierung von muskelzellspezifischen Progenitorzellen ist zu erwähnen, dass die Schwere der durch die Intervention erlittenen Verletzung proportional zum Ausmaß der Neointimahyperplasie ist. So kommt es bei direkter Beschädigung medialer VSMCs zum einen zur vermehrten Freisetzung von Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF) aus nekrotischen VSMCs, zum anderen zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, die zur Muskelzellproliferation führt⁶. Indiz für den erhöhten Zellumsatz, den diese Vorgänge mit sich bringen, ist die vermehrte Apoptoserate, die in restenotischen Gefäßabschnitten detektiert werden kann. Gleichzeitig ist die vermehrte Apoptose wiederum ein wichtiger Stimulus für die Inflammation und somit für deren Aufrechterhaltung verantwortlich⁹⁴.

Eine äußerst wichtige Rolle in der Entstehung der Neointima spielen neben den bereits angeführten Faktoren die Rekrutierung, Aktivierung und Diapedese von Entzündungszellen⁹⁰. Auslöser ist wiederum die Verletzung des Gefäßendothels durch die PTCA oder den Stenteinsatz. Als Folge davon beginnen sich Thrombozyten/Thrombozyten-, Thrombozyten/Leukozyten- und Leukozyten/Endothel-Zell-Komplexe zu formieren, es kommt zu thrombotischem Geschehen. Vermittelt durch Zytokine (z.B. Interferon- γ) und Chemokine (z.B. IP-10, MIG, s.u.), die im Rahmen der Th1-Zell-vermittelten zellulären Immunantwort sezerniert werden, beginnen Leukozyten in großem Umfang in das umliegende Gewebe überzutreten. Diesen Vorgang, der von fundamentaler Bedeutung für die

Neointimaformation ist und in Kapitel 1.4 näher besprochen wird, kann man in fünf Phasen unterteilen^{12; 41; 74}:

1. Chemotaxis der Leukozyten in das Entzündungsgebiet
2. Rollen der Leukozyten auf der Endotheloberfläche, reguliert durch Selektine
3. Aktivierung der Leukozyten
4. Adhäsion der Leukozyten an das Gefäßendothel, reguliert durch Integrine
5. Diapedese der Leukozyten, reguliert durch den Chemokin-Gradienten, den das umliegende Gewebe bestimmt

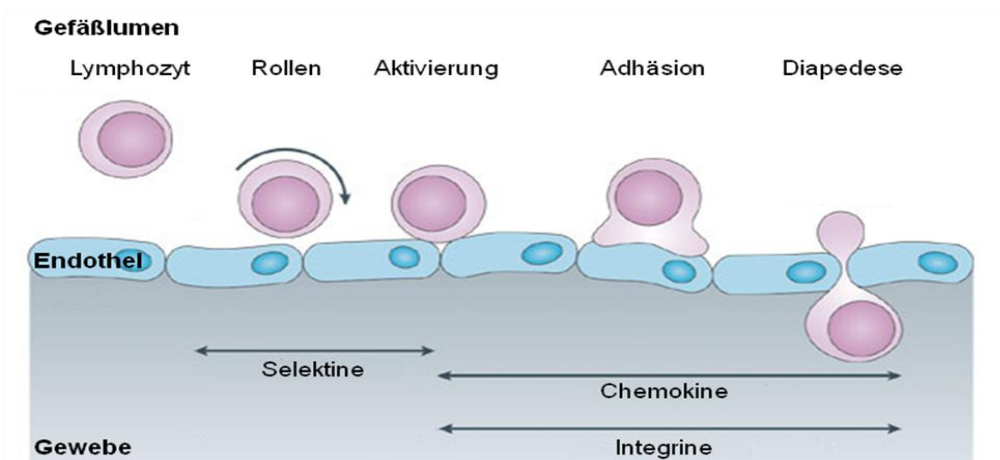


Abbildung 1: Von der Chemotaxis bis zur Diapedese der Leukozyten⁴¹.

Zu sehen sind das Zusammenspiel verschiedener Proteine im Rahmen der Rekrutierung, Aktivierung und Diapedese von Entzündungszellen. Die Chemokine wirken hierbei von der Leukozytenaktivierung an bis hin zur letztendlichen Diapedese der Entzündungszellen und nehmen somit eine wesentliche Rolle ein.

Welche dieser durch RAJAGAPOL et al.⁶⁵ postulierten drei Entitäten nun den größten Teil zur Restenose beiträgt wird kontrovers diskutiert. MINTZ et al.⁵⁵ führen den Anteil der drei Phänomene auf die Art des Eingriffs, auf den die Restenose folgt, zurück: Während bei der PTCA die Restenosierung zum größten Anteil mit 73 % auf das Remodeling und nur zu 27 % auf die Neointimabildung zurückzuführen ist, zeigt sich nach Stentimplantation praktisch kein Remodeling, hier ist die Restenosierung fast ausschließlich Folge der Neointimaformation.

Folgende Abbildung fasst die Pathogenese der Restenose zusammen:

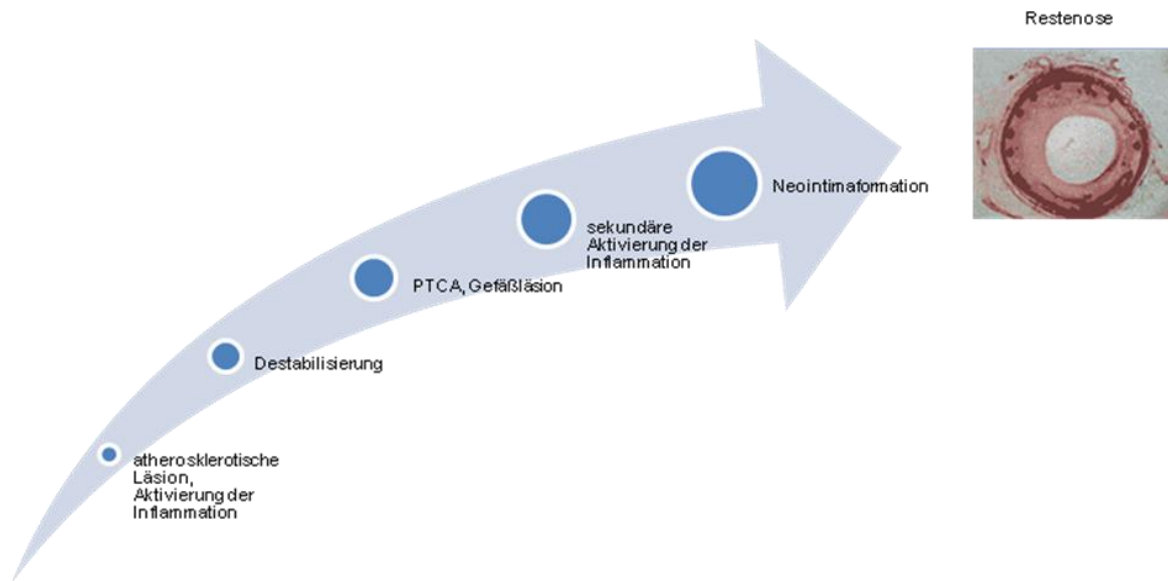


Abbildung 2: Pathogenese der Restenose, modifiziert nach TOUTOUZAS et al.⁹⁰.

1.3 Chemokinsystem

Als Chemokine bezeichnet man chemotaktisch wirkende Zytokine ("chemoattractant cytokines"), die von vielen Zelltypen, u.a. von Makrophagen, Endothelzellen, Phagozyten und dendritischen Zellen, aber auch von Gewebezellen, sezerniert werden können. Chemokine können Effektorzellen anlocken und aktivieren, sie spielen daher eine wichtige Rolle als Mediatoren bei der Regulation einer gerichteten Leukozytenwanderung und dadurch ausgelösten Entzündungsprozessen. Des Weiteren sind Chemokine wichtig für die Proliferation, Adhäsion und Migration von Entzündungszellen, sowie für die Angiogenese und Karzinogenese. Sie interagieren dabei mit einer Gruppe verschiedener membranständiger G-Protein-gekoppelter Chemokin-Rezeptoren¹⁰³. Dabei hat jeder Chemokin-Rezeptor eine bestimmte Chemokin- und Leukozytenspezifität. Dies gilt insbesondere für inflammatorische Chemokine, so auch für die im Folgenden noch näher beschriebenen CCL27 (ehemals: CTACK, ILC, ALP, ESkin) und CCL 28 (ehemals: MEC)⁶¹. Die Chemotaxis der Leukozyten in ein Entzündungsgebiet wird wie bereits erwähnt durch Chemokin-Gradienten im Gewebe gelenkt. Weiterhin greifen Chemokine u.a. durch die Aktivierung von Integrinen direkt in die Adhäsionsvorgänge am Endothel ein und fördern somit die Diapedese der Leukozyten.

Chemokine sind relativ kleine Proteine, charakterisiert durch vier Cysteinreste, die durch die Ausbildung von Disulfidbrücken für die tertiäre Struktur der Chemokine verantwortlich sind. Traditionell werden die Chemokine anhand dem Vorhandensein und der Position der Cysteinreste in vier Untergruppen unterteilt: CC, CXC, CX₃C und C Chemokine^{91; 103}.

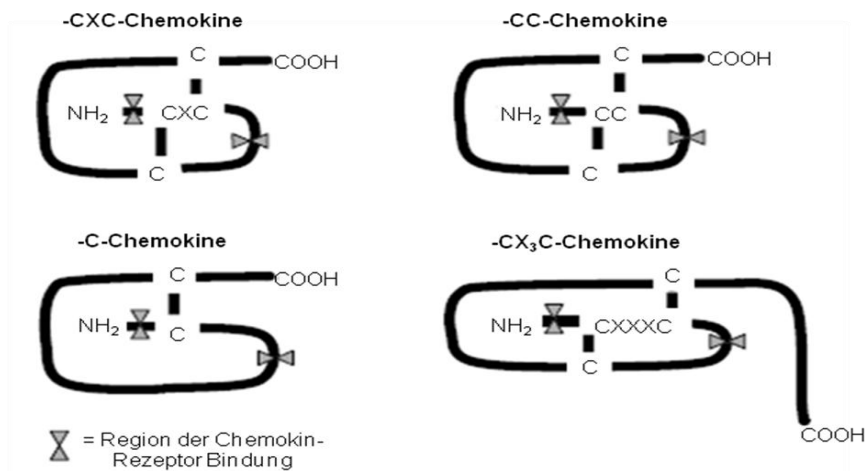


Abbildung 3: Chemokin-Untergruppen, unterteilt anhand der Position der Cysteinreste⁹¹.

1.4 Chemokine und Neointimaformation

Wie bereits erwähnt spielt die Inflammation eine führende Rolle in der Entstehung der Neointima⁹⁰. Hervorzuheben auf Seite der zellulären Komponente der inflammatorischen Kaskade sind vor allem T-Zellen und Makrophagen, auf der Seite der humoralen Komponente sind es Chemokine und deren Rezeptoren, die die Schnittstelle zwischen den beiden Komponenten der Inflammation darstellen, das Zusammenspiel ermöglichen und immer mehr an Bedeutung gewinnen. Bereits einige Chemokinrezeptoren (z.B. CXCR4, CCR1, CCR2), sowie zahlreiche Chemokine (z.B. SDF-1 α , MCP-1), sind als wichtige Bestandteile der Neointimaformation beschrieben worden^{72;74; 92}.

Auch der CCR5-Rezeptor, der vor allem auf Makrophagen, sowie Th1-Zellen exprimiert wird, und dessen Liganden CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) und CCL8 (MCP-2) haben als proinflammatorisch wirkendes, hämatopoetische Vorläuferzellen rekrutierendes Chemokinsystem einen wichtigen Anteil an der Neointimaformation^{5; 73; 74; 97; 100}. Dieses erst vor kurzem im Zusammenhang mit der Neointimaformation erwähnte Chemokinsystem soll im Folgenden näher erläutert werden, es stellt ein aktuelles Beispiel für die Interaktion zwischen T-Zellen und einem Chemokinsystem und der daraus resultierenden Formation von Neointima dar.

Neben Makrophagen sind T-Zellen diejenigen Zellen, die als erste sowohl nach Antigenpräsentation im Rahmen der Atherosklerose, als auch nach Gefäßverletzung im Rahmen der Neointimaformation in die betroffenen Gefäßwände übertreten. Sie nehmen hierbei jeweils eine Schlüsselposition ein^{18; 69}. T-Zellen werden unterteilt in zwei wesentliche

Subpopulationen: CD4-positive T-Helferzellen (Th-Zellen) und CD8-positive cytotoxische T-Zellen (Tc-Zellen)⁶³. Eine für die Neointimaformation essentielle Subpopulation stellen die Th-Zellen dar, sie sezernieren zahlreiche Zytokine und können wiederum unterteilt werden, je nachdem ob die sezernierten Zytokine an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt sind (Th1-Zellen), oder ob sie die humorale Immunantwort der B-Lymphozyten stimulieren (Th2-Zellen). Th1-Zellen, die u.a. das wesentlich an der Neointimaformation beteiligte Interferon- γ sezernieren, sind assoziiert mit dem CCR5-Chemokinsystem, sie tragen den CCR5-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche^{22; 100; 105}. Dessen Liganden (CCL3, CCL4, CCL5, und CCL8) steuern durch ihre Anlagerung an den Rezeptor die Rekrutierung von Makrophagen und T-Zellen, die dann in den verletzten Gefäßen wesentlich zur Neointimahyperplasie beitragen. So konnten Untersuchungen an verletzten Karotiden von apoE^{-/-}-Mäusen durch ZERNECKE et al.¹⁰² nachweisen, dass durch die Defizienz von CCR5 vermindert Makrophagen und T-Zellen am Ort der Gefäßläsion vorhanden sind und zudem vermehrt das anti-inflammatorische IL-10 sezerniert wird. Es resultiert hieraus eine Reduktion der Neointima um 63 % im Vergleich zu CCR5^{+/+} apoE^{-/-}-Mäusen.

Zudem ist das CCR5-System, neben dem CXCR4-System, wesentlich an der Rekrutierung hämatopoetischer Progenitorzellen beteiligt, eine Tatsache die darauf beruht, dass CCR5-Liganden die durch CXCL12, Ligand des CXCR4, induzierte Chemotaxis und Adhäsion von CD34⁺-Zellen im Rahmen inflammatorischer Prozesse modulieren. Auch diese Tatsache ist von Bedeutung für die Neointimahyperplasie^{5; 63; 72}.

Die exemplarische Erläuterung des CCR5-Systems an dieser Stelle soll in erster Linie den Zusammenhang zwischen T-Zellen, Chemokinen und der Neointimaformation anschaulich darstellen. Des weiteren soll die Diversität der Chemokin-Funktionen veranschaulicht werden und zudem die fundamentale Rolle der Th1-Zell-vermittelten zellulären Immunantwort in Bezug auf vasoproliferative Pathomechanismen, eine Tatsache die in der Literatur vermehrt an Bedeutung gewinnt, illustriert werden^{22; 105}.

1.5 CCR10-System

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluss des CCR10 (ehemals: GPR-2) und seinen Liganden CCL27 und CCL28 auf die Bildung von Neointima, als einem Teilaspekt der Restenose genauer untersucht werden.

Exprimiert wird CCR10 von T-Zellen, darunter v.a. von CLA⁺-CD4⁺-T-Zellen, die 80 %-90 % der T-Zellen in entzündeter Haut ausmachen. Des weiteren ist CCR10 auf dermalen Fibroblasten, mikrovaskulären Endothelzellen, Melanozyten, im Blut zirkulierenden

Monozyten, Langerhans'schen Zellen und 20 % der CD34⁺-Stammzellen zu finden. Auch wenn CCR10 bisher im wesentlichen in Zusammenhang mit der Entzündung der Haut genannt und erforscht wurde, so wiesen auch HOMEY et al.³⁰ schon darauf hin, dass CCR10 in vielen anderen Geweben, wie etwa in Gehirn, Lunge, Leber und Teilen des Gastrointestinaltraktes ebenfalls exprimiert wird^{29; 35}. SIMONETTI et al.⁸⁰ beispielsweise belegen, dass CCR10 in neoplastischen Zellen deren Fähigkeit zu wachsen, zu metastasieren und der Immunantwort des betroffenen Organismus zu entkommen, erhöht.

CCL27, einer der zwei Liganden des CCR10, wird zum größten Teil von Keratinozyten freigesetzt, daneben zu sehr geringen Anteilen beispielsweise in der Leber⁵⁸. Nach der Sekretion in die Dermis lagert sich CCL27 an mikrovaskuläre Endothelzellen an, wird dort immobilisiert und induziert die Expression von CCR10, IL-2 und der α -Kette des LFA-1, welches in seiner Rolle als Leukozyten-assoziiertes Integrin, nicht nur für die Lymphozyten-Adhäsion, sondern auch für deren Migration wichtig ist⁸².

Es lässt sich also sagen, dass CCL27 eine wichtige Rolle in der T-Zell-Antwort spielt, die wiederum in der Entstehung der Restenose eine entscheidende Rolle spielt^{13; 24}: Einerseits über die Förderung der Diapedese mithilfe von Selectinen und Integrinen, andererseits über die Stimulation der IL-2-Produktion durch die T-Zellen selbst. IL-2, ehemals „T-cell growth factor“ genannt, wiederum stimuliert Wachstum und Differenzierung von T-Zellen und unterstützt die Entwicklung von T-Gedächtniszellen, sowie von regulatorischen T-Zellen^{7; 89}. Die CCR10-Achse spielt somit eine wichtige Rolle bei der Regulierung und Organisation der zellulären Komponente des inflammatorischen Geschehens. Diese Hypothese wird bekräftigt durch die Tatsache, dass die Gabe eines Glucocorticosteroids die CCL27-Produktion senkt. Außerdem zeigen immunhistochemische Analysen bezüglich der CCR10-Expression in gesundem Gewebe, im Gegensatz zu entzündetem Gewebe keine CCR10⁺-Zellen²⁹. Ein weiterer Beweis ist die intradermale Injektion von murinem CCL27 in vivo, getestet an BALB/c Mäusen, die zur T-Zell-Rekrutierung führt - neutralisiert man CCL27 mithilfe von Antikörpern geschieht dies nicht. Dem gegenüber allerdings steht die hohe Expression des CCL27 sowohl in normaler als auch in infizierter Haut. Die Rolle des CCR10-Systems ist demzufolge gleichzeitig inflammatorischer, sowie homeostatischer Natur²⁹.

Äußerst interessant in Bezug auf die Restenose ist die Tatsache, dass CCL27 in geschädigter Haut im Rahmen von Wundheilungsprozessen vermehrt exprimiert wird³⁵. Zusätzlich beschreiben INOKUMA et al.³⁵, dass ungefähr 20 % der CD34⁺-Stammzellen CCR10 exprimieren. Intradermale Injektion von CCL27 beschleunigt die Migration von Keratinozyten-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und folglich die Wundheilung

signifikant, ohne einen Einfluß auf Angiogenese oder Keratinozyten-Proliferation zu haben. CCL27-Antikörper hemmen diesen Effekt.

WEBB et al.⁹⁶ zeigen zudem, dass Chemokine sowohl eine Steigerung ihrer biologischen Aktivität, als auch eine Verlängerung ihrer Halbwertszeit durch die Anlagerung an ECM bewirken können.

Ein weiterer CCR10 Ligand ist CCL28, welches bei Betrachtung der Aminosäuresequenz eine 40%ige Übereinstimmung mit CCL27 hat. CCL28 vermittelt neben der Chemotaxis CCR10⁺-Zellen auch die Chemotaxis CCR3⁺-Zellen. Freigesetzt wird CCL28 von Epithelzellen des Darms, der Lunge, der Brust, Speicheldrüsen und von Keratinozyten^{36; 64; 95}. KAGAMI et al.³⁶ zeigen, dass die Produktion von CCL28 in Keratinozyten durch CCL27 über verschiedene Signalwege (TNF- α , IL-1 β) reguliert wird. Ähnlich der Funktion des CCL27 ermöglicht CCL28 die Adhäsion und Migration sowohl CCR10⁺-T-Zellen, als auch CCR10⁺-B-Lymphozyten.

Sowohl die Expression des CCR10, als auch die Produktion und Sekretion des CCL27 und des CCL28 können durch die proinflammatorisch wirkenden Zytokine TNF- α , welches u.a. von T-Zellen produziert und sezerniert wird und somit ein weiterer Beleg für die Interaktion zwischen dem CCR10-System und T-Zellen ist, und IL-1 β angeregt werden^{30; 36}.

1.6 Zielsetzung

Auch wenn Innovationen wie DES die Restenoserate bereits signifikant senken konnten, stellt die Restenose nach PTCA mit Stentimplantation auch heute noch ein erhebliches Problem dar³⁸. Führt man sich nun die Pathogenese der Restenose vor Augen, so wird klar, dass die ersten beiden Entitäten, die die Restenose bewirken, also der elastische Rückstoß der Arterien und das vaskuläre negative Remodeling bereits sehr gut durch die Einführung von BMS und DES beseitigt werden konnten. Einzig das Problem der Neointimaformation ist trotz DES nicht gelöst.

Zielsetzung dieser Dissertation ist es, den Einfluß des CCR10 und seiner Liganden CCL27 und CCL28 auf die Neointimaformation nach Endothelverletzung darzustellen. Um die Neointimabildung der Gefäße zu simulieren, werden die Femoralarterien der Wildtypmäuse (CCR10^{wt}) und der CCR10-Knock-Out-Mäuse (CCR10^{-/-}) gemäß dem Femoralisverletzungsmodell nach SATA et al.⁷¹ behandelt.

Mit den aus den Versuchstieren gewonnenen Gewebeproben werden dann Analysen bezüglich der Histomorphometrie, sowie der Genexpression durchgeführt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Die Experimente werden an zwei Maustypen mit dem genetischen Background einer BALB/c-Maus durchgeführt: Zum einen an einer CCR10^{wt}-Maus, die bei allen durchgeführten Versuchen als Kontrolle dient, zum anderen an einer CCR10^{-/-}-Maus. In der CCR10^{-/-}-Maus wird in Exon 1 des CCR10-Genlokus, der sich in der Maus auf Chromosom 11 befindet, enhanced-green-fluorescent-protein (EGFP) und eine Neomycinkassette (NEO) eingebaut. Eben jene Neomycinkassette ersetzt den entfernten CCR10-Genabschnitt, bei den darauffolgenden Amplifikationen wird nun statt CCR10 Neomycin gebildet⁵⁹.

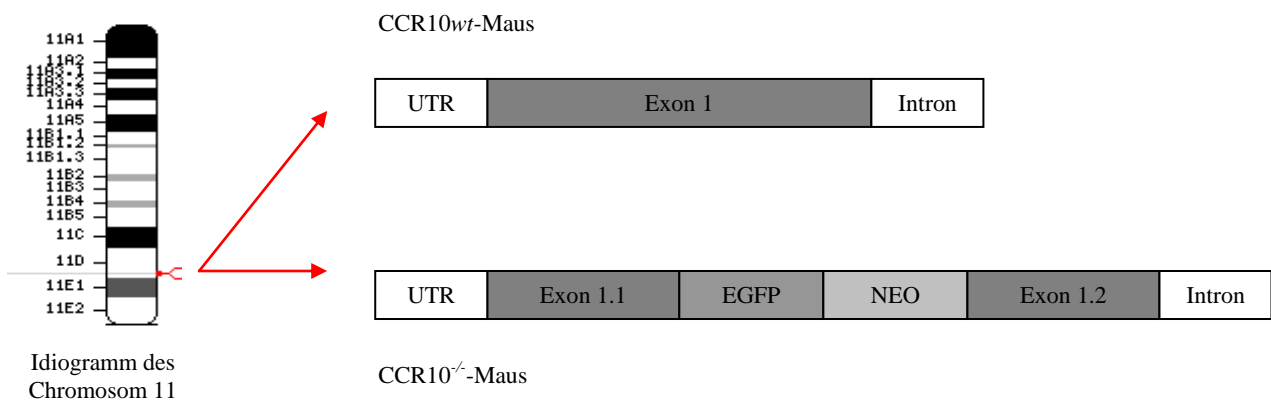


Abbildung 4: Genetische Struktur der CCR10^{-/-}-Maus.

UTR = untranslated Region; EGFP = enhanced-green-fluorescent-protein; NEO = Neomycinkassette.

2.2 Femoralisverletzungsmodell

Die zwei Maustypen werden von Herrn Dr. med. Tobias Dietrich Haase entsprechend dem Femoralisverletzungsmodell nach SATA et al.⁷¹ unter einem Mikroskop (Carl Zeiss, Deutschland) mit mikrochirurgischen Instrumenten (FST, Heidelberg) operiert. Zunächst erfolgt die Narkotisierung durch Inhalation von 5%igem Isofluran (Forene[®], Abbott, Billingstadt, Schweden) und Sauerstoff (1000 ml O₂/min) in einer Ganzkörperkammer, nach Verlust des Stellreflexes wird die Erhaltung der Anästhesie durch Maskeninhalation mit 1,8 – 2,2 % Isofluran und Sauerstoff (200 - 400 ml O₂/min) durchgeführt. Die intraoperative Analgesie wird durch intraperitoneale Injektion von Fentanyl (0,05 mg/kg, Fentanyl[®] Curamed, Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe) gewährleistet.

Nach Fixierung des Tieres auf einer mit einem OP-Tuch abgedeckten Wärmematte, wird es zunächst an der Innenseite beider Oberschenkel enthaart (Pilca Enthaarungscreme, GlaxoSmithKline, Bülh) und desinfiziert (Cutasept F[®], Bode, Hamburg). Der Hautschnitt, ca. ein Zentimeter lang, erfolgt median am Innenschenkel. Nach stumpfer Präparation des

umliegenden Bindegewebes wird die Gefäß-Nerven-Strasse dargestellt, der N. femoralis isoliert und die A. und V. femoralis distal und proximal eines Muskelastes der A. femoralis, der auf Höhe des Kniegelenkes in die Tiefe verläuft, angeschlungen (USP 8/0 Prolene[®], Ethicon, Norderstedt). Im Anschluss wird der Muskelast aus der Tiefe freipräpariert und distal permanent ligiert (USP 8/0 Prolene[®], Ethicon, Norderstedt). Anschließend werden A. und V. femoralis temporär abgebunden um hinterher beim Zug des Drahtes eine Blutung zu verhindern, der Muskelast mit einer Gefäßschere („Mini Vannas“, FST, Heidelberg) eröffnet und der Draht („standard guidewire“ für Herzkatheter, Durchmesser: 0,014 inch) ca. 5 mm unter Lösen der proximalen, temporären Ligatur vorgeschoben und für eine Minute belassen. Nach Zurückziehen des Drahtes wird der Seitenast schließlich auch proximal permanent ligiert (USP 8/0 Prolene[®], Ethicon, Norderstedt) und der Blutfluss in der A. und V. femoralis wiederhergestellt. Zuletzt erfolgt der Wundverschluss mit U-Heften (USP 6/0 Vicryl[®], Ethicon, Norderstedt).

2.3 Euthanasie, Perfusion und Probengewinnung

Zur Euthanasie werden die Versuchstiere zunächst erneut in einer Ganzkörperkammer mittels Inhalationsanästhesie narkotisiert. Nach Erreichen des Stadiums der Reflexlosigkeit werden sie durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet, anschließend thorakotomiert, entblutet und mit eiskalter Ringer-Lösung (Ringer-Lösung Delta Select, Delta Select GmbH, Pfullingen) perfundiert. Währenddessen sind die Tiere auf Eis gelagert, um postmortale Effekte der Gefäße zu verhindern.

Im Anschluss erfolgt der erneute Hautschnitt parallel zur Operationsnarbe. Nach Bindegewebspreparation, sowie Darstellung der anatomischen Strukturen werden 5 mm der A. femoralis, ausgehend von der Einmündung des Seitenastes, entnommen. Um für die histomorphometrische Aufbereitung einen fixen Anfangspunkt zu haben, wird darauf geachtet die proximale Ligatur des Seitenastes an der Probe zu belassen.

Gefäße, die in der Folge mittels Genexpressionsanalyse analysiert werden sollen, werden umgehend in CryoRöhrchen (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) schockgefroren. Gefäße, die histomorphometrisch analysiert werden sollen, werden zunächst auf Filterpapier gestreckt und daraufhin für ca. 24 Stunden zur Immersionsfixierung in 4%igem Formalin belassen.

2.4 Histomorphometrische Analyse

2.4.1 Probenaufbereitung

Nach ca. 24 Stunden wird das Gefäß aus der 4%igen Formalinlösung in eine Plastikkassette für den Einbettautomat (Shandon Pathcentre[®], Thermo Electron GmbH Deutschland) überführt, in dem über Nacht folgende Schritte durchlaufen werden: Fixierung in 4%igem Formalin (ca. 2 h), stufenweise Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70 %, Ethanol 96 %, Isopropanol 100 %; insgesamt ca. 5,5 h), Verdrängung des Alkohols mit Xylol (ca. 2 h), Vorparaffinierung in Paraffinbädern mit 4%igem Formalin (ca. 2 h). Bis zum Einbetten in flüssiges Paraffin (Temperatur ca. 60 °C) verbleibt die Probe bei 60 °C im Brutschrank.

An einem Paraffinspendeautomaten (TBS Paraffin Embedding System: Thermal Unit, Cool Unit, Dispenser Unit, Medite Medizintechnik, Burgdorf) werden die Gefäße gestreckt und senkrecht mit dem Knoten der proximalen Ligatur nach unten eingebettet und die Paraffinblöcke gehärtet.

Angefertigt werden die Schnitte (Schnittdicke: 2 µm) am Rotationsmikrotom (Mikrom HM 335 E, Mikrom GmbH, Walldorf), im Anschluss werden sie in einem „Paraffin Streckbad“ (TFB 35, Medite Medizintechnik, Burgdorf) gestreckt und schließlich auf Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgetragen.

Es werden je Gefäß 10 Schnittebenen im Abstand von 50 µm angefertigt. Je Schnittebene werden zwei Objektträger mit je zwei Schnitten gefertigt, der Ausgangspunkt ist jeweils oberhalb der proximalen Ligatur des Seitenastes.

Um die Schnitte schließlich färben zu können müssen sie zuvor bei ca. 60 °C im Brutschrank für 20 Minuten entparaffiniert werden.

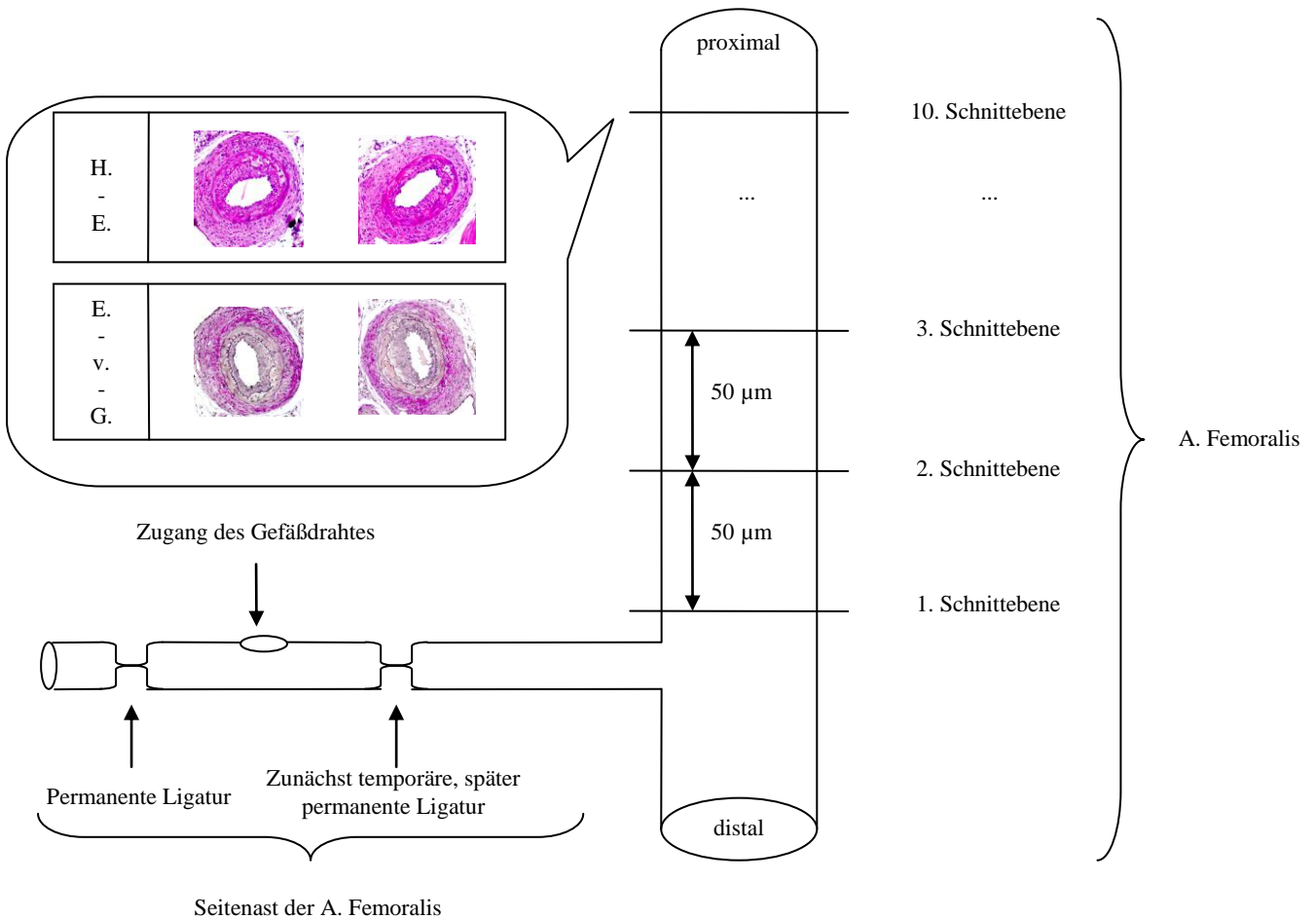


Abbildung 5: Das Femoralisverletzungsmodell nach SATA et al.⁷¹.
H.-E. = Hämatoxylin-Eosin-Färbung; E.v.G. = Elastica von Giesson Färbung

2.4.2 Färben der Paraffinschnitte

Zur Färbung der Schnitte wird ein Färbeautomat (Tissue Strainer TST 30, Medite Medizintechnik, Burgdorf) eingesetzt. Als Standard- und Übersichtsfärbung wird eine Hämatoxylin-Eosinfärbung (H.-E.) angefertigt. Zusätzlich führen wir eine Elastica-van-Gieson-Färbung (E.-v.-G.) durch, welche speziell der Darstellung von kollagenen und elastischen Fasern, jeweils wesentliche Bestandteile der Lamina elastica interna und externa, dient. Es werden, wie in obiger Grafik angedeutet, je Schichtebene ein Objektträger (mit zwei Schnitten) H.E., der andere E.v.G. gefärbt.

2.4.3 Histomorphometrische Analyse

Von jedem Gefäßpräparat wird ein E.-v.-G. und ein H.-E. Schnitt pro Schichtebene mit einem Mikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Carl Zeiss Deutschland) computergestützt über AxioVision 2.0 (Zeiss, Carl Zeiss Vision GmbH Deutschland) in 10-facher Vergrößerung fotografiert und abgespeichert. Mithilfe der Scion Image beta 4.0 (Scion Corporation, Maryland, USA) Software werden folgende Parameter gemessen:

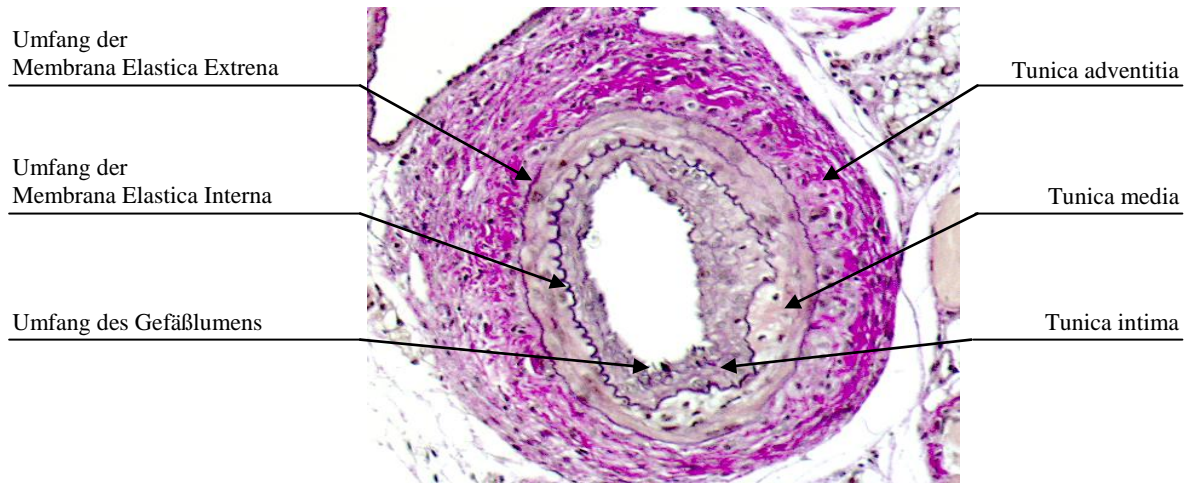


Abbildung 6: Morphometrische Ausmessungen; A. femoralis, E.-v.-G., nach Gefäßverletzung.

Folgende Parameter werden hieraus berechnet:

1. die Neointimafläche (in μm^2)
2. der Gefäßlumenverlust in %
3. die Mediafläche (in μm^2)
4. die Mediafläche in % Gefäßdurchmesser

Die Auswertung der erhobenen histomorphometrischen Daten wurde unabhängig durch Herrn Dr. med. Tobias Dietrich Haase vorgenommen.

2.5 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse ist ein durch KLEIN et al.⁴² im Jahre 2002 entwickeltes Verfahren, dass sowohl quantitative als auch qualitative Aussagen über die Aktivität verschiedener Gene zulässt.

2.5.1 mRNA Isolierung

Die Arterie wird in 1000 μl Lysis Binding Buffer (100 mM TRIS/HCl, pH 7,5; 500mM LiCl; 10mM EDTA, pH 8,0; 1 % LiDS; 5mM DTT) in einem Eppendorfgefäß (Eppendorf, Hamburg) mit einem Homogenisator (Ultra-Turrax T8, IKA-Werke, Staufen) homogenisiert und lysiert. Um die mRNA zu extrahieren werden dem Zelllysate 50 μl paramagnetische oligo-dT₁₅ Beads (30 min bei 4°C) zugegeben, welche die mRNA binden und vorher mit Waschpuffer A (100 mM TRIS/HCl, pH 7,5; 150 mM LiCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 % LiDS) äquilibriert wurden. Danach wird das Eppendorfgefäß in einen Magneten (MPC Magnetic Particel Concentrater, Dynal, Oslo, Norwegen) überführt, der die Beads inklusive der daran gebundenen mRNA anzieht. Die Beads werden nacheinander mit 100 μl des

Waschpuffers Igepal (WPI) (50 mM TRIS/HCl, pH 8,0; 75 mM KCl; 10 mM DTT; 0,25 % Igepal), 100 µl des Waschpuffers Tween (WPT) (50 mM TRIS/HCl, pH 8,0; 75 mM KCl; 10 mM DTT; 0,5 % Tween 20) und nochmals mit 100 µl WPI gewaschen und resuspendiert, der Überstand wird jeweils verworfen. Letztlich werden die Beads in ein PCR Tube 0,2 ml (Kisker, Steinfurt) überführt, der Überstand wird wiederum abgenommen.

2.5.2 cDNA Synthese

Die an den Beads gebundene mRNA wird mit 10 µl cDNA-Synthese Puffer L1-Mix (2 µl 5 x First Strand Buffer; 1 µl 0,1 M DTT; 0,5 µl 10 % Igepal; 6 µl 166 µM CFL5C; 0,5 µl H₂O) resuspendiert. Nach einer Annealingzeit von fünf Minuten zur Bindung des CFL5C-Primers [5'-(CCC)₅GTCTAGA(NNN)₂-3'], wird der cDNA-Synthese Puffer L2-Mix (2 µl 5 x First Strand Buffer; 1 µl 0,1 M DTT; 1 µl 10 mM dNTP; 5 µl H₂O; 1 µl Superscript IITM RNase H⁻ Reverse Transkriptase) zugegeben und die mRNA revers transkribiert (45 min bei 44 °C).

2.5.3 Tailing

Nachdem erneut der Überstand im Magneten abgenommen wird, werden die Beads mit 100 µl Tailing-Waschpuffer (TWP) (50 mM KH₂PO₄, pH 7,0; 1 mM DTT; 0,25 % Igepal) gewaschen und daraufhin in 10 µl Tailing-Mix (1,6 µl 25 mM MgCl₂; 1 µl 1 mM DTT; 1 µl 2 mM dGTP; 0,5 µl 200 mM KH₂PO₄; 5,9 µl H₂O) resuspendiert.

Nachdem die Beads mit 40 µl Mineralöl bedeckt wurden, um ein Verdunsten der Probe zu verhindern, wird die cDNA denaturiert (4 min bei 94 °C) und vorübergehend auf Eis gekühlt. Nun werden 10 U terminaler Desoxynucleotidtransferase (TdT) hinzugegeben und die Tailingreaktion (24 min bei 37 °C), durch die 15-20 dGTP-Basen an das 5' Ende der cDNA angehängt werden, findet statt. Im Anschluß wird die TdT inaktiviert (6 min bei 70 °C).

2.5.4 Amplifizierung der cDNA

Die cDNA wird durch den CP2 Primer [5'TCA GAA TTC ATG (CCC)₅-3'], der sich an die zuvor eingebauten dGTP-Basen anlagert, amplifiziert. Hierzu werden zunächst 35 µl PCR M1-Mix (4 µl Puffer 1; 7,5 µl Formamid 20 % [v/v]; 24 µl H₂O) und nach Erwärmung der Suspension auf 78 °C (im Thermocycler, MultiCycler PTC 200, MJ Research, Biozym, Hess Oldendorf) zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen, weitere 4,75 µl PCR M2-Mix (2,5 µl 24 µM CP2 Primer; 1,75 µl 10 mM dNTP; 1,5 µl DNA Pol Mix [3,5 U/µl]) zugegeben. Die PCR Reaktion läuft dann im Thermocycler nach folgendem Schema ab: 78 °C für 30 sec; 19 Zyklen: 94 °C für 15 sec, 65 °C für 30 sec, 68 °C für 2 min; 20 Zyklen: 94 °C für 15 sec, 65 °C für 30 sec, 68 °C für 2 min 30 sec + 10 sec/Zyklus; 68 °C für 7 min.

2.5.5 β -Actin-Kontroll-PCR

Der Erfolg der cDNA-Synthese wird anhand einer Kontroll-PCR für die Expression des Housekeeping-Gens β -Actin überprüft.

β -Aktin-Maus-Primer: 5'-GCT CGG TCA GGA TCT TCA TGA GG-3'

5'-ACC TTC AAC ACC CCA GCC ATG-3'

Hierzu durchläuft ein 1:10 verdünnter Aliquot der cDNA-Lösung, dem 24 μ l des PCR Master-Mixes (2,5 μ l PCR Puffer 10x; 2,5 μ l dNTPs 2 mM; 0,5 Primer 3'; 0,5 μ l Primer 5'; 0,15 μ l Taq DNA Polymerase [5 U/ μ l]; 18,85 μ l H₂O) beigemischt werden, folgende Schritte im Thermocycler: 94 °C für 1 min; 35 Zyklen: 94 °C für 15 sec, 55 °C für 15 sec, 72 °C für 15 sec; 72 °C für 2 min.

Die PCR-Produkte werden auf einem 2%igen Agarosegel (2 g Agarose auf 100 ml 1 x TAE Trisacetat-EDTA-Puffer [242 g TRIS; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0; Ad 1000 ml H₂O]) mit Ethidiumbromid (0,5 μ g/ml) elektrophoretisch getrennt. Als DNA-Größenstandard wird der Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (100 μ l Loading Dye 6x; 300 μ l H₂O) verwendet. Die anschließende Lagerung der cDNA erfolgt bei -20 °C.

2.5.6 Nichtradioaktive Genexpressionsanalyse mit Nylon Arrays

Es werden von jeder Probe 2352 Gene, aufgeteilt auf zwei Nylon Arrays („Filter“), Mouse 1.2 und Mouse 1.2II (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA), untersucht.

2.5.6.1 Hybridisierung der Filter und Dig-11-dUTP-Markierung der cDNA

Zunächst müssen unspezifische Bindungsstellen auf den Filtern blockiert werden (Prähybridisierung). Hierzu werden die Filter über Nacht in Anwesenheit von 50 μ g/ml Escherichia coli DNA in 6 ml Dig-Easy-Hyb Hybridisierungslösung (Dig-Easy Hyb Granules, 64 ml H₂O) bei 44 °C inkubiert.

Der nun folgende Einbau von Digoxigenin-11-dUTP mittels PCR dient der Markierung der cDNA. Die 1:10 verdünnte cDNA-Lösung wird mit Dig-Master-Mix (5 μ l Puffer 1; 7,5 μ l Formamid 20 % [v/v]; 5 μ l CP2 24 mM; 1,75 μ l 1/7 dNTP Mix [8,3 mM dTTP; 10 mM dATP; 10 mM dGTP; 10 mM dCTP]; 2,5 μ l Dig-dUTP 1 mM; 0,75 μ l DNA Pol Mix [3,5 U/ μ l], 27,5 μ l DEPC H₂O [DEPC:H₂O=1:1]; 1 μ l DNA) vermischt und in einer PCR mit folgenden Bedingungen reamplifiziert: 94 °C für 2 min; 15 Zyklen: 94 °C für 15 sec, 63 °C für 15 sec, 68 °C für 2 min; 10 Zyklen: 94 °C für 15 sec, 68 °C für 3 min + 5 sec/Zyklus; 68 °C für 7 min.

Zur Erfolgskontrolle der PCR wurde der Nucleic acid dot Metric kit™ (Geno Technology Inc., St Louis, MO, USA) verwendet.

Im Anschluss werden 50 µl der markierten cDNA mit Herring sperm DNA (10 mg/ml) versetzt, denaturiert (10 min bei 95 °C) und nach sofortiger Beimengung zur auf 44 °C vorgewärmten Prähybridisierungslösung für 48 Stunden bei 44 °C inkubiert (Hybridisierung).

2.5.6.2 Waschen und Entwickeln der Filter

Das Waschen der Filter in den unterschiedlichen, auf 68 °C erwärmten Waschlösungen dient der Entfernung aller unspezifisch gebundenen cDNA Fragmente von den Filtern. Zunächst werden sie nacheinander in 2 x SSC / 0,1 % SDS und 1 x SSC / 0,1 % SDS geschwenkt. Hiernach werden sie für 15 Minuten mit 0,5 x SSC / 0,1 % SDS und zweimal für 30 Minuten mit 0,1 x SSC / 0,1 % SDS inkubiert. Anschließend werden die Filter bei RT kurz in Dig-Waschpuffer I (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl) gewaschen und danach für 30 Minuten in Dig-Waschpuffer I (s.o.) + 1 % Blocking Reagent, zur Vermeidung unspezifischer Antikörper-Bindungen, geschüttelt. Nach Zugabe von anti-Digoxigenin-AP-Antikörper (1:10000), welcher an Dig-11-dUTP bindet, erfolgt die erneute Inkubation für 30 Minuten. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, werden die Filter für zweimal 15 Minuten bei RT in Dig-Waschpuffer II (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 0,3 % Tween 20) geschüttelt. Zur Entwicklung der Filter werden diese zunächst für eine Minute mit CSPD, welches als Chemilumineszenz-Substrat in Anwesenheit eines anti-Digoxigenin-AP-Antikörper-Konjugates eine Chemilumineszenzreaktionen auslöst, und mit Dig-Waschpuffer III (20 mM TRIS/HCl; 100 mM NaCl) verdünnt (1:100) wird, versetzt. Im Anschluss werden die Filter von Pufferresten befreit und mit 800 µl des Chemilumineszenzsubstrates in einer Schlauchfolie (Diagonal, Münster) bei RT inkubiert. Zuletzt werden sie einem Röntgenfilm (Kodak Bio Max ML, Amersham Bioscience, Freiburg) für 30 Minuten exponiert und entwickelt.

2.5.7 Auswertung der Filme

Die entwickelten Röntgenfilme werden eingescannt (Image Scanner, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) und mit der array vision TM Software (Imaging Research Inc., Ontario, Kanada) ausgewertet. Dabei werden die Schwärzungswerte der spezifischen Signale auf die Signale der Housekeeping-Gene, die auf allen Filtern vorhanden sind, normalisiert, um eine Vergleichbarkeit der Filter zu garantieren. Außerdem wird der Grauwert des Hintergrundes subtrahiert.

Die von der Software bestimmten Schwärzungswerte liegen zwischen einem numerischen Wert von 0 (Wert des Hintergrundes) und 1 (durchschnittlicher Schwärzungswert der Housekeeping-Gene), je höher die Signalintensität, desto höher der numerische Wert.

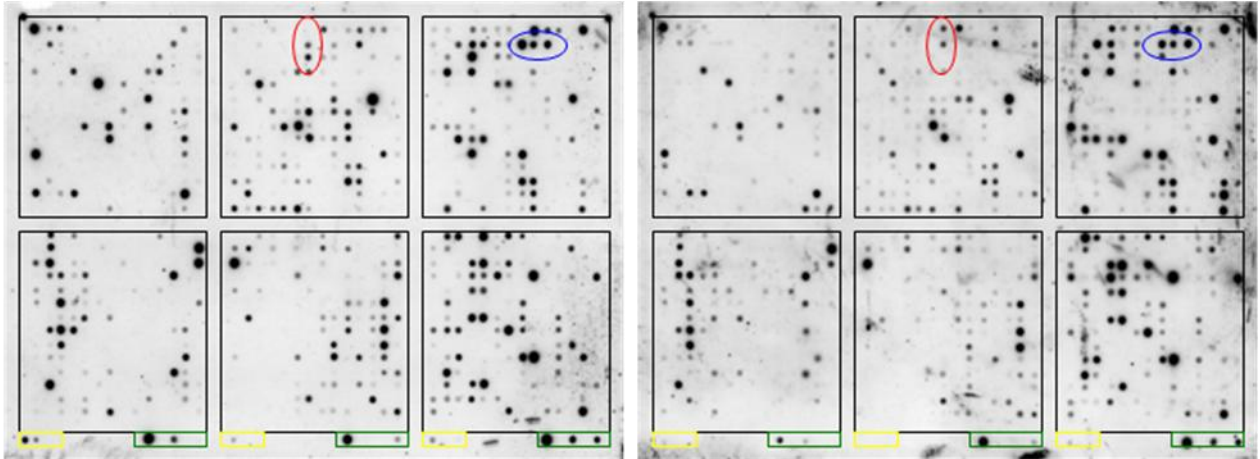


Abbildung 7: Repräsentatives Ergebnis eines Nylon Arrays (Mouse1.2) nach Hybridisierung mit cDNA. Zu sehen sind Filter einer CCR10^{wt}-Maus (links) und einer CCR10^{-/-}-Maus (rechts). Die Schwärzung einer Gensonde entspricht einem positiven Hybridisierungssignal. Innerhalb des roten Ovals ist ein Beispiel für unterschiedliche Genexpression dargestellt, innerhalb des blauen Ovals ein Beispiel für gleiche Genexpression. In den grünen Rechtecken befinden sich die neun Housekeeping-Gene, die Positiv-, bzw. Negativkontrollen befinden sich in den gelben Rechtecken. In den schwarz umrandeten Quadranten befinden sich jeweils 196 (14 x 14) Gensonden.

2.6 Statistische Auswertung

In der Genexpressionsanalyse wurden insgesamt 2352 Gene analysiert. Folgende Parameter wurden angewandt, um die differentiell regulierten Gene herauszufiltern: der Median des Genexpressionsniveaus jeder Gruppe, die Differenz der Mediane aller Gruppen, der Quotient der Mediane aller Gruppen und das Signifikanzniveau.

Im Folgenden wurden die Gene nach unten angegebenen Kriterien sortiert:

1. statistische Analyse der Daten mittels SPSS 11.0 (SPSS11.0 für Windows, SPSS Inc. Chicago, USA)
2. Signifikanz: $p \leq 0,05$
3. Differenz der Mediane: $(- 0,1) \geq x \leq (+ 0,1)$
4. Quotient der Mediane: $0,4 \geq x \leq 2,5$

Die Daten der Genexpressionsanalyse sind mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet. Die Gruppe der CCR10^{-/-}-Mäuse wird ebenfalls im Mann-Whitney-U-Test statistisch mit der Gruppe der CCR10^{wt}-Mäuse verglichen.

Die in den histomorphometrischen Analysen erhobenen Daten wurden mittels Varianzanalyse ANOVA (analysis of variance) und t-Test auf signifikante Unterschiede untersucht.

In den verschiedenen Untergruppen werden aus den Einzelwerten die Mittelwerte (MW, arithmetisches Mittel), die Standardabweichung (STABW) und der Standardfehler (SE) ermittelt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ wird als statistisch signifikant festgelegt.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Reagenzien.

20 x SSC = 3,0 M NaCl + 0,3 M NaCitrat	Invitrogen, Karlsruhe
5 x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
6 x Loading Dye	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Agarose (Seakem LE)	Biozym, Hess Oldendorf
Anti-Dig-AP-Antikörper-Konjugat 150 U (Dig Luminescent Detection Kit)	Roche, Mannheim
β -Actin-Primer (sense und antisense)	Metabion, Martinsried
Blocking Reagent (Dig Luminescent Detection Kit)	Roche, Mannheim
CFL5C-Primer	Metabion, Martinsried
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
CP2 Primer	Metabion, Martinsried
CSPD (Dig Luminescent Detection Kit)	Roche, Mannheim
dATP 100 mM	MBI Fermentas, St. Leon Rot
dCTP 100 mM	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Deoxyribonucleic acid Typ VIII from E. coli strain B	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DEPC = Diethyl Pyrocarbonate	Sigma Aldrich, Taufkirchen
dGTP 100 mM	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Dig Easy Hyb Granules	Roche, Mannheim
Digoxigenin-11-dUTP alkali labile 125 mmolar	Roche, Mannheim
DMSO	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DNA Pol Mix Expand long template PCR system (3,5 U/ μ l)	Roche, Mannheim
DNase I 100 u/ μ l	Roche, Mannheim
dNTP 10 mM	MBI Fermentas, St. Leon Rot
dNTP 2 mM	MBI Fermentas, St. Leon Rot
DTT = Dithiothreitol	Invitrogen, Karlsruhe
dTTP 100 mM	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Dynabeads Oligo(dT)25 (3,3 x 10 ⁸ beads/ml)	Dynal Biotech, Hamburg
EDTA 0,5 M	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Eisessig = Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Gene Ruler TM DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon Rot
H ₂ O ₂ 30 %	Merck KGaA, Darmstadt
HCl	Roth, Karlsruhe
Herring sperm DNA	Invitrogen, Karlsruhe
HRP-Substrat-Puffer (HRP Substrate Buffer, ChemMate TM)	Dako Cytomation, Hamburg
Igepal CA 630	Sigma Aldrich, Taufkirchen
KCl	Merck KGaA, Darmstadt
Ki67-Antikörper	BD Pharmingen, San Jose
KH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich, Taufkirchen
LiDS	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Lithium Chloride 8 M	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Lysispuffer	Dynal Biotech, Hamburg
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Qiagen, Hilden
Mineralöl	Sigma Aldrich, Taufkirchen
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
PCR Puffer 10 x	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Protease	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Puffer 1 Expand long template PCR system	Roche, Mannheim

MATERIAL UND METHODEN

Ringer-Lösung Delta Select	Delta Select GmbH, Pfullingen
Superscript II TM RNase H -Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Terminale Desoxynucleotidtransferase, TdT	MBI Fermentas, St. Leon Rot
TRIS	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trisacetat-EDTA Puffer, TAE	Roth, Karlsruhe
Tween = Polyethylen-sorbitan monolaureat	Sigma Aldrich, Taufkirchen

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Die in den Abbildungen 9 und 10 exemplarisch angeführten H.E.-gefärbten Schnitte veranschaulichen die histologischen Unterschiede zwischen den jeweils unoperierten CCR10^{wt}- und CCR10^{-/-}-Mäusen.

Zu sehen sind in den unten aufgeführten Abbildungen jeweils 2 Femoralarterien, welche Arterien des muskulösen Typs sind und histologisch wie folgt aufgebaut sind (Die Schichten der Arterienwand sind in Bild A jeweils mit kleinen Zahlen markiert, die nach der im Text beschriebenen Struktur in Klammern aufgeführt ist): beginnend luminal mit der dünnen Tunica intima (1) bestehend aus einschichtigem Endothel, gefolgt von der kollagenen Membrana elastica interna (2), der breiten muskulösen Tunica media (3), in der sich langgezogene kontraktile VSMCs und elastische Fasern befinden, der ebenfalls kollagenen Membrana elastica externa (4) und der bindegewebsreichen Tunica adventitia (5). In den Zellzwischenräumen befindet sich jeweils ECM.

Es fällt auf, dass bei den CCR10^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den CCR10^{wt}-Mäusen die Zellkerne (→) rundlicher und die VSMCs insgesamt (○) grobblasiger erscheinen. Aufgrund dieser Formveränderung erscheint auch die Tunica media insgesamt breiter. Des weiteren fällt auf, dass in der CCR10^{-/-}-Maus vermehrt ECM vorhanden ist und der Zellverband in der CCR10^{-/-}-Maus lockerer und strukturloser erscheint.

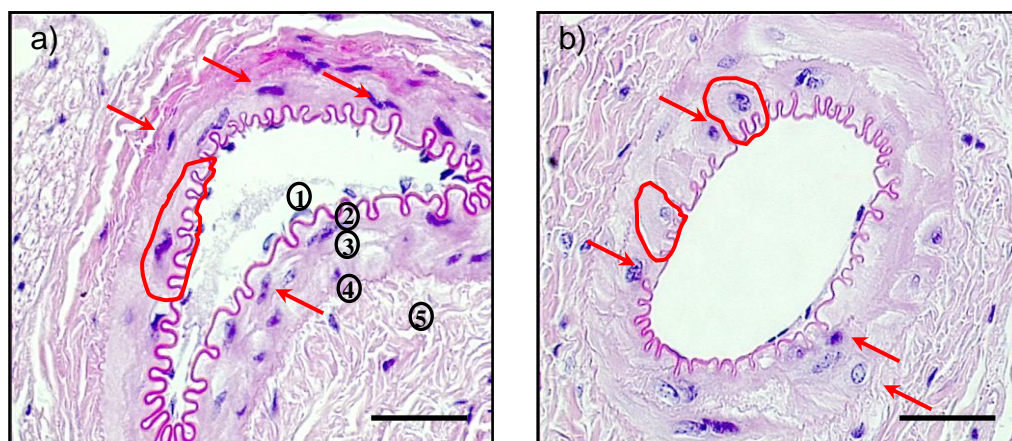


Abbildung 8: Histologische Schnitte unoperierter CCR10^{wt}- und CCR10^{-/-}-Mäuse. H.E.-Färbung.

scale bar = 100µm. → = Zellkern. ○ = Zellform.

a) CCR10^{wt}-Maus: Femoralarterie; Vergrößerung 40-fach

b) CCR10^{-/-}-Maus: Femoralarterie; Vergrößerung 40-fach

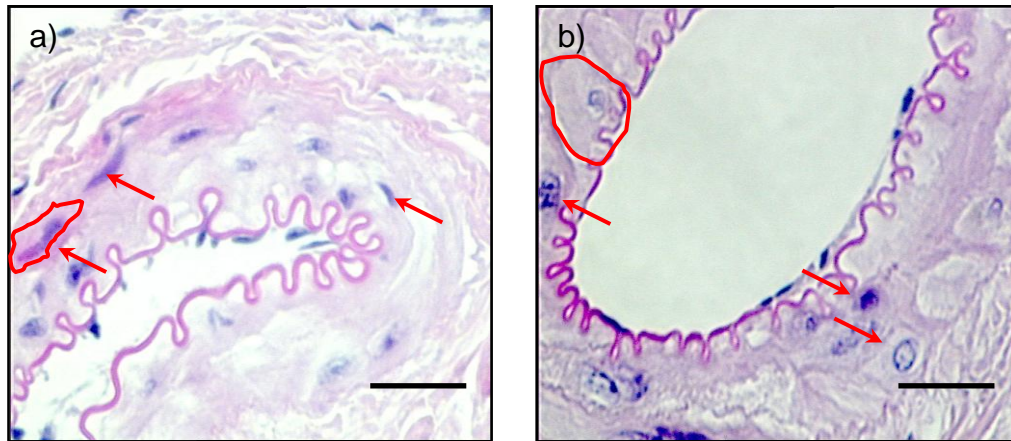


Abbildung 9: Histologische Schnitte unoperierter CCR10^{wt}- und CCR10^{-/-}-Mäuse. H.E.-Färbung. scale bar = 100µm. → = Zellkern. ○ = Zellform.
a) CCR10^{wt}-Maus: Femoralarterie; Vergrößerung 63-fach
b) CCR10^{-/-}-Maus: Femoralarterie; Vergrößerung 63-fach

3.2 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

3.2.1 Differenzielle Genexpression

Nachdem die H.-E. Färbungen der Femoralarterien phänotypische Unterschiede zwischen der CCR10^{wt}- und der CCR10^{-/-}-Maus zeigen, soll nun die Genexpressionsanalyse Aufschluss darüber geben, wo diese Differenzen ihren genetischen Ursprung haben.

Die Genexpressionsanalyse zur Differenzierung der CCR10^{-/-}-Maus gegenüber der CCR10^{wt}-Maus auf genetischer Ebene wurde an jeweils zwölf Mäusen (n=12) vor Verletzung der Femoralarterien durchgeführt, analysiert wurden hierbei 2352 Gene. Die Sortierung der erhaltenen Ergebnisse mittels statistischer Analyse durch SPSS 11.0 und darauffolgender Einteilung anhand der Signifikanz ($p \leq 0,05$), der Differenz der Mediane [$(- 0,1) \geq x \leq (+ 0,1)$] und dem Quotienten der Mediane ($0,4 \geq x \leq 2,5$) ergab 39 in den beiden Mäusen signifikant differentiell regulierte Gene. Dabei waren 29 Gene in der CCR10^{-/-}-Maus herunterreguliert, 10 Gene waren hochreguliert. Die Expression der Housekeeping-Gene war konstant.

3.2.2 Einteilung der differentiell regulierten Gene

Die Einteilung der 39 differentiell regulierten Gene erfolgt in 4 funktionelle Gruppen und eine Gruppe der sonstigen Gene:

- 1) Inflammation
- 2) Apoptose/Proliferation
- 3) ECM
- 4) Differenzierung

5) Sonstige

Abbildung 10 demonstriert den prozentualen Anteil der differentiell regulierten Gene.

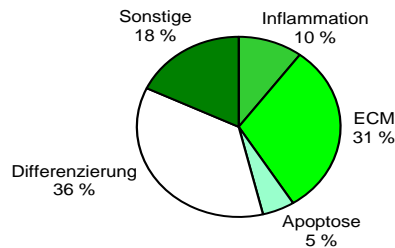


Abbildung 10: Einteilung differentiell regulierter Gene.

Es zeigt sich, dass die Differenzierungs- und ECM-assoziierten Gene mit 36 %, bzw. 31 % den größten Anteil an den differentiell regulierten Genen darstellen.

Sortiert man die Gruppen nach hoch-, bzw. herunterregulierten Genen, so fällt auf, dass apoptotische und Differenzierungs-assoziierte Gene zu gleichen Teilen hoch-, bzw. herunterreguliert werden. In den Gruppen der inflammatorischen und der ECM-assoziierten Gene überwiegt der Anteil herunterregulierter Gene. Dies spricht für weniger inflammatorisches und ECM-bezogenes Geschehen in der CCR10^{-/-}-Maus.

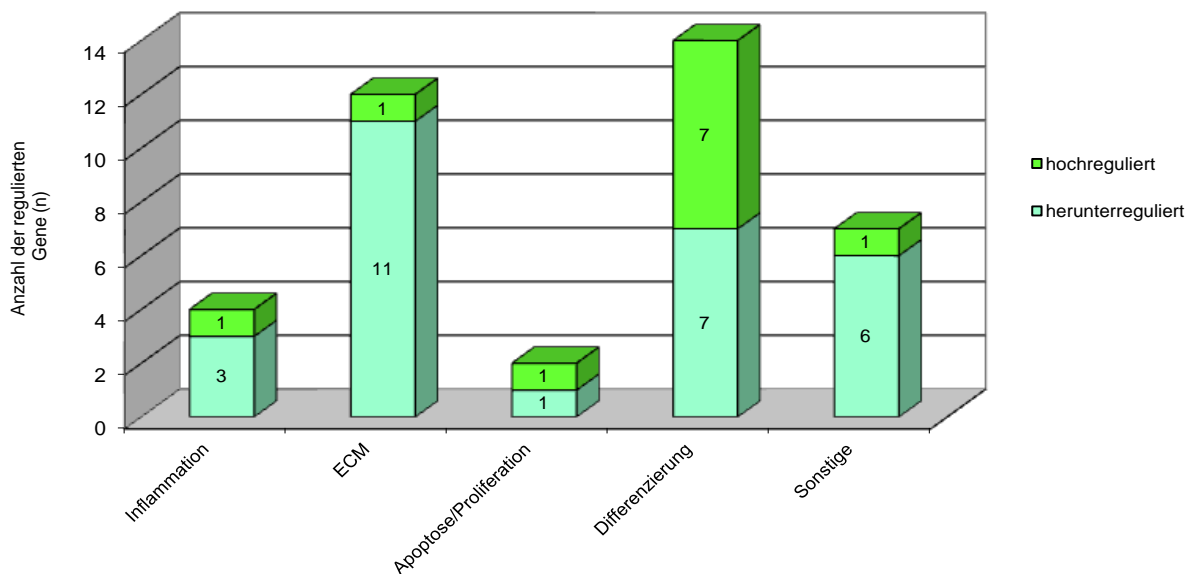


Abbildung 11: Unterteilung der funktionellen Gruppen nach hoch-, bzw. herunterregulierten Genen

3.2.3 Inflammations-assoziierte Gene

Zur Gruppe der Inflammations-assoziierten Gene werden alle Gene gezählt, die mit der Entstehung oder Verhinderung einer inflammatorischen Reaktion in Zusammenhang stehen. In deren Rahmen kommt es durch auslösende Stimuli zu Aktivitätsänderungen in inflammations-assoziierten Signalwegen und zur Änderung des Expressionsmusters, wofür wiederum inflammations-assoziierte Transkriptionsfaktoren verantwortlich sind.

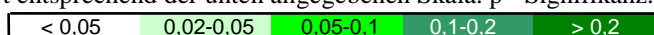
Ein wichtiges differentiell reguliertes Gen ist Thrombospondin-1 (TSP-1), ein Mitglied der Gruppe der proinflammatorischen, gefäßspezifischen Akute-Phase-Proteine⁴⁷. Gebildet wird es u.a. von aktivierten Thrombozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Makrophagen und Fibroblasten. Dieses Gen fördert zum einen die Chemotaxis, Proliferation und Migration glatter Muskelzellen, und somit die Neointimaformation, zum anderen spielt es eine wichtige Rolle in der Zell-Zell, sowie der Zell-Matrix Interaktion^{34; 47; 60; 104}. Interessant ist zudem die Beobachtung gehäufte Akkumulation dieses Gens in atherosklerotischen und restenotischen Gefäßen⁶⁸. Die mRNA-Expression dieses Gens ist in der CCR10^{-/-}-Maus im Vergleich zur CCR10^{wt}-Maus herunterreguliert.

Ein im Gegensatz zum TSP-1 antiinflammatorische Gen ist das alpha 1 microglobulin⁵⁷. Es inhibiert zum einen die Sekretion von TNF- α durch die Monozyten, zum anderen inhibiert es die Chemotaxis von Neutrophilen^{54; 57}. Des weiteren hat es anti-metastatische Eigenschaften⁴³. Ergebnis der durchgeführten Genexpressionsanalyse war eine Hochregulierung der mRNA-Expression in der CCR10^{-/-}-Maus verglichen mit der mRNA-Expression in der CCR10^{wt}-Maus.

Tabelle 2: Regulation Inflammations-assoziiertes Gene (n=4).

INFLAMMATION	p	MW CCR10 ^{wt}	MW CCR10 ^{-/-}
thrombospondin 1	0,014		
pore forming protein	0,037		
alpha 1 microglobulin/bikunin	0,037		
homeo box A7	0,042		

Das Expressionsmuster jedes Gens ist in einem horizontalem Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels normalisiert auf das mRNA-Expressionsniveau der Housekeeping Gene, dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala. p= Signifikanz.



3.2.4 Apoptose/Proliferations-assoziierte Gene

Der Begriff Apoptose bezeichnet den durch die Zelle selber eingeleiteten programmierten Zelltod. Funktion apoptotischer Gene ist es diesen durchzuführen und zu kontrollieren, sodass die betroffene Zelle ohne Beschädigung des Nachbargewebes zugrunde geht. Daneben werden dieser Gruppe auch Gene zugeteilt, die die Apoptose hemmen. In engem Zusammenhang mit der Apoptose ist die Proliferation zu sehen. Finden vermehrt proliferative

Vorgänge statt, kommt es im weiteren Verlauf zu einer erhöhten Apoptoserate als Indiz für den gesteigerten Zellumsatz.

Das hier aufgeführte secreted apoptosis-related protein 1 (SARP-1) ist ein Apoptose hemmendes Protein. Vermittelt die Hemmung der Apoptose in diesem Fall über die Aktivierung von NF-κB oder die Suppression der Janus-Kinase^{45; 46; 48}. In der CCR10^{-/-}-Maus ist die mRNA-Expression dieses Gens im Vergleich zu CCR10^{wt}-Maus herunterreguliert.

Ebenfalls in der Gruppe der apoptotischen, bzw. proliferativen Gene befindet sich das bone morphogenetic protein 4 (BMP4), ein proapoptisches Gen, welches Mitglied der transforming growth factor-beta (TGF-β) Superfamilie ist^{33; 51}. Interessant sind die Funktionen von BMP4 in Bezug auf die Neointima: So belegen verschiedene Arbeiten, dass BMP4, dessen Produktion in Endothelzellen durch hohe Scherkräfte in Blutgefäßen stimuliert wird, sowohl die PDGF-stimulierte VSMC-Proliferation und deren Migration hemmt, als auch den Untergang von VSMCs fördert. Resultat dieser beiden Ereignisse ist eine verminderte Neointimaformation^{15; 33}. In der CCR10^{-/-}-Maus wird, verglichen mit der CCR10^{wt}-Maus, vermehrt mRNA des BMP4 exprimiert.

Tabelle 3: Regulation Apoptose/Proliferations-assoziiierter Gene (n=2).

APOPTOSE/PROLIFERATION	P	MW CCR10 ^{wt}	MW CCR10 ^{-/-}
Secreted apoptosis-related protein 1 SARP-1	0,011	0,2678	
bone morphogenetic protein 4	0,021	0,0323	0,1551

Das Expressionsmuster jedes Gens ist in einem horizontalem Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels normalisiert auf das mRNA-Expressionsniveau der Housekeeping Gene, dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala. p= Signifikanz.



3.2.5 Extrazellulärmatrix-assoziierte Gene

Die ECM ist der Anteil an Bindegewebe, der sich zwischen den Zellen im Interzellularraum befindet. Vornehmlich zwei Komponenten bestimmen die Beschaffenheit der ECM: Zum einen Fasern (kollagene, elastische, retikuläre), zum anderen Proteoglykane und Glykosaminoglykane. Gene dieser Gruppe sind nun entweder Bestandteile der ECM oder spielen eine wichtige Rolle in Bezug auf die Funktionen der ECM, die beispielsweise in der Formgebung und in der Bestimmung der Elastizität von Gewebe liegen, aber auch in der Signaltransduktion innerhalb des Gewebes und den Prozessen der Wundheilung.

Hervorzuheben ist hierbei zunächst einmal die Matrix-Metalloproteinase 14 (MMP14), deren Expression durch Gewebeschäden hochreguliert wird, und somit beispielsweise in atherosklerotisch geschädigten Gefäßen sehr hoch ist. Im Rahmen ihrer pro-inflammatorischen Wirkung reguliert MMP14 die Endothelzellproliferation und -migration, sowie die Invasion der Arterienwände und die Neointimaformation durch glatte

ERGEBNISSE

Gefäßmuskulatur durch die Proteolyse der ECM. Die Invasion der VSMCs wird so erleichtert^{19; 23; 67; 101}. Daneben hat MMP14 pro-angiogenetische Funktionen¹⁴. Die mRNA-Expression der MMP14 ist in der CCR10^{-/-}-Maus im Vergleich zur CCR10^{wt}-Maus herunterreguliert.

Dieser Gruppe zugehörig ist auch das Desmoglein 1, ein Mitglied der Familie der Desmogleine, einer Subspezies der Cadherine. Sie spielen eine entscheidende Rolle als Calcium-bindende transmembranäre Bestandteile von Desmosomen, die ihrerseits wiederum verantwortlich sind für Zell-Zell-Kontakte^{25; 62}. Zudem beschreiben DUSEK et al.²⁵ Desmoglein als einen Regulator der Apoptose, der u.a. Zielobjekt von Caspase-3 und Matrix Metalloproteinasen während apoptotischer Vorgänge ist. In CCR10^{-/-}-Mäusen ist die mRNA-Expression dieser Proteine, stellt man sie der CCR10^{wt}-Maus gegenüber, herunterreguliert.

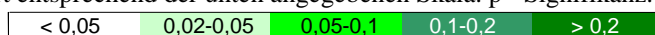
Ein ebenfalls adhäsiv wirkendes Gen, dessen mRNA-Expression in der CCR10^{-/-}-Maus im Vergleich zur CCR10^{wt}-Maus herunterreguliert ist, ist mucosal vascular addressin adhesion molecule (MADCAM-1). Funktion dieses Gens, das ein Mitglied der Immunglobulin-Familie ist, ist die Regulierung der Chemotaxis und Diapedese von T-Zellen in entzündetes Gewebe. Dabei interagiert MADCAM-1 beispielsweise mit dem auf der Zelloberfläche von Leukozyten exprimierten Integrinen².

Ein weiteres ECM-assoziiertes Gen ist das Calpastatin, Inhibitor von Calpain (= Calcium-activated cysteine protease)⁷⁷. Das Calpain/Calpastatin-System ist beteiligt an zahlreichen Membran-Fusions-Prozessen. Außerdem ist bekannt, dass es die Expressionsmuster von Genen beeinflusst, die Strukturproteine codieren³¹. Die Genexpressionsanalyse ergab, dass die mRNA-Expression des Calpastatin in der CCR10^{-/-}-Maus, verglichen mit der CCR10^{wt}-Maus, herunterreguliert ist.

Tabelle 4: Regulation Extrazellulärmatrix-assoziiierter Gene (n=12).

ECM	p	MW CCR10 ^{wt}	MW CCR10 ^{-/-}
serine protease inhibitor 2.4	0,037		
procollagen, type IV, alpha 3	0,005		
desmoglein 1	0,037		
mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1	0,037		
matrilin 1, cartilage matrix protein 1	0,037		
tyrosine kinase receptor 1	0,049		
calpastatin	0,006		
double C2, alpha	0,037		
double C2, beta	0,037		
matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	0,005		
alpha-2-HS-glycoprotein	0,037		
ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1	0,05		

Das Expressionsmuster jedes Gens ist in einem horizontalem Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels normalisiert auf das mRNA-Expressionsniveau der Housekeeping Gene, dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala. p= Signifikanz.



3.2.6 Differenzierungs-assoziierte Gene

Zelldifferenzierung spielt in vielerlei Hinsicht eine wichtige Rolle, u.a. im Rahmen der Wundheilung, bei der sich aus pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark gewebespezifische Zellen entwickeln, die die Wunde verheilen lassen. Eine Reihe von Mediatoren, beispielsweise Transkriptionsfaktoren, regulieren die Zelldifferenzierung.

Hervorzuheben aus dieser Gruppierung von Differenzierungs-Mediatoren ist das Calcium binding protein 11 (Calgizzarin), ein Mitglied der großen Familie der EF-hand Calcium bindenden Proteine⁵⁰. Das Calgizzarin inhibiert in Keratinozyten DNA-Synthese und wirkt wachstums- und differenzierungshemmend. Trigger für die Inhibition sind wahlweise Calcium und transforming growth factor beta (TGF β)^{50; 56; 70}. Des Weiteren ist Calgizzarin ein Apoptose inhibierendes Gen³⁷. In der CCR10^{-/-}-Maus ist die Expression der Calgizzarin-mRNA im Vergleich zur Expression in der CCR10^{wt}-Maus hochreguliert.

Ein differenzierungsregulierender, DNA-bindender Transkriptionsfaktor ist das Gen homeobox A7 (HOXA7). LA CELLE et al.⁴⁴ beschrieben einen differenzierungshemmenden Effekt des Gens anhand von Versuchen an Keratinozyten. Im Gegensatz hierzu beschreiben eine Reihe von Autoren differenzierungsfördernde Effekte von HOXA7 im Rahmen der normalen Hämatopoese, insbesondere bei T-Zellen, und der pathologischen, malignen Hämatopoese, in Form bestimmter Leukämien^{53; 86}. Ergebnis der hier durchgeführten Genexpressionsanalyse war eine Hochregulierung der mRNA-Expression von HOXA7 in der CCR10^{-/-}-Maus im Vergleich zur CCR10^{wt}-Maus.

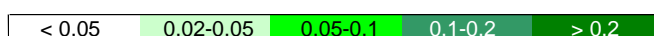
Ein weiteres Gen dieser Kategorie ist aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), welches die Transkription differenzierungs- und proliferations-assoziiierter Gene reguliert⁴⁰. In diesem Rahmen und im Rahmen von Tumorstadium dimerisiert ARNT mit Hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1alpha) und wirkt wachstumsfördernd^{21; 50}. In der CCR10^{-/-}-Maus wird die mRNA-Expression dieses Gens, stellt man sie der CCR10^{wt}-Maus gegenüber, herunterreguliert.

Zuletzt soll die Bedeutung des insulin-like growth factor binding proteins 2 (IGFBP-2) erläutert werden. Die mRNA dieses Proteins, welches u.a. in glatten Gefäßmuskelzellen vorkommt, ist in der CCR10^{-/-}-Maus im Vergleich zur CCR10^{wt}-Maus hochreguliert. In der Literatur wird IGFBP-2 durch die Hemmung des insulin-like growth factors (IGF) als wachstumshemmendes Protein beschrieben^{52; 66}. Daneben spielt es eine Rolle in apoptotischen Prozessen, bei denen es durch das Tumorsuppressorprotein p53 aktiviert wird²⁸. Stimuliert wird die Expression des IGFBP-2 u.a. durch epidermal growth factor (EGF) und relaxin⁸⁷.

Tabelle 5: Regulation Differenzierungs-assoziiierter Gene (n=14).

DIFFERENZIERUNG	p	MW CCR10 ^{wt}	MW CCR10 ^{-/-}
cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2 (CKS-2).	0,036		
tripartite motif protein 24	0,037		
calcium binding protein A11 (calgizzarin)	0,011		
homeo box A7	0,042		
TEA domain family member 1	0,045		
serine/threonine kinase 18	0,037		
insulin-like growth factor binding protein 2	0,009		
roundabout homolog 1 (Drosophila)	0,037		
thymine DNA glycosylase	0,015		
tumor-suppressing subchromosomal transferable fragment 3	0,037		
vesicle amine transport protein 1 homolog (T californica)	0,021		
aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	0,05		
heme oxygenase (decycling) 2	0,037		
SRY-box containing gene 10	0,037		

Das Expressionsmuster jedes Genes ist in einem horizontalem Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels normalisiert auf das mRNA-Expressionsniveau der Housekeeping Gene, dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala. p= Signifikanz.



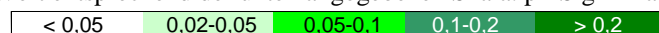
3.2.7 Sonstige Gene

In diese Kategorie fallen Gene wie olfactory receptor 1 oder thyroglobulin, die keiner der bisher genannten Gruppen zuzuordnen sind, und eine so heterogene Gruppe bilden, dass es nicht sinnvoll erscheint, diese Gruppe weiter zu unterteilen.

Tabelle 6: Regulation Sonstiger Gene (n=7).

SONSTIGE	p	MW CCR10 ^{wt}	MW CCR10 ^{-/-}
major intrinsic protein of eye lens fiber	0,014		
ameloblastin	0,014		
estrogen receptor 2 (beta)	0,037		
opioid receptor, kappa 1	0,037		
olfactory receptor 1	0,037		
thyroglobulin	0,037		
D site albumin promoter binding protein	0,014		

Das Expressionsmuster jedes Genes ist in einem horizontalem Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels normalisiert auf das mRNA-Expressionsniveau der Housekeeping Gene, dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala. p= Signifikanz.



3.3 Ergebnisse der histomorphometrischen Untersuchungen

Der folgende Abschnitt zeigt die Ergebnisse der histomorphometrischen Untersuchungen, die in Bezug auf die Neointimafläche, den Gefäßlumenverlust, die Mediafläche und die Intima/Media-Ratio 14 Tage nach Gefäßverletzung gemacht wurden. Durchgeführt wurden sie an jeweils acht Mäusegefäßen (n=8), ausgewertet wurden jeweils 10 Schnittebenen.

3.3.1 Vergleich der Neointimaflächen

Vergleicht man die Neointimaflächen 14 Tage nach Gefäßverletzung zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der CCR10^{wt}-Maus (Mittelwert: 0,018 mm²) und der

CCR10^{-/-}-Maus (Mittelwert: 0,022 mm²). Das Fehlen des CCR10-Rezeptors hat also keine Auswirkung auf das Ausmaß der Neointimafläche nach Gefäßverletzung.

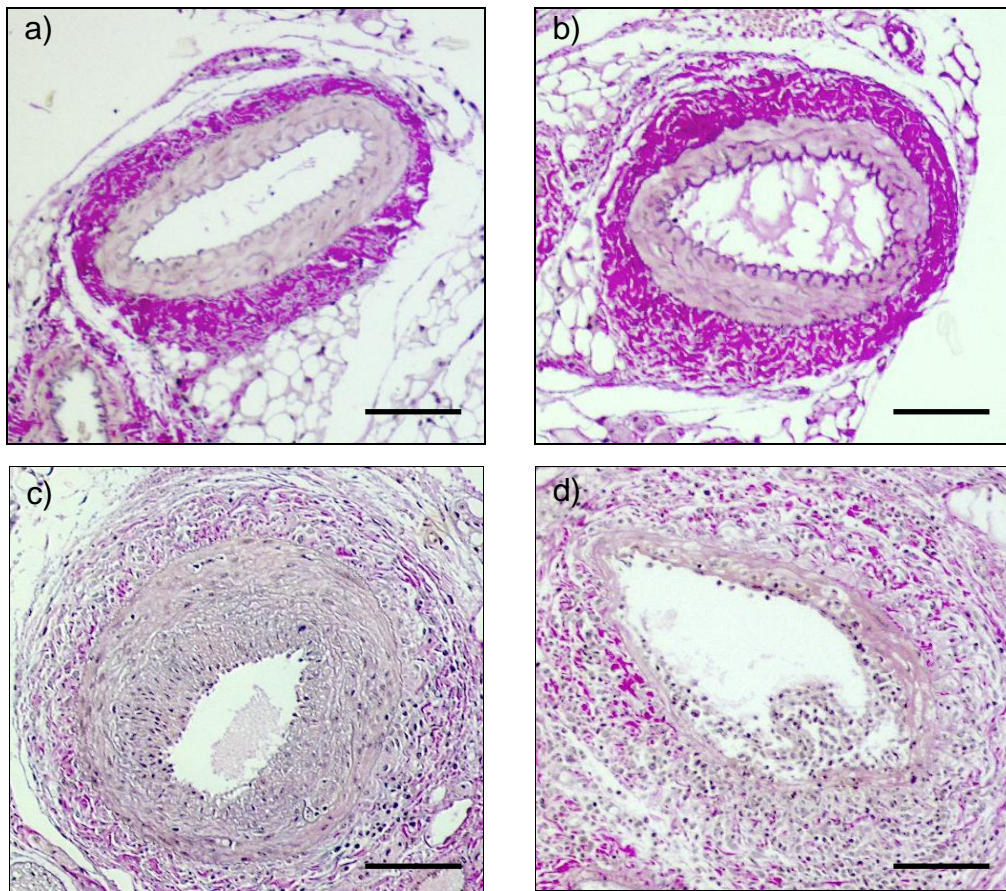


Abbildung 12: Histologische Schnitte CCR10^{wt}- und CCR10^{-/-}-Mäuse 14 Tage nach Verletzung. H.E. Färbung. scale bar = 100µm. Vergrößerung 40-fach.

- a) CCR10^{wt}-Maus: Femoralarterie vor Verletzung b) CCR10^{-/-}-Maus: Femoralarterie vor Verletzung
 c) CCR10^{wt}-Maus: Femoralarterie 14d nach Verletzung d) CCR10^{-/-}-Maus: Femoralarterie 14d nach Verletzung

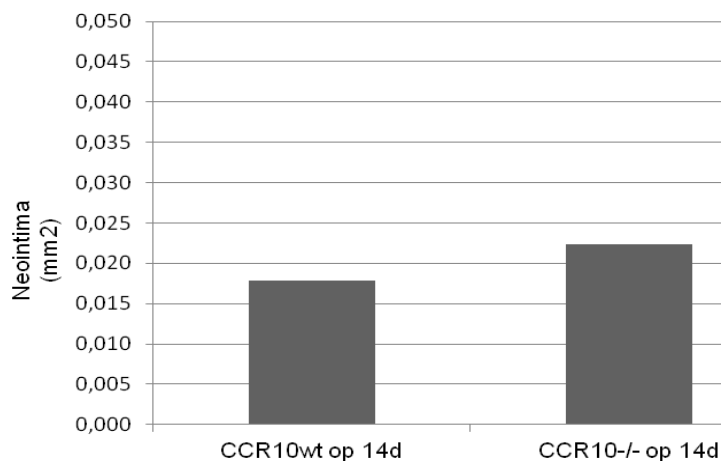


Abbildung 13: Neointimafläche der CCR10^{wt}- und CCR10^{-/-}-Maus im Vergleich.

3.3.2 Vergleich der Gefäßlumenverluste

Die erhobenen Daten bezüglich des durch Gefäßverletzung herbeigeführten Gefäßlumenverlustes zeigen sowohl in der CCR10^{wt}-Maus (Mittelwert: 60,899 %), als auch in der CCR10^{-/-}-Maus (Mittelwert: 59,845 %) einen circa 60%igen Gefäßlumenverlust 14 Tage nach Verletzung der Femoralarterien. Passend zu den Daten bezüglich der Neointimafläche zeigt sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Mausstämmen.

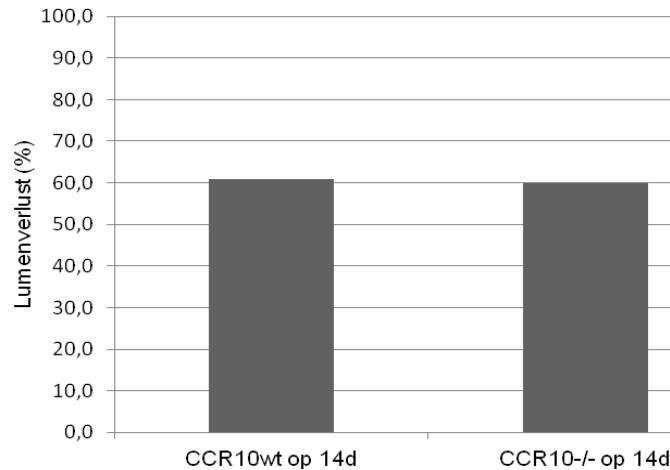


Abbildung 14: Gefäßlumenverlust der CCR10^{wt}- und CCR10^{-/-}-Maus im Vergleich.

3.3.3 Vergleich der Mediaflächen

Vergleicht man jeweils die Flächen der Tunica media der CCR10^{wt}-Maus und der CCR10^{-/-}-Maus 14 Tage nach Verletzung, sieht man, dass die Flächenmaße der Media der CCR10^{wt}-Maus (Mittelwert: 0,029 mm²) und der CCR10^{-/-}-Maus (Mittelwert: 0,031 mm²) keinen signifikanten Unterschied aufweisen.

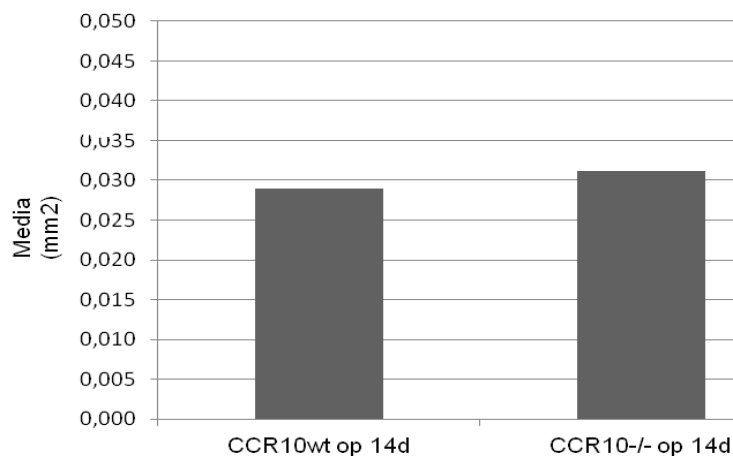


Abbildung 15: Mediafläche der CCR10^{wt}- und CCR10^{-/-}-Maus im Vergleich.

3.3.4 Vergleich der Intima/Media-Ratio

Wie in den bereits angeführten histomorphometrischen Analysen zeigt sich auch hinsichtlich der Intima/Media-Ratio kein signifikanter Unterschied zwischen der CCR10^{wt}-Maus (Mittelwert: 0,692) und der CCR10^{-/-}-Maus (Mittelwert: 0,705)

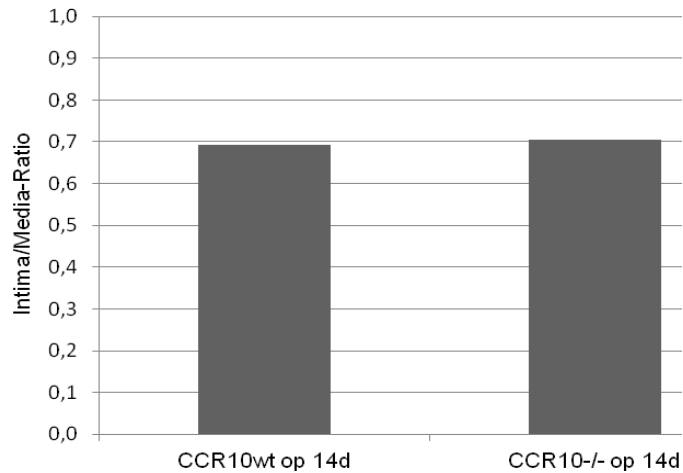


Abbildung 16: Intima/Media-Ratio der CCR10^{wt}- und CCR10^{-/-}-Maus im Vergleich.

In Anbetracht der Ergebnisse der histomorphometrischen Untersuchungen lässt sich zusammenfassend sagen, dass die CCR10-Defizienz bezüglich der Neointimafläche, des Gefäßlumenverlustes, der Mediafläche, sowie der Intima/Media-Ratio 14 Tage nach Gefäßverletzung keine Auswirkung hat.

4 DISKUSSION

Die PTCA mit Stentimplantation ist nach dem heutigen Stand der Dinge die Therapie der Wahl bei der Behandlung der KHK, lediglich symptomatische Mehrgefäßerkrankungen und komplexe Koronarstenosen erfordern die chirurgische Bypassversorgung^{9; 75}. Ein großer medizinischer Fortschritt war die Einführung von BMS und DES, die die Restenoserate durch Inhibierung des arteriellen elastischen Rückstoßes und des vaskulären negativen Remodelings signifikant senken konnten^{38; 78; 81; 93}. Einzig das Problem der Neointimabildung sowie das Problem der späten Stentthrombose als Spätkomplikation der DES konnten bisher nicht hinreichend gelöst werden. Ein Lösungsansatz könnten neue medikamentöse Beschichtungen der DES sein, sowohl Rapamycin, ein potentes Immunsuppressivum, als auch Paclitaxel, ein antineoplastisches Agens, konnten die Restenoserate bereits erfolgreich vermindern, wobei Rapamycin die Neointimaformation stärker inhibiert, und weniger späte Stentthrombosen hervorruft³⁸.

Für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist die Identifizierung aller an der Neointimaformation beteiligten Signaltransduktionsmechanismen besonders wichtig. Ein Angriffspunkt könnten Chemokine und deren Rezeptoren sein, einige Chemokinrezeptoren (z.B. CXCR4, CCR1, CCR2), sowie zahlreiche Chemokine (z.B. SDF-1 α , MCP-1) sind bereits als wichtige Bestandteile der Neointimaformation beschrieben worden^{72;74; 92}. Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist CCR5, welches auf der Zelloberfläche von Th1-Zellen exprimiert wird. Durch Bindung der Liganden [CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) und CCL8 (MCP-2)] wird die Rekrutierung von Makrophagen und T-Zellen ausgelöst. Das CCR5-System verbindet somit die Th1-Zell-vermittelte zelluläre Immunantwort und die nach Gefäßverletzung ablaufenden vasoproliferativen Pathomechanismen, und spielt daher eine entscheidende Rolle bezüglich der Formation von Neointima^{22; 100; 102; 105}.

Für das CCR10-System mit seinen Liganden CCL27 und CCL28 konnte bis jetzt lediglich eine entscheidende Rolle in der Rekrutierung von Entzündungszellen in der Haut nachgewiesen werden. Allerdings geben verschiedene Daten aus der Literatur, beispielsweise die Beteiligung des CCR10-Systems an der T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion oder an der Metastasierung maligner Tumoren, Anlass, das CCR10-System in Zusammenhang mit Gefäßverletzung und Neointimaformation zu bringen^{29; 80}. Schließlich sind vor allem T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktionen im Rahmen der Pathogenese der Neointimaformation von wesentlicher Bedeutung. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle des CCR10-Systems in

Bezug auf die Gefäßverletzung als Auslöser vasoproliferativer Pathomechanismen zu analysieren.

4.1 CCR10-Defizienz führt zu einem veränderten VSMC-Phänotyp

Die histologischen Untersuchungen der Femoralarterien vor Gefäßverletzung zeigen einen von der CCR10^{wt}-Maus differierenden CCR10^{-/-}-VSMC-Phänotyp. Auffällig in den histologischen Analysen der CCR10^{-/-}-Maus ist die rundere Zellmorphologie der glatten Gefäßmuskelzellen gegenüber der typischerweise spindelförmigen Morphologie. Dazu kommt, dass auch die Zellkerne der glatten Muskelzellen sich durch ihre runde und blasige Struktur eindeutig von den normalen langgestreckten Zellkernen unterscheiden. Auch ist eine vermehrte Ansammlung von ECM zu beobachten. Dadurch erscheint die Tunica media insgesamt ungeordneter und strukturloser.

Eine daraufhin durchgeführte Genexpressionsanalyse liefert, passend zu den beschriebenen Unterschieden bezüglich der Morphologie, Erkenntnisse, welche auf einen Einfluss des CCR10-Systems bezüglich der Strukturunterschiede in der Tunica Media hindeuten. Es zeigen sich 39 in der CCR10^{wt}- und CCR10^{-/-}-Maus signifikant differenziell regulierte Gene, von denen in der CCR10^{-/-}-Maus 29 herunterreguliert sind. Nach Unterteilung der Gene in Cluster stellt sich heraus, dass v.a. die Differenzierungs- (36 %), sowie ECM-assoziierten Gene (31 %) verschieden exprimiert werden.

Betrachtet man die Gruppe der ECM-assoziierten Gene genauer, findet man Belege für den in der Histologie lockerer und strukturloser erscheinenden Gefäßmuskelzellverband in der CCR10^{-/-}-Maus. So sind beispielsweise Desmoglein-1, ein Mitglied der für den Zusammenhalt von Zellverbänden verantwortlichen Cadherin-Familie, MADCAM-1, verantwortlich für die Endothelzelladhäsion, sowie Calpastatin, ein Regulator der Expression von Strukturproteinen und Teil des für Membran-Fusion verantwortlichen Calpain/Calpastatin-Systems, allesamt Gene, die für die Zelladhäsion zuständig sind, in der CCR10^{-/-}-Maus teils deutlich herunterreguliert. Ebenso herunterreguliert ist MMP14, durch die Proteolyse der ECM reguliert dieses Gen die Endothelzellproliferation und -migration, sowie die Invasion der Arterienwände und die Neointimaformation durch glatte Gefäßmuskulatur.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse unterstreichen aufgrund der prozentual hohen Veränderungen bezüglich der differentiellen Expression, dass die Schwerpunkte Differenzierung und ECM eine wichtige Rolle im CCR10-System spielen. Es ist insbesondere auch ein Zusammenhang zwischen der CCR10-Defizienz und der Adhäsion zu konstatieren,

welcher sich in vermindert exprimierten adhäsiv wirkenden Genen und einem gelockerten Zellverband bei CCR10^{-/-}-Mäusen widerspiegelt.

4.2 CCR10-Defizienz hat keinen Einfluss auf das Ausmaß der Neointimaformation nach Gefäßverletzung

In der Neointimaproliferation spielen Chemokin-Rezeptor-Systeme eine entscheidende Rolle, da sie wichtige Prozesse wie Inflammation, Reendothelialisierung, Proliferation und Rekrutierung von Vorläuferzellen nach der Gefäßverletzung organisieren und damit das Ausmaß der Neointimaformation bestimmen^{32; 74; 90}. Nachdem bereits einige Chemokinrezeptorsysteme als wichtige Komponenten der Neointimaformation in der Literatur beschrieben worden sind, ist es das Ziel dieser Arbeit den Einfluss des CCR10-Systems auf die Neointimaformation zu untersuchen. Erste Hinweise auf einen möglichen Einfluss liefert die Genexpressionsanalyse bei unverletzten Mausgefäßen, die belegen konnte, dass vor allem differenzierungs-, sowie ECM-assoziierte Gene, beide wesentlich beteiligt an der Neointimaformation, eine differentielle Expression zeigen.

Interessant in Bezug auf die Differenzierung von VSMC im Rahmen der Bildung von Neointima auch eine Arbeit von KAWAI-KOWASE et al.³⁹, die belegt, dass die glatten Muskelzellen der humanen Neointima in einem dedifferenzierten, synthetisierenden und proliferierenden Phänotyp vorliegen, der große Mengen an ECM freisetzt, während die glatten Muskelzellen gesunder Arterien einem differenzierten, ruhenden, kontraktiven Phänotyp entsprechen.

Zur Charakterisierung des Einflusses des CCR10-Systems werden die Gefäße 14 Tage nach Verletzung der Arterien histomorphometrisch untersucht. Analysiert werden hierbei die Flächen der Neointima, sowie der Media, zudem der Lumenverlust nach Gefäßverletzung, sowie die Intima/Media-Ratio, die die Neointima in ein Verhältnis zur Gefäßgröße setzt und so zur Quantifizierung der Neointimabildung verwendet wird.

Die Auswertung der gewonnenen histomorphometrischen Untersuchungsergebnisse liefert die Erkenntnis, dass CCR10^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu CCR10^{wt}-Mäusen keine Unterschiede bezüglich der Neointimafläche, der Mediafläche, sowie des Lumenverlustes und der Intima-Media-Ratio aufweisen. Es lässt sich schlussfolgernd sagen, dass gemäß der erhobenen Daten die CCR10-Defizienz keinen Einfluss auf das Ausmaß der Neointimaformation nach Gefäßverletzung zu haben scheint.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Nach wie vor gehören die KHK und ihre Manifestationsformen zu den weltweit führenden Todesursachen²⁰. Methode der ersten Wahl zur Therapie der KHK ist die PTCA^{9; 75}. Ein schwerwiegendes Problem dieses Therapieverfahrens ist die Restenose, die zu einer verringerten Erfolgsrate der interventionellen Behandlung führt. Durch die Einführung von BMS wurde die Restenoserate bereits beachtlich gesenkt, große Erfolge zur weiteren Senkung der Restenoserate wurden durch die medikamentöse Beschichtung der Stents erzielt^{38; 81}.

Ziel dieser Dissertation ist die Untersuchung der Bedeutung des CCR10-Systems in Bezug auf die Neointimaformation. Diese tritt als Folge der durch die PTCA herbeigeführten Gefäßverletzung auf und ist wesentliche Ursache der Restenose. Ein besonderes Augenmerk soll dabei auf die Inflammationsvorgänge gelegt werden, da diese in der Pathogenese der Neointimaformation eine Schlüsselrolle einnehmen. Besonders die Chemokin-Rezeptor-Interaktionen sind von herausragender Bedeutung für die Rekrutierung von Entzündungszellen, und somit für den Heilungsprozess nach der Gefäßverletzung^{74; 90}. Der Chemokinrezeptor CCR10 und seine beiden Liganden CCL27 und CCL28 stellen ein solches Chemokinsystem dar, welches im Rahmen der Inflammationsprozesse sowohl durch migratorische wie auch regulatorische Eigenschaften einen Einfluss auf die Bildung der Neointima haben könnte. Das CCR10-System spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese unterschiedlicher Hautentzündungen, jedoch zeigen Erkenntnisse aus der Literatur, dass das CCR10-System auch Einfluss auf die T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktion hat, die wesentlich an der Bildung der Neointima beteiligt ist^{18; 29; 69; 80}.

Zu Beginn der Untersuchungen stellten wir deshalb die Hypothese auf, dass man durch eine Blockierung des CCR10-Systems eine signifikante Verminderung der Neointimaformation erreichen könne.

Aus zwei verschiedenen Maustypen, einer CCR10^{wt}-Maus als Kontrolle und einer CCR10^{-/-}-Maus, wurden Gewebeproben entnommen an denen Analysen bezüglich der Histomorphometrie, sowie der Genexpressionsanalyse durchgeführt wurden.

Anhand einer zugrundeliegenden histologischen Auswertung unverletzter Femoralisgefäße von CCR10^{wt}- und CCR10^{-/-}-Mäusen kann gezeigt werden, dass es durch die CCR10-Defizienz zu einem von der CCR10^{wt}-Maus differierenden CCR10^{-/-}-VSMC-Phänotyp kommt. Auffällig in den histologischen Analysen der CCR10^{-/-}-Maus ist die runder und blasiger erscheinende Zellmorphologie der glatten Gefäßmuskelzellen sowie deren ebenfalls runder wirkende Zellkerne, die sich eindeutig von den normalen langgestreckten glatten Gefäßmuskelzellkernen, sowie Gefäßmuskelzellen unterscheiden. Auch ist eine vermehrte

Ansammlung von ECM zu beobachten. Insgesamt erscheint die Tunica media dadurch ungeordneter und strukturloser. Die nachfolgende Genexpressionsanalyse dieser unverletzten Femoralisgefäße zeigt eine differentielle Regulation insbesondere von Genen die mit Zelldifferenzierung und ECM assoziiert sind, auffallend eine verminderten Expression von Adhäsions-assoziierten Genen in CCR10^{-/-}-Mäusen.

Um die Neointimabildung der Gefäße zu initiieren, wurden die Femoralarterien der CCR10^{wt}-, sowie CCR10^{-/-}-Mäuse gemäß dem Femoralisverletzungsmodell nach SATA et al.⁷¹ behandelt, 14 Tage nach Gefäßverletzung wurden die Neointimafläche, die Mediafläche, der Lumenverlust, sowie die Intima/Media-Ratio der beiden Mausstämmen verglichen. Die Ergebnisse der histomorphometrischen Analysen zeigen jedoch in keiner der untersuchten Entitäten Unterschiede, ein Zusammenhang zwischen der CCR10-Defizienz und dem Ausmaß der Neointimaformation nach Gefäßverletzung konnte letztlich nicht nachgewiesen werden.

6 SUMMARY

CHD and its manifestations still are one of world's leading causes of death²⁰. Current therapy of first choice to treat CHD is PCI^{9; 75}. However, restenosis, a major problem of this method, leads to a reduced success rate of percutaneous intervention. The introduction of BMS remarkably reduced restenosis rates. Considerable success to further reduce restenosis rate can be achieved by coating stents with pharmacological agents^{38; 81}.

Objective of this dissertation is the investigation of the meaning of inflammatory procedures, stimulated by vascular injury through PCI, regarding neointimaformation with special attention to CCR10-System. Within the pathogenesis of neointimaformation, the inflammatory reaction plays a key role and especially chemokine-receptor-interaction is of outstanding importance for the recruitment of inflammatory cells, respectively for the healing process after vascular injury^{74; 90}. Chemokine receptor CCR10 and its two ligands CCL27 and CCL28 display such a chemokine-system and could, in the context of inflammatory processes, have influence on the generation of neointima by both migratory and regulatory qualities. CCR10-System plays an important role in the pathogenesis of several skin diseases, however, findings in literature show that the CCR10-System also has influence on T-cell-mediated inflammatory reaction, a factor which is of great importance in the formation of neointima^{18; 29; 69; 80}.

At the beginning of our studies we hypothesized that blocking the CCR10-System could reduce neointima formation.

Tissue Samples of two mouse types, a CCR10^{wt}-mouse, used as control, and a CCR10^{-/-}-mouse, were analysed regarding histomorphometry as well as gene expression.

On the basis of histological analyses of intact femoral arteries of CCR10^{wt}- and CCR10^{-/-}-mice, we could show that the deficiency of CCR10 leads to a differing CCR10^{-/-}-VSMC-Phenotype. Interestingly the cell morphology of CCR10^{-/-}-VSMCs seems to be more round and bullous, furthermore the cell nucleus of VSMC also seems to be more round in contrast to CCR10^{wt}-mice in histological analyses. Moreover an increased accumulation of ECM is observed. Overall tunica media appears to be orderless and structureless. The subsequent gene expression analysis of the intact femoral arteries shows a different expression particularly of genes associated with cell differentiation and ECM, noticeable a reduced expression of adhesion-associated genes in CCR10^{-/-}-mice.

To initialize neointima formation of the vessels the femoral arteries of both CCR10^{wt}- and CCR10^{-/-}-mice were treated corresponding to the mouse model of vascular injury by SATA et al.⁷¹, 14 days after vascular injury neointima area, media area, lumen loss and intima/media-

SUMMARY

ratio of the two mouse types were compared. However, the results of the histomorphometric analyses do not show any difference regarding the named entities, a correlation between the deficiency of CCR10 and the extent of neointimaformation after vascular injury could not be proved.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Allam A. H., Thompson R. C., Wann L. S., Miyamoto M. I., Thomas G. S. (2009). Computed tomographic assessment of atherosclerosis in ancient Egyptian mummies. *Jama* **302**(19): 2091-2094.
2. Ando T., Langley R. R., Wang Y., Jordan P. A., Minagar A., Alexander J. S., Jennings M. H. (2007). Inflammatory cytokines induce MAdCAM-1 in murine hepatic endothelial cells and mediate alpha-4 beta-7 integrin dependent lymphocyte endothelial adhesion in vitro. *BMC Physiol* **7**: 10.
3. Arjomand H., Turi Z. G., McCormick D., Goldberg S. (2003). Percutaneous coronary intervention: historical perspectives, current status, and future directions. *Am Heart J* **146**(5): 787-796.
4. Assmann G., Cullen P., Schulte H. (2002). Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* **105**(3): 310-315.
5. Basu S., Broxmeyer H. E. (2009). CCR5 ligands modulate CXCL12-induced chemotaxis, adhesion, and Akt phosphorylation of human cord blood CD34+ cells. *J Immunol* **183**(11): 7478-7488.
6. Bauters C., Isner J. M. (1997). The biology of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis* **40**(2): 107-116.
7. Beadling C., Smith K. A. (2002). DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes. *Med Immunol* **1**(1): 2.
8. Bhargava B., Karthikeyan G., Abizaid A. S., Mehran R. (2003). New approaches to preventing restenosis. *Bmj* **327**(7409): 274-279.
9. Boersma E. (2006). Does time matter? A pooled analysis of randomized clinical trials comparing primary percutaneous coronary intervention and in-hospital fibrinolysis in acute myocardial infarction patients. *Eur Heart J* **27**(7): 779-788.
10. Braunersreuther V., Mach F., Steffens S. (2007). The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thromb Haemost* **97**(5): 714-721.
11. Bravata D. M., Gienger A. L., McDonald K. M., Sundaram V., Perez M. V., Varghese R., Kapoor J. R., Ardehali R., Owens D. K., Hlatky M. A. (2007). Systematic review: the comparative effectiveness of percutaneous coronary interventions and coronary artery bypass graft surgery. *Ann Intern Med* **147**(10): 703-716.
12. Butcher E. C., Picker L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**(5258): 60-66.
13. Caixeta A. M., Brito F. S., Jr., Costa M. A., Serrano C. V., Jr., Petriz J. L., Da Luz P. L. (2007). Enhanced inflammatory response to coronary stenting marks the development of clinically relevant restenosis. *Catheter Cardiovasc Interv* **69**(4): 500-507.

14. Collen A., Hanemaaijer R., Lupu F., Quax P. H., Van Lent N., Grimbergen J., Peters E., Koolwijk P., Van Hinsbergh V. W. (2003). Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood* **101**(5): 1810-1817.
15. Corriere M. A., Rogers C. M., Eliason J. L., Faulk J., Kume T., Hogan B. L., Guzman R. J. (2008). Endothelial Bmp4 is induced during arterial remodeling: effects on smooth muscle cell migration and proliferation. *J Surg Res* **145**(1): 142-149.
16. Dietz R., Rauch B. (2003). [Guidelines for diagnosis and treatment of chronic coronary heart disease. Issued by the executive committee of the German Society of Cardiology--Heart Circulation Research in cooperation with the German Society for Prevention and Rehabilitation of Cardiac Diseases and the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery]. *Z Kardiol* **92**(6): 501-521.
17. Fan J., Watanabe T. (2003). Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* **10**(2): 63-71.
18. Farb A., Weber D. K., Kolodgie F. D., Burke A. P., Virmani R. (2002). Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation* **105**(25): 2974-2980.
19. Filippov S., Koenig G. C., Chun T. H., Hotary K. B., Ota I., Bugge T. H., Roberts J. D., Fay W. P., Birkedal-Hansen H., Holmbeck K., Sabeh F., Allen E. D., Weiss S. J. (2005). MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* **202**(5): 663-671.
20. Fries R., Bohm M. (2003). [From risk factors to symptomatic coronary artery disease. Update cardiology 2001/2002--part I]. *Med Klin (Munich)* **98**(4): 218-225.
21. Fritz W. A., Lin T. M., Peterson R. E. (2008). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) inhibits vanadate-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) production in TRAMP prostates. *Carcinogenesis* **29**(5): 1077-1082.
22. Frostegard J., Ulfgren A. K., Nyberg P., Hedin U., Swedenborg J., Andersson U., Hansson G. K. (1999). Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* **145**(1): 33-43.
23. Galvez B. G., Matias-Roman S., Albar J. P., Sanchez-Madrid F., Arroyo A. G. (2001). Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. *J Biol Chem* **276**(40): 37491-37500.
24. Gaspardone A., Versaci F. (2005). Coronary stenting and inflammation. *Am J Cardiol* **96**(12A): 65L-70L.
25. Getsios S., Amargo E. V., Dusek R. L., Ishii K., Sheu L., Godsel L. M., Green K. J. (2004). Coordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin 1 regulates intercellular adhesion. *Differentiation* **72**(8): 419-433.

26. Glagov S., Weisenberg E., Zarins C. K., Stankunavicius R., Kolettis G. J. (1987). Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* **316**(22): 1371-1375.
27. Gonzalez M. A., Selwyn A. P. (2003). Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *Am J Med* **115 Suppl 8A**: 99S-106S.
28. Grimberg A., Coleman C. M., Shi Z., Burns T. F., Maclachlan T. K., Wang W., El-Deiry W. S. (2006). Insulin-like growth factor binding protein-2 is a novel mediator of p53 inhibition of insulin-like growth factor signaling. *Cancer Biol Ther* **5**(10): 1408-1414.
29. Homey B., Alenius H., Muller A., Soto H., Bowman E. P., Yuan W., Mcevoy L., Lauerma A. I., Assmann T., Bunemann E., Lehto M., Wolff H., Yen D., Marxhausen H., To W., Sedgwick J., Ruzicka T., Lehmann P., Zlotnik A. (2002). CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* **8**(2): 157-165.
30. Homey B., Wang W., Soto H., Buchanan M. E., Wiesenborn A., Catron D., Muller A., Mcclanahan T. K., Dieu-Nosjean M. C., Orozco R., Ruzicka T., Lehmann P., Oldham E., Zlotnik A. (2000). Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). *J Immunol* **164**(7): 3465-3470.
31. Hood J. L., Logan B. B., Sinai A. P., Brooks W. H., Roszman T. L. (2003). Association of the calpain/calpastatin network with subcellular organelles. *Biochem Biophys Res Commun* **310**(4): 1200-1212.
32. Hristov M., Zerneck A., Liehn E. A., Weber C. (2007). Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thromb Haemost* **98**(2): 274-277.
33. Hsieh P. C., Kenagy R. D., Mulvihill E. R., Jeanette J. P., Wang X., Chang C. M., Yao Z., Ruzzo W. L., Justice S., Hudkins K. L., Alpers C. E., Berceci S., Clowes A. W. (2006). Bone morphogenetic protein 4: potential regulator of shear stress-induced graft neointimal atrophy. *J Vasc Surg* **43**(1): 150-158.
34. Ichii T., Koyama H., Tanaka S., Shioi A., Okuno Y., Otani S., Nishizawa Y. (2002). Thrombospondin-1 mediates smooth muscle cell proliferation induced by interaction with human platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(8): 1286-1292.
35. Inokuma D., Abe R., Fujita Y., Sasaki M., Shibaki A., Nakamura H., Mcmillan J. R., Shimizu T., Shimizu H. (2006). CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow-derived keratinocytes. *Stem Cells* **24**(12): 2810-2816.
36. Kagami S., Saeki H., Komine M., Kakinuma T., Nakamura K., Tsunemi Y., Sasaki K., Asahina A., Tamaki K. (2006). CCL28 production in HaCaT cells was mediated by different signal pathways from CCL27. *Exp Dermatol* **15**(2): 95-100.
37. Kanamori T., Takakura K., Mandai M., Kariya M., Fukuhara K., Sakaguchi M., Huh N. H., Saito K., Sakurai T., Fujita J., Fujii S. (2004). Increased expression of calcium-binding protein S100 in human uterine smooth muscle tumours. *Mol Hum Reprod* **10**(10): 735-742.

38. Kastrati A., Dibra A., Eberle S., Mehilli J., Suarez De Lezo J., Goy J. J., Ulm K., Schömig A. (2005). Sirolimus-eluting stents vs paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease: meta-analysis of randomized trials. *Jama* **294**(7): 819-825.
39. Kawai-Kowase K., Owens G. K. (2007). Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(1): C59-69.
40. Khorram O., Garthwaite M., Golos T. (2002). Uterine and ovarian aryl hydrocarbon receptor (AHR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) mRNA expression in benign and malignant gynaecological conditions. *Mol Hum Reprod* **8**(1): 75-80.
41. Kinashi T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **5**(7): 546-559.
42. Klein C. A., Seidl S., Petat-Dutter K., Offner S., Geigl J. B., Schmidt-Kittler O., Wendler N., Passlick B., Huber R. M., Schlimok G., Baeuerle P. A., Riethmuller G. (2002). Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol* **20**(4): 387-392.
43. Kobayashi H., Suzuki M., Hirashima Y., Terao T. (2003). The protease inhibitor bikunin, a novel anti-metastatic agent. *Biol Chem* **384**(5): 749-754.
44. La Celle P. T., Polakowska R. R. (2001). Human homeobox HOXA7 regulates keratinocyte transglutaminase type 1 and inhibits differentiation. *J Biol Chem* **276**(35): 32844-32853.
45. Lee J. L., Chang C. J., Chueh L. L., Lin C. T. (2006). Secreted frizzled related protein 2 (sFRP2) decreases susceptibility to UV-induced apoptosis in primary culture of canine mammary gland tumors by NF-kappaB activation or JNK suppression. *Breast Cancer Res Treat* **100**(1): 49-58.
46. Lee J. L., Lin C. T., Chueh L. L., Chang C. J. (2004). Autocrine/paracrine secreted Frizzled-related protein 2 induces cellular resistance to apoptosis: a possible mechanism of mammary tumorigenesis. *J Biol Chem* **279**(15): 14602-14609.
47. Lee T., Nesselroth S. M., Olson E. T., Esemuede N., Lawler J., Sumpio B. E., Gahtan V. (2003). Thrombospondin-1-induced vascular smooth muscle cell chemotaxis: the role of the type 3 repeat and carboxyl terminal domains. *J Cell Biochem* **89**(3): 500-506.
48. Li C. H., Amar S. (2006). Role of secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) in wound healing. *J Dent Res* **85**(4): 374-378.
49. Lloyd-Jones D. M., Larson M. G., Beiser A., Levy D. (1999). Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet* **353**(9147): 89-92.
50. Makino E., Sakaguchi M., Iwatsuki K., Huh N. H. (2004). Introduction of an N-terminal peptide of S100C/A11 into human cells induces apoptotic cell death. *J Mol Med* **82**(9): 612-620.

51. Marazzi G., Wang Y., Sassoon D. (1997). Msx2 is a transcriptional regulator in the BMP4-mediated programmed cell death pathway. *Dev Biol* **186**(2): 127-138.
52. Matilainen M., Malinen M., Saavalainen K., Carlberg C. (2005). Regulation of multiple insulin-like growth factor binding protein genes by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Nucleic Acids Res* **33**(17): 5521-5532.
53. Mcilhatton M. A., Bremner P., McMullin M. F., Maxwell A. P., Winter P. C., Lappin T. R. (1998). Sequence characterisation and expression of homeobox HOX A7 in the multi-potential erythroleukaemic cell line TF-1. *Biochim Biophys Acta* **1442**(2-3): 329-333.
54. Mendez E., Fernandez-Luna J. L., Grubb A., Leyva-Cobian F. (1986). Human protein HC and its IgA complex are inhibitors of neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(5): 1472-1475.
55. Mintz G. S., Popma J. J., Pichard A. D., Kent K. M., Satler L. F., Wong C., Hong M. K., Kovach J. A., Leon M. B. (1996). Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* **94**(1): 35-43.
56. Miyazaki M., Sakaguchi M., Akiyama I., Sakaguchi Y., Nagamori S., Huh N. H. (2004). Involvement of interferon regulatory factor 1 and S100C/A11 in growth inhibition by transforming growth factor beta 1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* **64**(12): 4155-4161.
57. Molor-Erdene P., Okajima K., Isobe H., Uchiba M., Harada N., Okabe H. (2005). Urinary trypsin inhibitor reduces LPS-induced hypotension by suppressing tumor necrosis factor- α production through inhibition of Egr-1 expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**(3): H1265-1271.
58. Morales J., Homey B., Vicari A. P., Hudak S., Oldham E., Hedrick J., Orozco R., Copeland N. G., Jenkins N. A., Mcevoy L. M., Zlotnik A. (1999). CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14470-14475.
59. Morteau O., Gerard C., Lu B., Ghiran S., Rits M., Fujiwara Y., Law Y., Distelhorst K., Nielsen E. M., Hill E. D., Kwan R., Lazarus N. H., Butcher E. C., Wilson E. (2008). An indispensable role for the chemokine receptor CCR10 in IgA antibody-secreting cell accumulation. *J Immunol* **181**(9): 6309-6315.
60. Moura R., Tjwa M., Vandervoort P., Cludts K., Hoylaerts M. F. (2007). Thrombospondin-1 activates medial smooth muscle cells and triggers neointima formation upon mouse carotid artery ligation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(10): 2163-2169.
61. Murphy P. M., Baggiolini M., Charo I. F., Hebert C. A., Horuk R., Matsushima K., Miller L. H., Oppenheim J. J., Power C. A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **52**(1): 145-176.

-
62. North A. J., Bardsley W. G., Hyam J., Bornslaeger E. A., Cordingley H. C., Trinnaman B., Hatzfeld M., Green K. J., Magee A. I., Garrod D. R. (1999). Molecular map of the desmosomal plaque. *J Cell Sci* **112** (Pt **23**): 4325-4336.
63. Ohashi R., Mu H., Yao Q., Chen C. (2004). Atherosclerosis: immunopathogenesis and immunotherapy. *Med Sci Monit* **10**(11): RA255-260.
64. Pan J., Kunkel E. J., Gossler U., Lazarus N., Langdon P., Broadwell K., Vierra M. A., Genovese M. C., Butcher E. C., Soler D. (2000). A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. *J Immunol* **165**(6): 2943-2949.
65. Rajagopal V., Rockson S. G. (2003). Coronary restenosis: a review of mechanisms and management. *Am J Med* **115**(7): 547-553.
66. Rajaram S., Baylink D. J., Mohan S. (1997). Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* **18**(6): 801-831.
67. Rajavashisth T. B., Xu X. P., Jovinge S., Meisel S., Xu X. O., Chai N. N., Fishbein M. C., Kaul S., Cercek B., Sharifi B., Shah P. K. (1999). Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation* **99**(24): 3103-3109.
68. Riessen R., Kearney M., Lawler J., Isner J. M. (1998). Immunolocalization of thrombospondin-1 in human atherosclerotic and restenotic arteries. *Am Heart J* **135**(2 Pt 1): 357-364.
69. Ross R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**(2): 115-126.
70. Sakaguchi M., Miyazaki M., Takaishi M., Sakaguchi Y., Makino E., Kataoka N., Yamada H., Namba M., Huh N. H. (2003). S100C/A11 is a key mediator of Ca(2+)-induced growth inhibition of human epidermal keratinocytes. *J Cell Biol* **163**(4): 825-835.
71. Sata M., Maejima Y., Adachi F., Fukino K., Saiura A., Sugiura S., Aoyagi T., Imai Y., Kurihara H., Kimura K., Omata M., Makuuchi M., Hirata Y., Nagai R. (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): 2097-2104.
72. Schober A., Knarren S., Lietz M., Lin E. A., Weber C. (2003). Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **108**(20): 2491-2497.
73. Schober A., Manka D., Von Hundelshausen P., Huo Y., Hanrath P., Sarembock I. J., Ley K., Weber C. (2002). Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation* **106**(12): 1523-1529.
74. Schober A., Zerneck A. (2007). Chemokines in vascular remodeling. *Thromb Haemost* **97**(5): 730-737.

75. Schömig A., Ndrepepa G., Kastrati A. (2006). Late myocardial salvage: time to recognize its reality in the reperfusion therapy of acute myocardial infarction. *Eur Heart J* **27**(16): 1900-1907.
76. Schwartz R. S., Holmes D. R., Jr., Topol E. J. (1992). The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol* **20**(5): 1284-1293.
77. Schwarz-Benmeir N., Glaser T., Barnoy S., Kosower N. S. (1994). Calpastatin in erythrocytes of young and old individuals. *Biochem J* **304** (Pt 2): 365-370.
78. Serruys P. W., De Jaegere P., Kiemeneij F., Macaya C., Rutsch W., Heyndrickx G., Emanuelsson H., Marco J., Legrand V., Materne P., Et Al. (1994). A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med* **331**(8): 489-495.
79. Sigwart U., Puel J., Mirkovitch V., Joffre F., Kappenberger L. (1987). Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med* **316**(12): 701-706.
80. Simonetti O., Goteri G., Lucarini G., Filosa A., Pieramici T., Rubini C., Biagini G., Offidani A. (2006). Potential role of CCL27 and CCR10 expression in melanoma progression and immune escape. *Eur J Cancer* **42**(8): 1181-1187.
81. Sirnes P. A., Golf S., Myreng Y., Molstad P., Emanuelsson H., Albertsson P., Brekke M., Mangschau A., Endresen K., Kjekshus J. (1996). Stenting in Chronic Coronary Occlusion (SICCO): a randomized, controlled trial of adding stent implantation after successful angioplasty. *J Am Coll Cardiol* **28**(6): 1444-1451.
82. Smith A., Stanley P., Jones K., Svensson L., Mcdowall A., Hogg N. (2007). The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. *Immunol Rev* **218**: 135-146.
83. Stary H. C., Chandler A. B., Glagov S., Guyton J. R., Insull W., Jr., Rosenfeld M. E., Schaffer S. A., Schwartz C. J., Wagner W. D., Wissler R. W. (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): 2462-2478.
84. Statistisches Bundesamt Gesundheitswesen (2011). Todesursachen in Deutschland 2010. *Fachserie 12, Reihe 4*.
85. Strauss B. H., Chisholm R. J., Keeley F. W., Gotlieb A. I., Logan R. A., Armstrong P. W. (1994). Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. *Circ Res* **75**(4): 650-658.
86. Taghon T., Thys K., De Smedt M., Weerkamp F., Staal F. J., Plum J., Leclercq G. (2003). Homeobox gene expression profile in human hematopoietic multipotent stem cells and T-cell progenitors: implications for human T-cell development. *Leukemia* **17**(6): 1157-1163.

87. Tang X. M., Rossi M. J., Masterson B. J., Chegini N. (1994). Insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-I receptors, and IGF binding proteins 1-4 in human uterine tissue: tissue localization and IGF-I action in endometrial stromal and myometrial smooth muscle cells in vitro. *Biol Reprod* **50**(5): 1113-1125.
88. Terry D. F., Evans J. C., Pencina M. J., Murabito J. M., Vasan R. S., Wolf P. A., Kelly-Hayes M., Levy D., D'agostino R. B., Sr., Benjamin E. J. (2007). Characteristics of Framingham offspring participants with long-lived parents. *Arch Intern Med* **167**(5): 438-444.
89. Thornton A. M., Donovan E. E., Piccirillo C. A., Shevach E. M. (2004). Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* **172**(11): 6519-6523.
90. Toutouzas K., Colombo A., Stefanadis C. (2004). Inflammation and restenosis after percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J* **25**(19): 1679-1687.
91. Townson D. H., Liptak A. R. (2003). Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. *Reprod Biol Endocrinol* **1**: 94.
92. Van Wanrooij E. J., De Jager S. C., Van Es T., De Vos P., Birch H. L., Owen D. A., Watson R. J., Biessen E. A., Chapman G. A., Van Berkel T. J., Kuiper J. (2008). CXCR3 antagonist NBI-74330 attenuates atherosclerotic plaque formation in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(2): 251-257.
93. Versaci F., Gaspardone A., Tomai F., Proietti I., Ghini A. S., Altamura L., Ando G., Crea F., Gioffre P. A., Chiariello L. (2004). A comparison of coronary artery stenting with angioplasty for isolated stenosis of the proximal left anterior descending coronary artery: five year clinical follow up. *Heart* **90**(6): 672-675.
94. Walsh K., Isner J. M. (2000). Apoptosis in inflammatory-fibroproliferative disorders of the vessel wall. *Cardiovasc Res* **45**(3): 756-765.
95. Wang W., Soto H., Oldham E. R., Buchanan M. E., Homey B., Catron D., Jenkins N., Copeland N. G., Gilbert D. J., Nguyen N., Abrams J., Kershenovich D., Smith K., Mcclanahan T., Vicari A. P., Zlotnik A. (2000). Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). *J Biol Chem* **275**(29): 22313-22323.
96. Webb L. M., Ehrenguber M. U., Clark-Lewis I., Baggiolini M., Rot A. (1993). Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(15): 7158-7162.
97. Weber C. (2007). Chemokines take centre stage in vascular biology. *Thromb Haemost* **97**(5): 685-687.
98. Weintraub W. S. (2007). The pathophysiology and burden of restenosis. *Am J Cardiol* **100**(5A): 3K-9K.
99. World Health Organization (2009). Cause-specific mortality 2008.

100. Wu L., Paxton W. A., Kassam N., Ruffing N., Rottman J. B., Sullivan N., Choe H., Sodroski J., Newman W., Koup R. A., Mackay C. R. (1997). CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J Exp Med* **185**(9): 1681-1691.
101. Zahradka P., Harding G., Litchie B., Thomas S., Werner J. P., Wilson D. P., Yurkova N. (2004). Activation of MMP-2 in response to vascular injury is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of MT1-MMP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**(6): H2861-2870.
102. Zernecke A., Liehn E. A., Gao J. L., Kuziel W. A., Murphy P. M., Weber C. (2006). Deficiency in CCR5 but not CCR1 protects against neointima formation in atherosclerosis-prone mice: involvement of IL-10. *Blood* **107**(11): 4240-4243.
103. Zlotnik A., Yoshie O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**(2): 121-127.
104. Zohlhöfer D., Klein C. A., Richter T., Brandl R., Murr A., N hrenberg T., Schömig A., Baeuerle P. A., Neumann F. J. (2001). Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: Detection of FK506-binding protein 12 upregulation. *Circulation* **103**(10): 1396-1402.
105. Zohlhöfer D., Richter T., Neumann F., N hrenberg T., Wessely R., Brandl R., Murr A., Klein C. A., Bauerle P. A. (2001). Transcriptome analysis reveals a role of interferon-gamma in human neointima formation. *Mol Cell* **7**(5): 1059-1069.

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Von der Chemotaxis bis zur Diapedese der Leukozyten⁴¹ 6

Abbildung 2: Pathogenese der Restenose, modifiziert nach TOUTOUZAS et al.⁹⁰ 7

Abbildung 3: Chemokin-Untergruppen, unterteilt anhand der Position der Cysteinreste⁹¹ 8

Abbildung 4: Genetische Struktur der CCR10^{-/-}-Maus 12

Abbildung 5: Das Femoralisverletzungsmodell nach SATA et al.⁷¹ 15

Abbildung 6: Morphometrische Ausmessungen; A. femoralis, E.-v.-G., nach Gefäßverletzung 16

Abbildung 7: Repräsentatives Ergebnis eines Nylon Arrays (Mouse1.2) nach Hybridisierung mit cDNA. 20

Abbildung 8: Histologische Schnitte unoperierter CCR10^{wt-} und CCR10^{-/-}-Mäuse 23

Abbildung 9: Histologische Schnitte unoperierter CCR10^{wt-} und CCR10^{-/-}-Mäuse 24

Abbildung 10: Einteilung differentiell regulierter Gene 25

Abbildung 11: Unterteilung der funktionellen Gruppen nach hoch-, bzw. herunterregulierten Genen 25

Abbildung 12: Histologische Schnitte CCR10^{wt-} und CCR10^{-/-}-Mäuse 14 Tage nach Verletzung 31

Abbildung 13: Neointimafläche der CCR10^{wt-} und CCR10^{-/-}-Maus im Vergleich 31

Abbildung 14: Gefäßlumenverlust der CCR10^{wt-} und CCR10^{-/-}-Maus im Vergleich 32

Abbildung 15: Mediafläche der CCR10^{wt-} und CCR10^{-/-}-Maus im Vergleich 32

Abbildung 16: Intima/Media-Ratio der CCR10^{wt-} und CCR10^{-/-}-Maus im Vergleich 33

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Reagenzien. 21

Tabelle 2: Regulation Inflammations-assoziiertes Gene (n=4). 26

Tabelle 3: Regulation Apoptose/Proliferations-assoziiertes Gene (n=2). 27

Tabelle 4: Regulation Extrazellulärmatrix-assoziiertes Gene (n=12). 28

Tabelle 5: Regulation Differenzierungs-assoziiertes Gene (n=14). 30

Tabelle 6: Regulation Sonstiger Gene (n=7). 30

10 DANKSAGUNG

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Dietlind Zohlhöfer für die Aufnahme in die Arbeitsgemeinschaft und für die Möglichkeit dieses interessante Thema erforschen zu dürfen, bedanken. Auch für die stets rasche Beantwortung meiner Fragen und die Durchsicht meiner Arbeit vielen lieben Dank!

Herrn Dr. med. Tobias Dietrich Haase danke ich für die Durchführung der Operationen, sowie die Auswertung der erhobenen histomorphometrischen Daten.

Herrn Falko Sorge gilt ebenfalls ein großer Dank für die Einführung in die verschiedenen wissenschaftlichen Methoden.

Dem Uniklinikum Münster, stellvertretend Herrn Prof. Dr. Pavenstädt und Mitarbeitern, möchte ich für die gelungene Zusammenarbeit und das interessante Symposium im Rahmen des CCR10-Projekts in Münster danken.

Der Abteilung für Gefäßchirurgie der TU München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Eckstein, stellvertretend Herrn Dr. Pelisek und Frau Hegenloh, danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung der histologischen Analysen und die Einarbeitung in die Techniken.

Es ist es mir des weiteren ein großes Anliegen mich für die kollegiale Zusammenarbeit bei meinem Mitdoktoranden Herrn Christoph Reichenbacher und der gesamten Laborgemeinschaft des deutschen Herzzentrums zu bedanken.

Auch möchte ich mich bei meinen Eltern Anita und Arno Hartung, bei meinem Bruder Eric Hartung, bei meiner Großmutter Margarete Hartung und meinem Onkel Percy Lehmann für den starken Rückhalt und die Anteilnahme während der Erstellung dieser Arbeit bedanken.
Eu amo vocês pra cachorro!

Zuletzt bedanke ich mich bei Dir, Sonja – Ohne Dich schlaf ich heut´ Nacht nicht ein...

11 LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Jonas Arno Hartung
Geburtsdatum: 18.10.1984
Eltern: Arno Klaus Hartung und
Anita Hartung, geb. Lehmann
Geburtsort: München
Familienstatus: ledig

Schulische Ausbildung:

1991 – 1995 Grundschule an der Ostpreußenstraße, München
1995 – 2004 Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium, München
Abitur im neusprachlichen Zweig (Note 1,8)

Akademische Ausbildung:

10/2004 – 07/2006 vorklinischer Studienabschnitt an der Ludwig-Maximilians-Universität
München und der Technischen Universität München
08/2006 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note „gut“)
10/2006 – 07/2010 klinischer Studienabschnitt an der Technischen Universität München
10/2010 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note „gut“)

Berufliche Tätigkeiten:

jährlich seit 1994 Mitarbeit bei den BMW Open, einem der fünf großen ATP-
Tennisturniere in Deutschland, auf der Anlage des MTTC Iphitos
München, mittlerweile als Mitglied der Turnierleitung
12/2005 - 05/2006 Studentische Hilfskraft als Nachtwache in der Unfallchirurgie des
Universitätsklinikums Rechts der Isar
05/2006 - 10/2008 Studentische Hilfskraft im Giftnotruf am Universitätsklinikum Rechts
der Isar
10/2008 - 10/2009 Mitarbeit in der Dienstleistungsgesellschaft "Agentour25"
05/2008 - 04/2010 Op-Assistenz im Orthopädischen Zentrum Arabellapark/
Privatklinikum Josephinum, Praxis Dr. Kinast und Prof. Dr. Hamel
04/2011 - 04/2013 Assistenzarzt im Klinikum München-Bogenhausen, Klinik für
Rheumatologie und klinische Immunologie
Seit 04/2013 Assistenzarzt im Klinikum München-Bogenhausen, Klinik für
Pneumologie und pneumologische Onkologie

Fremdsprachen:

Portugiesisch, Englisch, Spanisch