

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I am Klinikum München - Großhadern der
Ludwig - Maximilians - Universität München
Direktor Prof. Dr. G. Steinbeck

**Die Endothelaktivierung
nach Hypoxie und Reoxygenierung**

Hemmstrategien in vitro

Dissertation

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

vorgelegt von
Fabian Müller-Hartmann
aus Würzburg
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter : Priv. Doz. Dr. C. Kupatt

Mitberichterstatter : Prof. Dr. B. F. Becker
Priv. Doz. Dr. Th. M. Schiele

Dekan : Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung : 18.01.2007

„Niemals setzt sich die Wissenschaft das Phantom zum Ziel,
endgültige Antworten zu geben oder auch nur wahrscheinlich zu machen,
sondern ihr Weg wird bestimmt durch ihre unendliche, aber keineswegs unlösbare Aufgabe,
immer wieder neue, vertiefte und verallgemeinerte Fragen zu finden
und die immer nur vorläufigen Antworten immer von neuem und immer strenger zu prüfen.“

Karl Popper, Logik der Forschung, Wien 1935

für Daniela

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Das Gefäßendothel	8
1.2	Die Endothelaktivierung	9
1.3	Adhäsionmoleküle	10
1.3.1	Selektine	11
1.3.2	Integrine	11
1.3.3	Immunoglobulin-Superfamilie	12
1.3.3.1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1)	13
1.3.3.2	Vaskuläres Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1)	13
1.4	Die Adhäsionskaskade	15
1.4.1	Das Rolling	15
1.4.2	Das Sticking	15
1.4.3	Die Transmigration	16
1.5	Phasenverlauf der Endothelaktivierung	17
1.5.1	Die Akute Phase (Typ I)	17
1.5.2	Die Subakute Phase (Typ II)	18
1.6	Der Myokardiale Reperfusionsschaden	20
2	Zielsetzung	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Zellkulturen	22
3.1.1	HMEC	22
3.1.2	HUVEC	22
3.1.3	NECR und Isolationsprotokoll	22
3.1.4	Medien, wichtige Materialien und Routinen	22
3.2	Transfektionsmethoden	23
3.2.1	HVJ-Liposomen und Herstellungsprotokoll	23
3.2.2	SuperFect™	24
3.2.3	Effectene™	24

3.3	Reportergenkonstrukte	25
3.3.1	Renilla- und Firefly-Luciferase	25
3.3.2	pICAM-1-Reportergen	25
3.3.3	pE-Selektin-Reportergen	25
3.4	Endothelaktivierung	26
3.4.1	Hypoxie und Reperfusion	26
3.4.2	Leukozyten, Thrombozyten und Fibrinogen	26
3.4.2.1	Isolation von Leukozyten und Thrombozyten aus peripherem Blut	27
3.4.2.2	Isolation mononukleärer Zellen (PMN) mittels Perkoll	27
3.4.2.3	Isolation CD11b-positiver Zellen mittels magnetisierbarer Antikörper	27
3.5	Inhibitionsagentien	28
3.5.1	CD18-Antikörper (IB4) und 11H6-Kontrollantikörper	28
3.5.2	Tirofiban-HCl (Aggrastat)	28
3.5.3	Abciximab (ReoPro)	28
3.6	Prinzip der NF κ B-Decoy-ODN-Transfektion	29
3.6.1	NF κ B-Decoy-ODN	30
3.6.2	PT-veresterte Decoy-ODN	30
3.6.3	Kontroll-Decoy-ODN	30
3.7	Auswertungsverfahren	30
3.7.1	Pierce-Proteinbestimmung	30
3.7.2	Chemolumineszenzmessung	31
3.7.2.1	Chemische Grundlagen	31
3.7.2.2	Probenvorbereitung und Ablauf der Messung	32
3.7.3	MPO-Messung und ELISA-Auswertung	33
3.7.4	Statistische Auswertung	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Evaluation der Transfektionsverfahren	34
4.1.1	Transfektion mittels HVJ-Liposomen	34
4.1.2	Vergleich der verwendeten Transfektionsreagenzien	35
4.2	Evaluation der Reportergenkonstrukte	37
4.2.1	Verhalten der Renilla-Luciferase	37
4.2.2	Verhalten der pICAM-1- und pE-Selektin-Reportergenkonstrukte	38

4.3	Endothelaktivierung	40
4.3.1	Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung.....	40
4.3.2	Einfluss von PMN und Thrombozyten.....	41
4.3.3	Einfluss von PMN unter Hypoxie und Reoxygenierung	44
4.4	Hemmung der subakuten Endothelaktivierung mittels NF κ B-Decoy-ODN.....	45
4.4.1	Hemmung nach TNF α -Aktivierung.....	45
4.4.2	Zeitlicher Verlauf der NF κ B-Decoy-ODN-Inhibition.....	46
4.4.3	Hemmung nach PMN-Adhäsion.....	47
4.4.4	Hemmung nach PMN-Adhäsion unter Hypoxie und Reoxygenierung	48
4.5	Hemmung der akuten Endothelaktivierung.....	49
4.6	Effekte auf die subakute bei Hemmung der akuten Endothelaktivierung	51
4.7	Vergleich von NF κ B-Decoy-ODN und Adhäsionshemmern	53
5	Diskussion.....	56
5.1	Etablierung von Zellkultur und Transfektionsmodell.....	56
5.2	Untersuchungen zur subakuten Endothelaktivierung	58
5.2.1	Die zentrale Rolle von NF κ B.....	58
5.2.2	Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren	59
5.2.3	Einfluss von PMN und Thrombozyten	61
5.2.4	Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung	63
5.3	Möglichkeiten zur Hemmung der Endothelaktivierung	65
5.3.1	Hemmung der subakuten Endothelaktivierung mittels NF κ B-Decoy-ODN	65
5.3.2	Hemmung der akuten Endothelaktivierung.....	68
5.3.3	Effekte auf die subakute bei Hemmung der akuten Endothelaktivierung	69
5.3.4	Vergleich der NF κ B-Decoy-ODN mit Adhäsionshemmern und Perspektiven	71
6	Zusammenfassung	73
7	Literaturnachweis	75
	Häufig verwendete Abkürzungen	90
	Lebenslauf und Danksagung	92

1 Einleitung

1.1 Das Gefäßendothel

Die großen Blutgefäße des menschlichen Körpers haben ein gemeinsames Bauprinzip, das in seiner Ausgestaltung zwar variiert, sich jedoch immer aus drei Wandschichten zusammensetzt. Von außen nach innen betrachtet enthält die Tunica externa (Adventitia) kollagene und elastische Bindegewebsfasern, ernärende Gefäße (Vasa vasorum) und Gefäßnerven, die Tunica media (Media) dicht gefügte, spindelförmige oder glatte Muskelzellschicht und die Tunica interna (Intima) Bindegewebe, eine Basalmembran sowie einen einschichtigen, flachen Zellverband, das Endothel (Lippert, 1996).

Im ruhenden Zustand dient das Endothel durch seine strukturellen und metabolischen Eigenschaften den meisten Zellen und Substanzen als Passagehindernis vom Gefäßlumen in den interstitiellen Raum. Zudem bildet es Substanzen (z.B. Stickstoffmonoxid, Antithrombin oder Prostacyclin), die Aggregation und Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten hemmen (Klinke, 1996). Lokale Schädigungen durch Ischämie oder Entzündung können jedoch zum Verlust dieser Endothelintegrität und sogar zur Endothelzellaktivierung führen (Ley, 1996). Welche Mechanismen bei der Aktivierung von Endothelzellen eine Rolle spielen und welche Faktoren daran beteiligt sind, wird im folgenden genauer dargestellt.

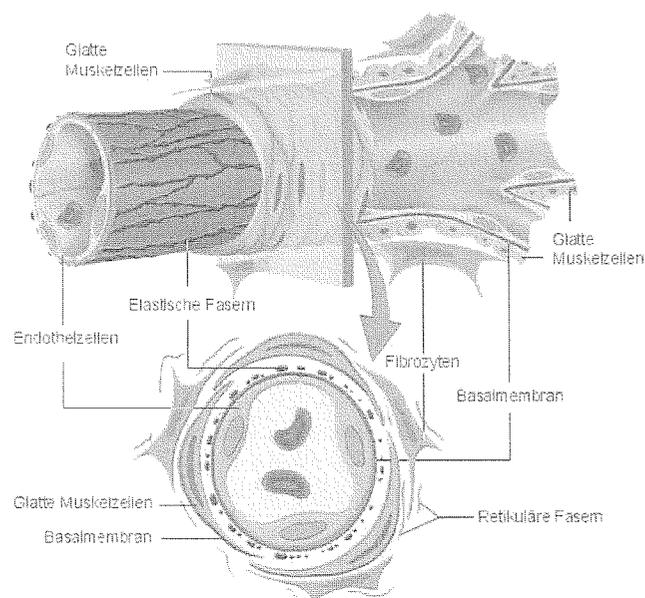


Abb. 1.1 Schematische Darstellung und Querschnitt durch eine Arteriole (entnommen und modifiziert aus Molson Medical Informatics, McGill Universität, Montreal, Kanada)

1.2 Die Endothelaktivierung

Die Infiltration von Gewebe durch Leukozyten ist ein wichtiger Bestandteil der körpereigenen Immunreaktion. Bevor ein Leukozyt das Gefäßsystem verlassen und in tiefer gelegene Gewebeschichten transmigrieren kann, muss er jedoch in Kontakt mit den Zellen der Gefäßwand treten. Für diese Adhäsion ist die Aktivierung der Gefäßendothelzellen, verbunden mit der Expression von Adhäsionsmolekülen (Einleitung 1.3), erforderlich. Auslösende Stimuli für diese Endothelaktivierung sind beispielsweise Ischämie, Entzündungsreaktionen oder ein Tumorgeschehen. Auch Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, Thrombin oder bakterielle Endotoxine sind solche Aktivatoren (Ebnet, 1999).

Im Fall von lokalen Infektionen oder Gefäßverletzungen trägt diese Endothelaktivierung und Zelladhäsion entscheidend zur Infektabwehr oder Blutstillung bei. Bei Traumen, Ischämie, Entzündung oder Sepsis kommt es jedoch häufig zu einer überschießenden Aktivierung. Diese führt zu einer übersteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen und Interaktion zwischen Leukozyten, Thrombozyten und dem Endothel. Mikrozirkulationsstörungen und morphologische Schäden im betroffenen Organ können die Folge sein (Ley, 1996). Solche Mechanismen der leukozytenvermittelten Gewebeschädigung sind auch bei der Reperfusion vormals ischämischer Stromgebiete nach Organinfarkten beschrieben worden (Schurmann, 1997). Dieser so genannte Reperfusionsschaden (Jennings, 1985) am wiedereröffneten Gefäßsystem bildet den Schwerpunkt unserer Fragestellungen und soll daher gesondert eingeführt werden (Einleitung 1.6).

Die endotheliale Aktivierung und konsekutive Adhäsion zuvor frei fließender Leukozyten und Thrombozyten erfolgt in einer so genannten Adhäsionskaskade. Diese verläuft in drei Stufen (Einleitung 1.4): dem Rolling, Sticking und der (Trans-) Migration (Sluiter, 1993; Carlos, 1994; Froese, 1994; Fuster, 1996). Es wird jedoch auch eine zeitliche Komponente in der Endothelaktivierung beschrieben (Ichikawa, 1997). So konnten Studien in der Zellkultur zeigen, dass sich eine frühe Phase (nach Sekunden bis Minuten) von einer späten Phase (nach Stunden bis Tagen) unterscheiden lässt (Einleitung 1.5).

Zunächst wird jedoch genauer auf die an der Endothelaktivierung und der Interaktion von Endothel und Leukozyten bzw. Thrombozyten beteiligten Adhäsionsmoleküle eingegangen.

1.3 Adhäsionsmoleküle

Als Adhäsionsmoleküle werden Glykoproteine auf der Oberfläche von Zellen bezeichnet. Sie besitzen eine breite strukturelle Variabilität und eine Vielfalt an Aufgaben. So beeinflussen sie die Interaktionen zwischen einer Zelle und deren Umgebung, mit benachbarten Endothelzellen, immunkompetenten Zellen oder nicht-zellulären Strukturen wie Matrix-Proteinen. Durch Bindung an entsprechende Liganden kann das Zytoskelett in seiner Struktur verändert (Hogg, 1993), intrazelluläre Moleküle durch Exozytose ausgeschüttet (Carlos, 1994) oder die Expression von Oberflächenmolekülen verändert werden. Auch sich selbst verstärkende Effekte, bei denen Rezeptor-Liganden-Bindungen eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen nach sich ziehen, werden beschrieben (Gonzalez-Amaro, 1998).

Die Adhäsion spielt jedoch neben wichtigen physiologischen Phänomenen auch eine Schlüsselrolle bei vielen pathologischen Veränderungen wie Ischämie, Entzündungen oder Tumorentwicklung. Viele dieser Erkrankungen werden durch Inflammation charakterisiert, einem Phänomen, das die Infiltration von Leukozyten in Gewebe beinhaltet. Obwohl die Entzündung in erster Linie eine Immunreaktion des Organismus darstellt, kann dieser physiologische Prozess ein überschießendes Maß annehmen und zu Zellschäden und Organdysfunktion führen (Springer, 1990; Frenette, 1996a; Frenette, 1996b). Die dabei beobachtete, chronische Adhäsion von inflammatorischen Leukozyten wird insbesondere auch mit der Entstehung und dem Fortschreiten der Koronarsklerose in Zusammenhang gebracht (Braunwald, 1997; Breslow, 1997).

Eine Systematik für die sehr heterogene Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle wurde erst durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen spezifische zelluläre Oberflächenantigene möglich (Beug, 1973). Es sei erwähnt, dass neben den genannten Molekülen auch Cadherine und verschiedene, nicht miteinander verwandte Oberflächenmoleküle mit adhäsiven Fähigkeiten existieren, auf die jedoch nicht genauer eingegangen wird.

1.3.1 Selektine

Selektine sind transmembranäre Glykoproteine, deren Vertreter eine lektin-ähnliche, aminoterminal Domäne besitzen, der eine variable Zahl von sich wiederholenden Homologieeinheiten als Regulationseinheiten folgt (Gearing, 1993).

L-Selektin (LECAM-1, CD62L) kommt auf Leukozyten vor und wird dort konstitutiv exprimiert. P-Selektin (PADGEM, GMP-140, CD62P) wird vorgebildet und in den Granula von Thrombozyten oder den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen gespeichert. Es kann durch Thrombin, Histamin, Komplementfaktoren, Endotoxine, $\text{TNF}\alpha$, Virusinfektionen und H_2O_2 aktiviert werden und wird innerhalb von Sekunden an die Zelloberfläche befördert. E-Selektin (ELAM-1, CD62E) findet sich dagegen ausschließlich auf Endothelzellen. Es wird über eine proinflammatorische Transkriptionsaktivierung ($\text{NF}\kappa\text{B}$ und AP-1) vermehrt gebildet. Hauptaufgabe der Selektine ist jedoch die Vermittlung einer schwachen, reversiblen Bindung von Leukozyten an die Gefäßwand (Gearing, 1993), das so genannten Rolling (Einleitung 1.4.1). Dieses ist Ca^{2+} -abhängig.

1.3.2 Integrine

Integrine sind Zelloberflächenrezeptoren, die Interaktionen zwischen Zellinnerem und Zellumgebung ermöglichen (Hynes, 1992). Es handelt sich um heterodimere, transmembranäre Glykoproteine (Corbi, 1996), die neben Zell-Matrix-Interaktionen insbesondere Zell-Zell-Adhäsion vermitteln, indem sie Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie binden.

Integrine werden konstitutiv an Zelloberflächen exprimiert, sind teilweise jedoch inaktiv und müssen erst durch spezifische Agonisten aktiviert (Sanchez-Mateos, 1996), aber auch durch diese reguliert werden. So war es zum Beispiel lange umstritten, ob MAC-1, ein granulozytäres Integrin (CD11b/CD18), aktiviert oder überexprimiert wird. Erst durch die Entwicklung der GpIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten (Abciximab, Tirofiban), spezifischer Antikörper gegen aktiviertes MAC-1, lernte man die Funktion dieser Integrine besser kennen. Umgekehrt kann man sich dadurch auch den großen klinischen Nutzen von GpIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten bei der Aggregationshemmung besser erklären (Schwarz, 2002).

Etwa 80.000 dieser GpIIb/IIIa-Rezeptoren sind auf der Thrombozytenoberfläche verankert. Die Adhäsion an diesen ist streng reguliert: nach Aktivierung (durch ADP, Thrombin, Kollagen, Serotonin, Thromboxane A₂ oder Epinephrin) erkennt der GpIIb/IIIa-Rezeptor Aminosäuresequenzen mit Arg-Gly-Asp, die adhäsive Komponente von Fibrinogen, von Willebrand Faktor, Fibronektin und Vitronektin. Eine Konformationsänderung des GpIIb/IIIa-Moleküls bildet dann die Voraussetzung für die Thrombozytenadhäsion und Thrombenbildung (Shattil, 1997, Gonzales-Amaro 1998).

Integrine übernehmen auch wichtige Funktionen bei der hämatopoetischen Zellentwicklung, bei der Zellmigration als Antwort auf Verletzungen, der Angiogenese und beim extrazellulären Matrixkontakt. Die Adhäsionsmoleküle dieser Familie übernehmen Signalwirkungen (outside-in-signaling), wobei ligandenbesetzte und angehäufte (clustered) Integrine sowohl Zellform als auch Organisation des Zytoskeletts kontrollieren und eine Vielzahl von biochemischen Signalen generieren (Clark, 1995). Im Gegensatz zu klassischen Rezeptoren lösen sie auch extrazelluläre Effektorantworten aus (inside-out-signal) (Shattil, 1997).

Als wichtige Vertreter der leukozytären Integrine seien hier LFA-1 (CD11a/CD18, $\alpha_L\beta_2$) auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen (Carrasco, 2004) und Monozyten (Issekutz, 1995), MAC-1 (CD11b/CD18) auf polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$, CD49d/CD29) auf Monozyten erwähnt (Postigo, 1993, Übersicht in Tab. 1.1).

1.3.3 Immunglobulin-Superfamilie

Die Mitglieder der Ig-Superfamilie sind ebenfalls transmembranäre Glykoproteine, die Membranen einfach durchspannen (single-pass-Glykoproteine) und vornehmlich eine Ca^{2+} -unabhängige Adhäsion vermitteln (Sluiter, 1993; Springer, 1994). Sie kommen im Organismus auf verschiedenen Geweben vor und besitzen mindestens eine Domäne, die auch für Antikörper charakteristisch ist (Springer, 1990). Zu den wichtigsten Vertretern zählen das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), das vaskuläre Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) sowie PECAM (CD31, auf Endothelzellen, Thrombozyten, Neutrophilen und Monozyten) und NCAM (CD56, auf Nervenzellen).

In vivo-Tierstudien und immunhistochemische Studien von humanen Geweben zeigten, dass die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in arteriosklerotischen Plaques stark erhöht ist (Davies, 1993). Nach Aktivierung während inflammatorischer Prozesse werden diese Moleküle verstärkt exprimiert und sind wichtig für Adhäsion und transendotheliale Migration von Leukozyten (Gearing, 1993; Carlos, 1994).

Den Adhäsionsmolekülen dieser Familie wird außerdem eine große Bedeutung bei der Entwicklung von Wirbeltieren zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen VCAM-1 bei der Entwicklung fehlt, entweder anormale Herzen entwickeln, bei Trächtigkeit eine Fehlentwicklung der Plazenta zeigen oder bereits vor der Geburt sterben, da deren Allantois nicht mit dem Chorion fusionieren kann (Gurtner, 1995; Kwee, 1995).

1.3.3.1 Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1)

ICAM-1 (CD54) wird in erster Linie auf Endothelzellen, aber auch auf Epithel, Fibroblasten, Leukozyten und vielen Tumorzellen exprimiert (Gearing, 1993). Als Liganden wurden zuerst β_2 -Integrine (LFA-1, MAC-1) auf Leukozyten identifiziert (Rothlein, 1986; Staunton, 1989). Später konnte gezeigt werden, dass ICAM-1 direkt Fibrinogen binden kann (Altieri, 1993) und dadurch zur Thrombozytenadhäsion beiträgt. Auf Endothelzellen wird es konstitutiv exprimiert, kann jedoch auch durch Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ und IL-1 induziert werden (Dustin, 1986; Rothlein, 1988).

1.3.3.2 Vasculäres Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1)

VCAM-1 (CD106) kommt auf endothelialen, epithelialen und dendritischen Zellen sowie auf Makrophagen vor (Gearing, 1993). Dieses Transmembranprotein ist ursprünglich als ein induzierbares Molekül auf humanen Endothelzellen entdeckt worden, das in der Lage ist, sowohl Lymph- als auch Tumorzelllinien zu binden (Osborn, 1989; Rice, 1989).

Innerhalb der Ig-Superfamilie ist es am engsten mit ICAM-1 (Rothlein, 1986; Staunton, 1988), ICAM-2 (Staunton, 1989), ICAM-3 (Fawcett, 1992) und MadCAM (Briskin, 1993) verwandt. Die endotheliale VCAM-1 Expression kann durch die Zytokine IL-1 β bzw. -1 γ , $\text{TNF}\alpha$ und IL-4 induziert werden (Iademaro, 1992; Neish, 1992; Iademaro, 1993), wodurch es die Adhäsion und Migration von Monozyten und Lymphozyten mitbestimmt (Masinovsky, 1990; Thornhill, 1991; Meerschaert, 1994). Die VCAM-1 Expression kann auf dem Endothel großer wie auch kleiner Gefäße aus unterschiedlichsten Geweben detektiert werden.

CD Cluster of Differentiation	Synonyme	vorwiegender Expressionsort	vorwiegende Expressionskinetik
Selektine			
CD62P	P-Selektin PADGEM	Thrombozyten und Endothel	basal keine, nach Stimulation rasche Mehrausschüttung
CD62E	E-Selektin ELAM-1	Endothelzellen	durch Stimulation induziert
CD62L	L-Selektin LECAM-1	Leukozyten	konstitutiv, nach Stimulation abgespalten
Integrine			
CD11a / CD18	LFA-1 $\alpha_1\beta_2$	T-Zellen, B-Zellen und Monozyten	konstitutiv und durch Aktivierung
CD11b / CD18	MAC-1	Granulozyten	konstitutiv und durch Aktivierung
CD49d / CD29	VLA-4 $\alpha_4\beta_1$	Monozyten, Lymphozyten Neutrophile, natürliche Killerzellen	konstitutiv und durch Aktivierung
Ig-Superfamilie			
CD31	PECAM-1	Endothel, Thrombozyten, Neutrophile, Monozyten	konstitutiv und durch Aktivierung
CD56	NCAM	Nervenzellen	konstitutiv
CD54	ICAM-1, 2 und 3 MadCAM	Endothel, Leukozyten, Fibroblasten, Tumoren	geringe konstitutive Expression, vorwiegend nach Stimulation
CD106	VCAM-1	Endothel, Epithel, dentr. Zellen, Makrophagen	basal sehr gering, nach Stimulation steigerbar

Tab. 1.1 Übersicht und vorwiegende Expressionskinetik der im Text erwähnten Adhäsionsmoleküle

1.4 Die Adhäsionskaskade

1.4.1 Das Rolling

Dieser Schritt ermöglicht bei normaler Strömungsgeschwindigkeit die Annäherung der frei fließenden Leukozyten an die Gefäßwand. Vermittelt durch Moleküle aus der Gruppe der Selektine und ihrer Liganden kommt es zum Aufbau lockerer Bindungen, deren Entstehung nur geringste Kontaktzeiten benötigt und die Geschwindigkeit der frei fließenden Leukozyten erheblich reduziert. Es resultiert ein langsames Entlangrollen der Leukozyten auf dem Endothel, das so genannte Rolling.

Verantwortlich hierfür sind drei Moleküle (vgl. Einleitung 1.3.1), die nach den Zellen benannt sind, auf denen sie das erste Mal nachgewiesen wurden: P-Selektin (Platelets), L-Selektin (Leukozyten) und E-Selektin (Endothelzellen). Während P- und L-Selektine die Adhäsion bereits bei sehr hoher Strömungsgeschwindigkeit (150 – 500 $\mu\text{m/s}$) vermitteln, ist E-Selektin bei langsamerem Fluss aktiv (3 – 10 $\mu\text{m/s}$) und dient damit der weiteren Geschwindigkeitsreduktion rollender Leukozyten. Selektine binden als Liganden oligosaccharid-ähnliche Strukturen (fucosylierte Kohlehydrate) auf Leukozyten (PSGL und ESL) (Bevilacqua, 1993; Rosen, 1994; Kansas, 1996).

1.4.2 Das Sticking

Die räumliche Nähe von Leukozyten und Endothelzellen bewirkt eine Aktivierung der Leukozyten als Voraussetzung für die feste Bindung an Endothelzellen. Die durch das Rolling herabgesetzte Geschwindigkeit der Leukozyten ermöglicht den Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und VCAM-1 Bindungen einzugehen, die fester als die der Selektine sind, deren Aufbau jedoch eine längere Kontaktzeit benötigt. Es kommt zum so genannten Sticking, dem festen Anhaften des Leukozyten an der Endothelzelle, vermittelt durch ICAM-1 und VCAM-1.

Beide gehören zur Familie der Immunglobulin-ähnlichen Adhäsionsmoleküle und binden die leukozytären β 2-Integrine LFA-1 (CD11a/CD18), MAC-1 (CD11b/CD18) bzw. VLA-4 (Andrian, 1991). MAC-1 ist von besonderem Interesse, da sowohl seine Bindungsaffinität als auch seine Expressionsdichte auf Leukozyten bei Aktivierung rasch gesteigert wird (Arumugam, 2004; Caimi, 2001). VLA-4 wird von mononukleären und eosinophilen Leukozyten exprimiert. Daher besitzt die Bindung von VLA-4 an VCAM-1 nur eine geringe Bedeutung für akute Mikrozirkulationsstörungen, bei denen neutrophile Granulozyten (PMN) die vorherrschende Leukozytenspezies darstellen.

Diese beiden Stufen des Adhäsionsprozesses sind essentiell, d.h. dass eine Inhibition jeweils einer Stufe den leukozytenabhängigen, myokardialen Reperfusionsschaden (Einleitung 1.6) hemmen kann (Simpson, 1988; Kubes, 1995). Neuere Studien konnten zeigen, dass die Leukozytenadhäsion durch Interaktion mit Thrombozyten moduliert wird (Kuijper, 1998). Einerseits können Thrombozyten Leukozyten durch Mediatoren wie Interleukin-1 aktivieren (Gawaz, 1998), andererseits können sie mit aktivierten Leukozyten Aggregate bilden (Evangelista, 1996), die zur Thrombosebildung beitragen (Giesen, 1999). Thrombozyten, die am Endothel oder der Matrix adhären, können in vitro als Adhäsionsfläche für Leukozyten dienen (Weber, 1997). Dieses Phänomen wird über P-Selektin und den GpIIb/IIIa-Rezeptor vermittelt und findet sich auch in reperfundierten Mäuseherzen wieder (Kupatt, 2002b).

1.4.3 Die Transmigration

Die adhärenen Leukozyten wandern nun in das subendotheliale Bindegewebe zum Ort der Inflammation. Dies wird vor allem vermittelt durch chemotaktische Gradienten, die von Entzündungsherden ausgehen, aber auch durch ICAM-1 und PECAM-1, die an den interzellulären Kontaktstellen der Endothelzellen lokalisiert sind.

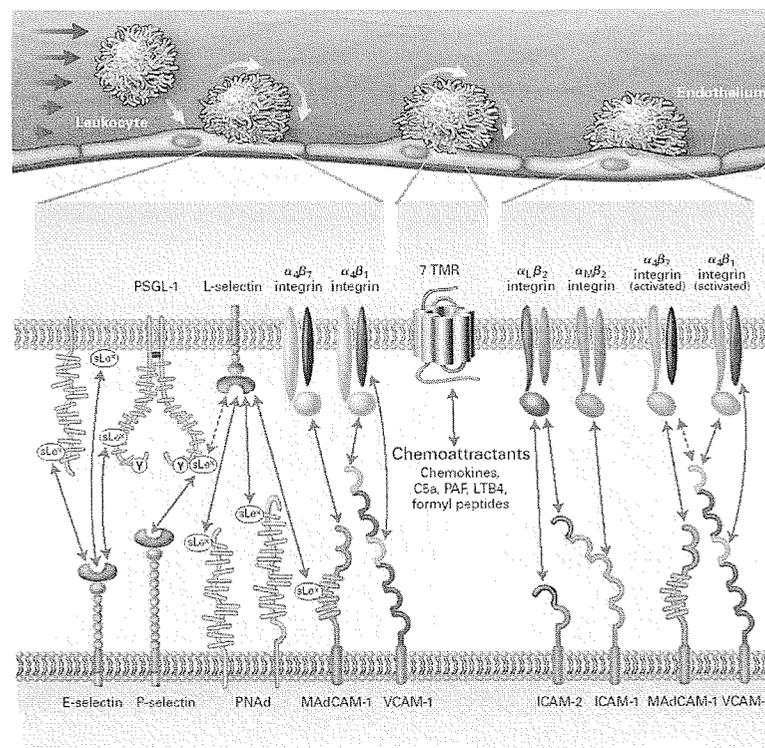


Abb. 1.2 Schrittweise Endothelaktivierung und die daran beteiligten Adhäsionsmoleküle (entnommen aus dem New England Journal of Medicine, Andrian, 2000)

1.5 Phasenverlauf der Endothelaktivierung

Die endotheliale Aktivierung lässt sich in zwei Phasen aufteilen: die Regulation der Adhäsion kann entweder rasch (akute endotheliale Aktivierung, Typ I) oder protrahiert (subakute endotheliale Aktivierung, Typ II) verlaufen (Pober, 1990). Die akute endotheliale Aktivierung wird durch posttranslationale Modifikation gespeicherter Proteine bewirkt. Für die subakute Aktivierung der Endothelzellen ist die transkriptionelle Aktivierung charakteristisch. In dieser Phase, die einige Stunden nach Stimulation beginnt, wird die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selektin gesteigert (Kukielka, 1994; Zund, 1996). Dieser Prozess ist verantwortlich für die Dauer der therapeutisch relevanten Leukozytenrekrutierung bei myokardialer Reperfusion (1-2 Tage, Simpson, 1988; Flynn, 1996).

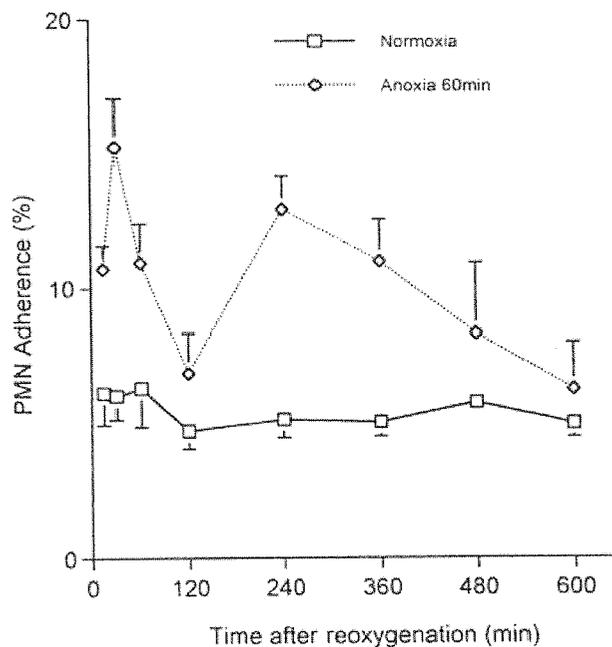


Abb. 1.3 Zweiphasiger Verlauf der Endothelaktivierung nach 60minütiger Anoxie (entnommen aus *Circulation Research*, Ichikawa, 1997)

1.5.1 Die Akute Phase (Typ I)

Die akute Phase der Aktivierung von Endothelzellen ermöglicht eine schnelle Adhäsion von PMN am Endothel. Diese ist gekennzeichnet durch die Freisetzung bereits bestehender Mediatoren (PAF, Leukotriene, Xanthinoxidase), der Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (H_2O_2) und der posttranslationalen Modifikation bereits gespeicherter Proteine aus dem Endothel. Sie führt zum Phänomen der so genannten Mikrozirkulationsstörung. Dieses Ereignis tritt sehr rasch (innerhalb von Sekunden bis Minuten) nach Endothelzellstimulation ein (Nawroth, 1993; Ichikawa, 1997).

1.5.2 Die Subakute Phase (Typ II)

Die subakute endotheliale Aktivierung hingegen ist bestimmt von Veränderungen auf zellulärer Transkriptionsebene und damit der Neusynthese von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und E-Selektin. Dafür bedarf es der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF κ B (Nuclear Factor κ B). NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der als Verstärker der κ -Leichtketten-Transkription in B-Zellen identifiziert wurde (Sen, 1986). Fünf Untereinheiten (rel-A oder p65, rel-B, rel-C, p50, p52) sind bekannt, die entweder als Homo- oder als Heterodimere die Transkription von proinflammatorischen Genen (z.B. Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Chemokinen) erhöhen. Intrazellulär regulieren IKK α und IKK β nach adäquater Stimulation die Phosphorylierung und die anschließende Ubiquitinierung und Proteolyse von I κ B α , dem zytosolischen Inhibitor von NF κ B (Karin, 1999). Dadurch wird die Translokation von NF κ B in den Zellkern und die Bindung an doppelsträngige Kern-DNA mit einer definierten Bindungssequenz ermöglicht (Chen, 1998, vgl. Material und Methoden 3.6).

Die Aktivierung von IKK α und IKK β , die zur Phosphorylierung von I κ B α führt, ist durch eine Reihe unterschiedlicher Induktoren möglich. So können zum einen Zytokine wie TNF α und Interleukin-1 ihr Aktivierungssignal nach Rezeptorbindung durch TNF-Receptor Associated Factors weiterleiten (TRAF2 und TRAF 6, Pomerantz, 1999). Auch Wachstumsfaktoren wie basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Insulin Like Growth Factor 1 (IGF-1) aktivieren nach Rezeptorbindung diese Signalkaskade. Sie führt über das G-Protein ras, die Phosphorylierung der Phosphoinositol-3 Kinase (PIP-3-Kinase) und die Proteinkinase B (AKT, Romashkova, 1999) zur so genannten NF κ B Inducing Kinase (NIK, Woronicz, 1997). Zur Aktivierung des IKK-Komplex ist das Zusammenspiel der genannten Faktoren essentiell (Ozes, 1999). Ein vorbeschriebener, alternativer Aktivierungsweg über die NF κ B Activating Kinase (NAK, Tojima, 2000) gilt heute dagegen als umstritten.

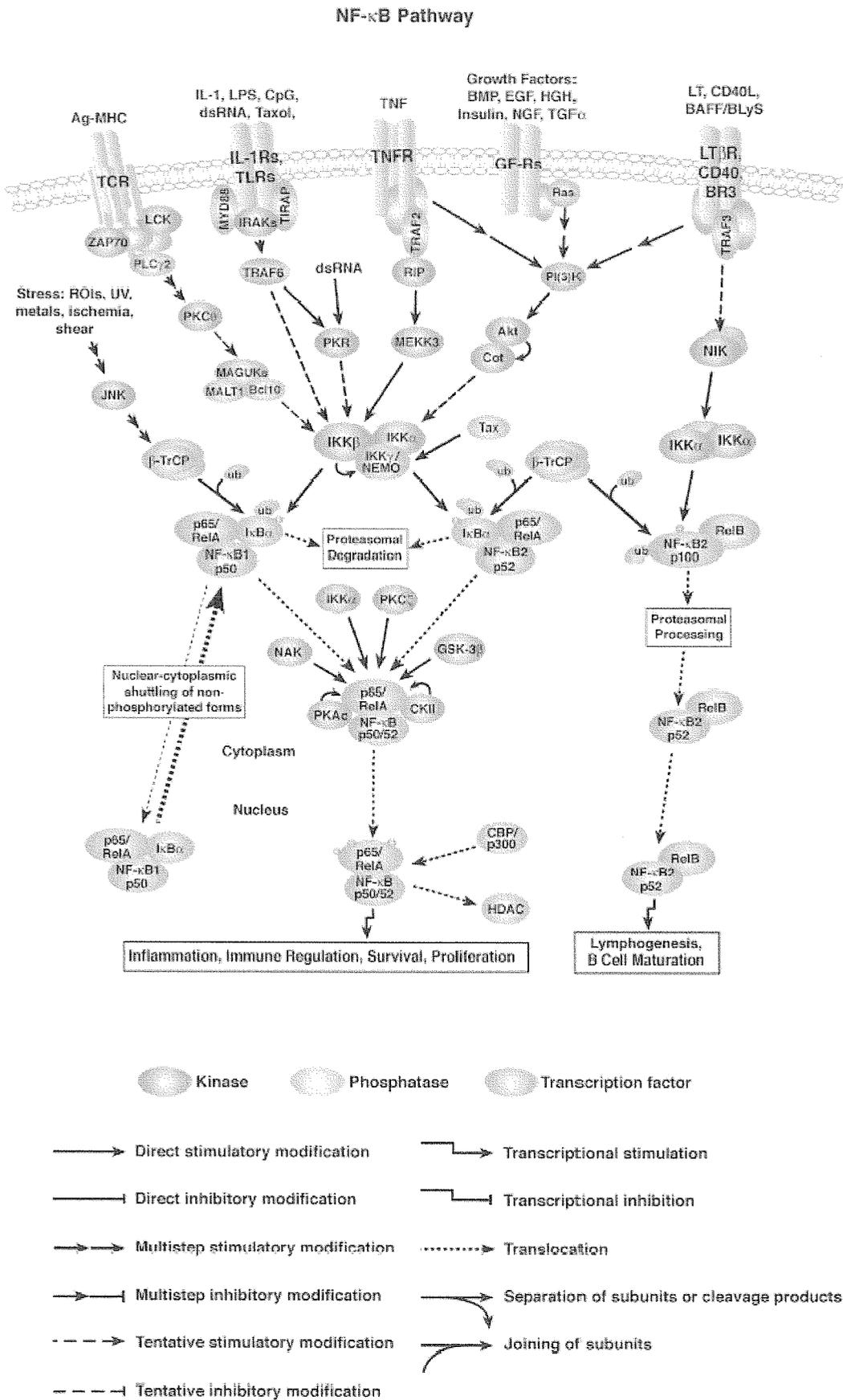


Abb. 1.4 Die Zellsignalkaskade um NFκB (modifiziert nach T. Gilmore, Universität Boston und Cell Signaling Technology, Beverly, USA, 2002)

1.6 Der Myokardiale Reperfusionsschaden

Der plötzlich eintretende Verschluss einer Koronararterie bedeutet für das dahinter liegende Gewebeareal eine akute Verschlechterung seiner Kontraktilität und, bei längerem Fortbestehen, den Eintritt von Zelltod und Vernarbung dieses Myokards. Deshalb muss das vorrangige, therapeutische Ziel bei Myokardischämie die Wiedereröffnung und Reperfusion des verschlossenen Koronargefäßes sein. Allerdings kann diese postischämische Reperfusion einen von der ischämischen Schädigung abgrenzbaren Schaden verursachen, den so genannten Reperfusionsschaden. Am Herzen tritt die Situation der Reperfusion nach Thrombolysen oder PTCA (Perkutane transluminale Koronarangioplastie) bzw. Stentimplantation einer Koronararterie sowie in der Bypass-, Klappen- und Transplantationschirurgie auf.

Auch wenn am Menschen aufgrund methodischer Limitation das Ausmaß des myokardialen Reperfusionsschadens nicht bekannt ist, weisen Tiermodelle *in vivo* und *ex vivo* auf die Relevanz dieses Prozesses hin. Beispiele sind eine reversible, zusätzliche Einschränkung der Herzmuskelfunktion (myokardiales Stunning, Braunwald, 1982), eine endotheliale Dysfunktion (Seccombe, 1995), Mikrozirkulationsstörungen (Maes, 1995) und eine Vergrößerung des Infarktgebietes durch die Reperfusion (Jennings, 1985).

Leukozyten emigrieren typischer Weise in das infarzierte Myokardparenchym, um die entstandene Nekrose abzuräumen. Dieser Reparaturvorgang ist notwendig: wenn die Leukozytenemigration gehemmt wird (z.B. durch Blockade von Metalloproteinasen, die extrazelluläre Matrix destruieren), findet sich neben einer fehlenden Narbenbildung eine deletäre Myokardfunktion (Heymans, 1999). Insofern sind beim dauerhaften Koronarverschluss starke chemotaktische Stimuli erforderlich, um Leukozyten aus der Infarkttrandzone zu rekrutieren.

Bei Wiedereröffnung des Infarktgefäßes verändert sich die Situation deutlich: nun adhären Leukozyten rasch an den Endothelzellen des reperfundierten Areals. Von hier aus sind die Emigrationsstrecken und -zeiten kürzer als von der Infarkttrandzone, sodass die chemotaktischen Stimuli möglicher Weise zu leukozytenabhängigen Schäden führen. Tatsächlich kann der myokardiale Reperfusionsschaden durch Inhibition der Leukozytenadhäsion (Flynn, 1996) und der gleichzeitig auftretenden Interaktion mit Thrombozyten (Andrian, 1991) gehemmt werden. Eine Begrenzung der postischämischen Inflammation erscheint daher als eine Therapieoption des Reperfusionsschadens.

2 Zielsetzung

Die Ausbildung des Ischämie-Reperfusionsgeschehens am Endothel kann in eine akute Phase (nach Sekunden bis Minuten) und eine subakute Phase (nach Stunden bis Tagen) unterschieden werden (Ichikawa, 1997). Klinisch existieren bereits zahlreiche therapeutische Ansätze, die akute Endothelaktivierung (Mikrozirkulationsstörungen, Freisetzung von Mediatoren, Proteinen und Sauerstoffradikalen) zu antagonisieren. In diesem Zusammenhang sind die Thrombozytenaggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure, der ADP-Rezeptorantagonist Clopidogrel und die GpIIb/IIIa-Antagonisten Abciximab und Tirofiban zu erwähnen. Für den subakuten Prozess bedarf es dagegen einer Hochregulation von Transkriptionsfaktoren sowie der Neusynthese von Mediatoren und Proteinen. Bislang sind noch keine spezifischen Therapieansätze etabliert, diesem subakuten Ischämie-Reperfusionsschaden zu begegnen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Strategie zur Hemmung von NF κ B, einem für die subakute Endothelaktivierung verantwortlichen Transkriptionsfaktor, zu etablieren. Für diesen Zweck werden drei grundsätzliche Arbeitsschritte durchgeführt: zunächst soll ein Endothelzellmodell und die geeigneten Transfektionsverfahren gefunden werden. Eingesetzt werden dann Reporterengenkonstrukte für die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 bzw. E-Selektin, die (gekoppelt an Luciferase) luminometrisch gemessen werden können. Anschließend soll das Verhalten dieser, bekannter Maßen NF κ B-sensitiven Reporterengenkonstrukte untersucht werden: Positivkontrolle ist dabei die Stimulation mit Zytokin (TNF α) gegenüber der mit PMN bzw. Thrombozyten. Durch Anwendung von Hypoxie und Reoxygenierung wird eine dem Reperfusionsgeschehen vergleichbare Modellsituation geschaffen.

Im zweiten Abschnitt wird dann die Beeinflussbarkeit dieser NF κ B-Aktivierung untersucht. Einerseits werden die Effekte von u.a. Abciximab (Reopro) und Tirofiban (Aggrastat) auf den Adhäsionsprozess betrachtet. Andererseits soll dann mittels Transfektion so genannter Decoy-Oligodinukleotide (ODN) eine Blockade der NF κ B-Kaskade auf Transkriptionsebene stattfinden und die entsprechenden Auswirkungen auf die ICAM-1 bzw. E-Selektin-Expression beobachtet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkulturen

3.1.1 HMEC

Diese Zelllinie humaner, mikrovaskulärer Endothelzellen (CDC-HMEC-1) wurde über das Center of Disease Control, North Carolina, USA bezogen (Ades, 1992; Xu, 1994).

3.1.2 HUVEC

Primäre Endothelzellen der humanen Umbilikalvene wurden von PD Dr. S. Zahler vom Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der LMU München zur Verfügung gestellt.

3.1.3 NECR und Isolationsprotokoll

Primäre, neonatale Endothelzellen der Ratte aus einem eigenen Isolationsprotokoll: den isolierten Rattenherzen wurde die Aorta kanüliert und 5min mit PBS+Ca²⁺ perfundiert. Auf Ventilebene wurde der rechte Ventrikel entfernt, die linke Herzhöhle eröffnet, 30sec in 80% Ethanol getaucht (Endokardentfernung) und in Ca²⁺-freiem PBS gewaschen. Die epikardiale Muskelschicht mit makrovaskulärem Muskelgewebe wurde entfernt, gewaschen und zerkleinert. Dann wurde das Gewebe zum Verdau überführt (25min mit 1mg Kollagenase A, Gibco). Anschließend wurde das Zellpellet gewaschen (Ca²⁺-freies PBS) und zentrifugiert (120xg, 5min). Die gewonnenen Zellen wurde in DMEM (cc-pro, 5–10% FCS, 10ml L-Glutamin, Antibiotikum) in Laminin-beschichteten Schalen (P 100) ausgesät.

3.1.4 Medien, wichtige Materialien und Routinen

HMEC und HUVEC wurden in MCDB-131-Medium (Gibco™ Invitrogen) mit 5–10% FCS (Sigma-Aldrich), 50–200ng/ml EGF (Sigma-Aldrich) und 1µg/ml Hydrocortison (Aventis), die NECR in DMEM-Medium (Gibco™ Invitrogen) mit 10% FCS und jeweils 5mg/l Gentamicin (Bayer) kultiviert. Zellpassagen fanden jeweils nach 3–5 Tagen statt, bei NECR und HUVEC waren maximal 6–8, bei der HMEC-1-Zelllinie bis zu 20 Passagen möglich.

3.2 Transfektionsmethoden

3.2.1 HVJ-Liposomen und Herstellungsprotokoll

Der verwendete Sendai-Virus (Stamm Sendai 52) stammte ursprünglich aus dem Lungengewebe einer schwer verlaufenen Newborn-Pneumonitis in Japan 1952 (Kuroya, 1953; Jensen, 1955; Andrewes, 1973).

Für die Virusamplifikation wurde in 9 Tage alte Hühnerembryonen (Institut für Geflügelkrankheiten, LMU München) je 1 HAU (Hämagglutinating Unit) des HVJ-Impfvirus injiziert und im Wärmeschrank (37 °C) über 3–4 Tage bebrütet, bis 10ml der virushaltigen Allantois pro Ei abziehbar waren. Die Viruskonzentration wurde mittels HAG (Hämagglutinations)-Test (Salk, 1944) bestimmt (Virusproteine binden dabei an Erythrozyten und vernetzen diese). Dafür wurde in 96-well-Platten (Nunclon) mit jeweils 50µl PBS eine 1:2-Verdünnungsreihe angelegt. 50µl zugegebenes Erythrozytenkonzentrat (Blutgruppe 0, Klinikum München-Großhadern) zeigte nach 30min (bei RT) in denjenigen Verdünnungsreihen ein Absinken auf den Gefäßboden, wo die Sendai-Viruskonzentration keine ausreichende Vernetzung aufwies.

Für die Aufreinigung wurde die frische Allantois zentrifugiert (27.000xg, 30min, 4 °C), gewaschen im UV-Crosslinker (Stratagene) bei 180.000µJoule/cm³ für 3–5min attenuiert. Damit war die Sendai-Virushülle separiert. Zur Liposomenherstellung wurden 20mg lyophilisiertes Cholesterin und 48mg Phosphatidylcholin in 1ml Tetrahydrofuran gelöst (Sigma-Aldrich), in 0,9ml wurden 0,1ml NaPS-Puffer (Natriumpersulfat-Puffer aus 10mM Na₂HPO₄, 50mM Na₂SO₄ und 1mM Dipalmitoyl, Sigma-Aldrich) gegeben und in 10mg-Portionen-Schliffgläsern unter Argondecke gelagert (–80 °C).

Für die Liposomen-DNA-Mischung wurden 10mg Lipid, 5ml Ether und 200µl DNA gevortext, im Ultraschallbad, unter der Vakuumpumpe (PIAB) und Argon emulgiert, erneut im Ultraschallbad eingedickt und mit 100–200µl BSS-Puffer (Bis(trimethylsilyl)sulfat-Puffer aus 1M NaOH und 1M H₂SO₄) versetzt. Für das anschließende „coating“ mit den Virushüllproteinen wurden 100.000 HAU Virussuspension 10min auf Eis inkubiert und 60min bei 37 °C geschüttelt (250rpm). Nach Ultrazentrifugation (30.000xg, 60min, 4 °C) über einen 60%iger Saccharose-Dichtegradienten (Saccharose in BSS-Puffer, Sigma-Aldrich) fand sich die gebundene Virosomenmischung typischer Weise in der mittleren der drei Phasen.

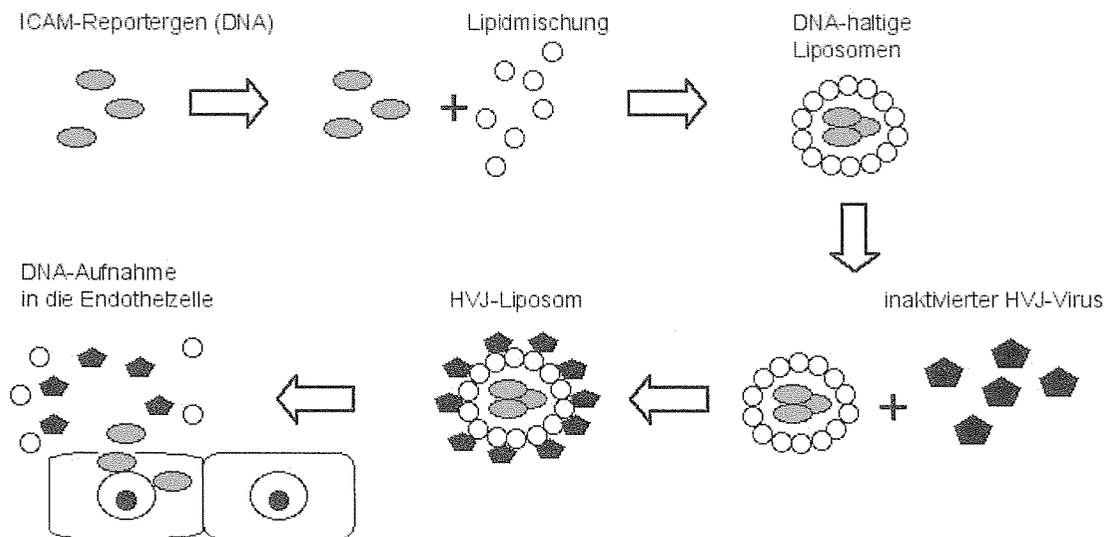


Abb. 3.1 Prinzip der Herstellung und Transfektion mittels HVJ-Liposomen

3.2.2 SuperFect™

Das SuperFect™-Transfektionsreagenz (Qiagen) besteht aus langen, aktivierten Dimeren: die sternförmig angeordneten Seitenketten tragen dabei kationische Aminogruppen, an denen die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nucleinsäuren binden können. Die DNA wird damit in kompakte Vesikel verpackt und in einer Liposomenmischung emulgiert. Nach Aufnahme in die Zelle werden durch pH-Verschiebung die lysosomalen Nucleasen gehemmt und die DNA zum Zellkern transportiert. Die Zellen wurden zur Transfektion mit 0,5% FCS-haltigem und antibiotikafreiem Medium versorgt, 6h nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel auf Normalmedium gemacht und die Zellen für weitere 24–48h inkubiert.

3.2.3 Effectene™

Das Transfektionsreagenz Effectene™ (Qiagen) stellt kein liposomales System dar, sondern spezielle Transfektionsmoleküle, einen DNA-kondensierenden Enhancer und einen DNA-Puffer. Der Puffer ermöglicht die Salzbedingungen zum Komplexbilden der DNA mit dem Enhancer, das dann vom kationischen Transfektans umhüllt wird. Nach Evaluation aller Reagenzien wurden sämtliche Experimente mit diesem Transfektionssystem durchgeführt.

3.3 Reportergerkonstrukte

3.3.1 Renilla- und Firefly-Luciferase

Als Kontrollreporter der Transfektionseffizienz diente die pRL- (Renilla-Luciferase, Promega). Die Renilla-Luciferase ist ein 36kDa monomerisches Protein, das für seine Aktivierung keine posttranslationale Modifikation benötigt. Dadurch hat es die Funktion eines Genreporters auf der Stufe der Translation. Zum Einsatz kamen zwei verschiedene Subtypen des pRL-Vektors: der pRL-CMV-Vektor mit einem CMV (Cytomegalievirus) Promoter und der pRL-TK-Vektor mit einem Herpes Simplex Thymidinkinase (HSV-TK) Promoter.

Die Firefly-Luciferase ist zwar ein größeres Molekül (61kDa, monomerisch), besitzt aber im wesentlichen die der Renilla-Luciferase vergleichbaren Eigenschaften. Der ausschlaggebende Unterschied beider Luciferase-Systeme besteht jedoch in ihrem unterschiedlichen pH-Optimum der Enzymreaktion, was eine parallele, luminometrische Messung beider Parameter innerhalb der selben Probe ermöglicht (vgl. Material und Methoden 3.7.2).

3.3.2 pICAM-1-Reportergerkonstrukt

Die Analyse des ICAM-1-Transkriptionsverhaltens wurde durch Promoter-Reportergerkonstrukte unterschiedlicher Länge ermöglicht: zum Einsatz kamen ICAM-1-Promoterteilstücke mit 34, 174, 277 und 339 Basenpaaren, wobei die beiden längeren Plasmide pICAM-277 und pICAM-339 als wesentliche Eigenschaft eine NF κ B-Bindungssequenz besaßen. Durch Kopplung an eine Firefly-Luciferase waren diese mittels Chemolumineszenz messbar. Die ICAM-1-Reportergerkonstrukte wurden zunächst in humane Endothelzellen (HMEC und HUVEC), später dann auch in neonatale Rattenendothelzellen (NECR) transfiziert.

3.3.3 pE-Selektin-Reportergerkonstrukt

Es wurden auch Reportergerkonstrukte zur Messung der E-Selektin-Expression verwendet (V.R. Baichwal, Tularik Inc., South San Francisco, USA). Analog zu den ICAM-1-Reportern besaßen diese unterschiedliche Länge (full length, LS-112, LS-51 und LS-48 Basenpaare). Nur die längeren (full-length und LS-112) waren mit einer NF κ B-Bindungssequenz versehen.

3.4 Endothelaktivierung

3.4.1 Hypoxie und Reoxygenierung

Für die Induktion von Hypoxie (über 24h) kam balancierter Stickstoff (95% N₂, 5% CO₂), zur Reoxygenierung (über 4h) Carbogen (95% O₂, 5% CO₂, jeweils Linde) zum Einsatz. Ein spezielles Schlauchsystem (Ø 10mm) führte über eine Wasserfalle zum Wärmeschrank (37 °C), in dem eine luftdicht verschließbare Zellkammer mit der 12-well-Kulturplatte stand.

3.4.2 Leukozyten, Thrombozyten und Fibrinogen

Um die Reperfusionssituation in vivo in unserem in vitro Zellkulturmodell zu imitieren, wurden zum Zeitpunkt der Reoxygenierung Blutzellen appliziert, wobei jeweils Leukozyten (500.000/ml Medium), Thrombozyten (20.000.000/ml Medium) und Fibrinogen (10µl/ml Medium, Sigma-Aldrich) zugesetzt wurden. Nach Applikation wurden die Kulturschalen zentrifugiert (500xg, RT, 2min), nach 15min die nicht adhärenen Zellen zweimal durch waschen mit PBS entfernt und frisches Medium (2ml/well eines 12-well-plates) aufgebracht (vgl. Abb. 3.2).

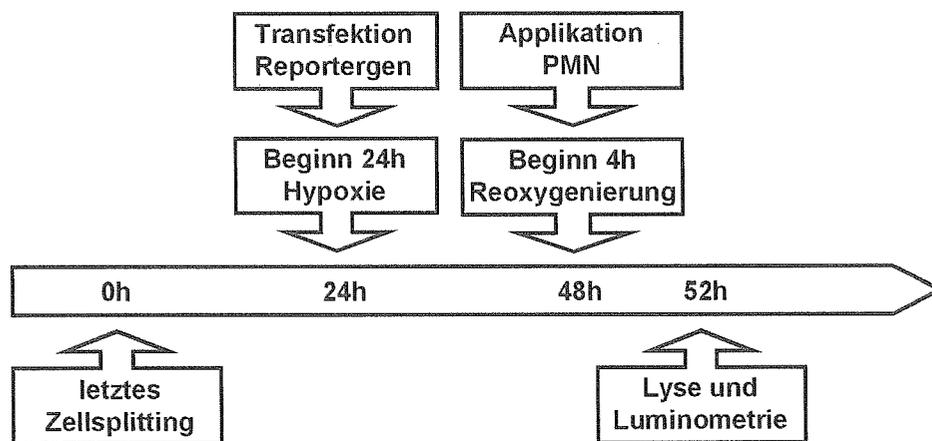


Abb. 3.2 Zeitschema von Transfektion und Stimulation beim Hypoxie-Reoxygenierungsmodell

3.4.2.1 Isolation von Leukozyten und Thrombozyten aus peripherem Blut

Jeweils 10ml Vollblut eines gesunden Spenders wurden mit 1ml EDTA (0,1M) versetzt und zentrifugiert (400xg, ungebremst, 9 °C, 15min). Das thrombozytenhaltige Plasma (obere Phase) wurde abgezogen und pelletiert (400xg, 9 °C, 5min, gegen Zellverklumpung 100µl EDTA). Pro Falcon wurden 2ml des so genannten „buffy-coat“ (weißliche Zwischenphase) abgezogen und mit 2ml PBS (0,1% EDTA) versetzt. Das Plasma wurde dekantiert und das Thrombozytenpellet mit 10ml PBS ohne Ca²⁺ gewaschen (400xg, 9 °C, 5min), der Überstand abgezogen und das trockene Thrombozytenpellet in einer definierten Menge PBS gelöst.

3.4.2.2 Isolation mononukleärer Zellen (PMN) mittels Perkoll

Grundprinzip war die Zentrifugation über den Dichtegradienten eines Perkoll-Reagenz (Pharmacia LKB, Upsala, Schweden), wodurch sich die PMN-Population aufgrund ihres morphologischen Größenunterschieds separierte und eine eigene Phase bildete. Es wurden jeweils 25ml des Perkoll-Reagenz mit 5ml 1,5M NaCl-Lösung und 20ml Aqua dest. zur Perkoll-Mischung angesetzt. Auf 4–6ml der Perkoll-Mischung wurde der mit PBS versetzte „buffy-coat“ aus Leukozyten aufgeschichtet und zentrifugiert (400xg, ungebremst, 9 °C, 25min). Der Überstand (Monozyten und Lymphozyten) wurde verworfen, das Sediment mit je 10ml PBS gewaschen und zentrifugiert (400xg, 9 °C, 10min). Die verbliebenen Erythrozyten wurden mit 5ml Aqua ad Injectionem lysiert und anschließend mit der gleichen Menge NaCl-Lösung retonisiert (evtl. Wiederholung der Lyse mit erneutem Waschschrift). Das PMN-Pellet wurde in einer definierten Menge PBS gelöst und im Zellcoulter Counter (BD) gezählt.

3.4.2.3 Isolation CD11b-positiver Zellen mittels magnetisierbarer Antikörper

Grundprinzip dieser Miltenyi-Isolationsmethode war die Verwendung eisenkonjugierter CD11b-Antikörper gegen den humanen MAC-1-Rezeptor auf Leukozyten. Dieser Antikörper war mit kolloidalen, „superparamagnetischen“ Mikroperlen konjugiert, die einen mittleren Durchmesser von 30–60nm besaßen. Nach Inkubation mit dem „buffy-coat“ wurde die Zellsuspension über spezielle Magnetsäulen (MiniMACS™) geschickt. Darin adsorbierten die mit eisenkonjugierten Antikörper besetzten CD11b-positiven Zellen, nach Lösen des Magneten wurden diese in einer definierten Menge PBS eluiert (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

3.5 Inhibitionsagentien

3.5.1 CD18-Antikörper (IB4) und 11H6-Kontrollantikörper

Zur Untersuchung der direkten, zellvermittelten Interaktionen zwischen PMN und Endothelzellen wurden Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle eingesetzt. Die als Sticking bezeichnete Bindung wird vermittelt durch β 2-Integrin (CD11a/CD18) und MAC-1 (CD11b/CD18) der PMN und ICAM-1 der Endothelzellen. Diese Bindung blockiert der CD18-Antikörper (IB4), der mittels einer Hybridomzellkultur produziert wurde (verwendete Konzentrationen 10 μ g/ml Medium). Zur Kontrolle wurde der 11H6-Antikörper eingesetzt, der zwar spezifisch an CD18 bindet, jedoch nicht die ICAM-1-Bindungsdomäne blockiert.

3.5.2 Tirofiban-HCl (Aggrastat)

Tirofiban-Hydrochlorid (Aggrastat, MSD) ist ein Glykoprotein (Gp) IIb/IIIa-Inhibitor bzw. Thrombozytenblocker, der auf Basis eines in Schlangengift enthaltenen, antikoagulatorisch wirksamen Proteins (Echistatin) synthetisiert wurde. GpIIb/IIIa wird durch zahlreiche Faktoren wie ADP, Thrombin, Kollagen, Serotonin, Thromboxan A2 oder Epinephrin aktiviert und ermöglicht dadurch die Thrombozytenadhäsion, die durch reversible Blockade von Tirofiban-HCl an GpIIb/IIIa verhindert wird (eingesetzte Konzentration 10 μ g/ml Medium).

3.5.3 Abciximab (ReoPro)

Bei Abciximab (Reopro) der Firma Lilly handelt es sich ebenfalls um einen GpIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten, der allerdings auf der Basis eines chimerischen GpIIb/IIIa-Antikörpers wirkt (Fab-Fragment). Abciximab bindet im Gegensatz zu Tirofiban (Aggrastat) irreversibel auch an den Vitronektin-Rezeptor auf Thrombozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Zudem kann es am MAC-1-Rezeptor binden und hat damit auch einen Effekt auf Leukozyten (eingesetzte Konzentrationen 10 μ g/ml Medium).

Um der physiologischen Situation am ehesten gerecht zu werden, wurden die Antikörper bzw. Aggrastat oder ReoPro zum Zeitpunkt der Reoxygenierung zugesetzt und nach Abwaschen nicht-adhärenter PMN bzw. Thrombozyten (vgl. Schema Abb. 3.2).

3.6 Prinzip der NF κ B-Decoy-ODN-Transfektion

Im Ruhezustand ist I κ B (α - und β -Untereinheit) an den NF κ B-Komplex gebunden und verhindert dessen Aktivierung bzw. den Transfer zum Zellkern (I κ B-Inhibition). Nach Aktivierung z.B. durch Zytokin oder Wachstumsfaktoren kommt es jedoch zur Abspaltung, Phosphorylierung und Degradation dieser I κ B-Untereinheit, die Voraussetzung für eine Translokation in den Zellkern und die konsekutive ICAM-1-Transkription ist (vgl. Abb. 3.3 links).

Bei Transfektion so genannter NF κ B-Decoy-Oligodinukleotide (ODN) besetzen diese nach NF κ B-Aktivierung teilweise die entsprechende DNA-Bindungssequenz am NF κ B- bzw. IKK-Komplex (Ködereffekt). Die so genannte NLP (nuclear localisation sequence) bleibt davon unbeeinträchtigt, wodurch zwar noch die Translokation in den Zellkern, jedoch keine konsekutive ICAM-1-Transkription mehr möglich ist (vgl. Abb. 3.3. rechts). Bei den NF κ B-Decoy-Oligodinukleotiden (ODN) handelt es sich um doppelsträngige, kurzkettige (22 Basenpaare) DNA-Moleküle (MWG-Biotech, München).

Als Untersuchungsparameter dienten in diesem Modell ICAM-1- bzw. E-Selektin-Reporter-genkonstrukte (vgl. Material und Methoden 3.3.2 und 3.3.3), die Auskunft gaben über die nach Endothelaktivierung entsprechend veränderte ICAM-1- bzw. E-Selektin-Transkription.

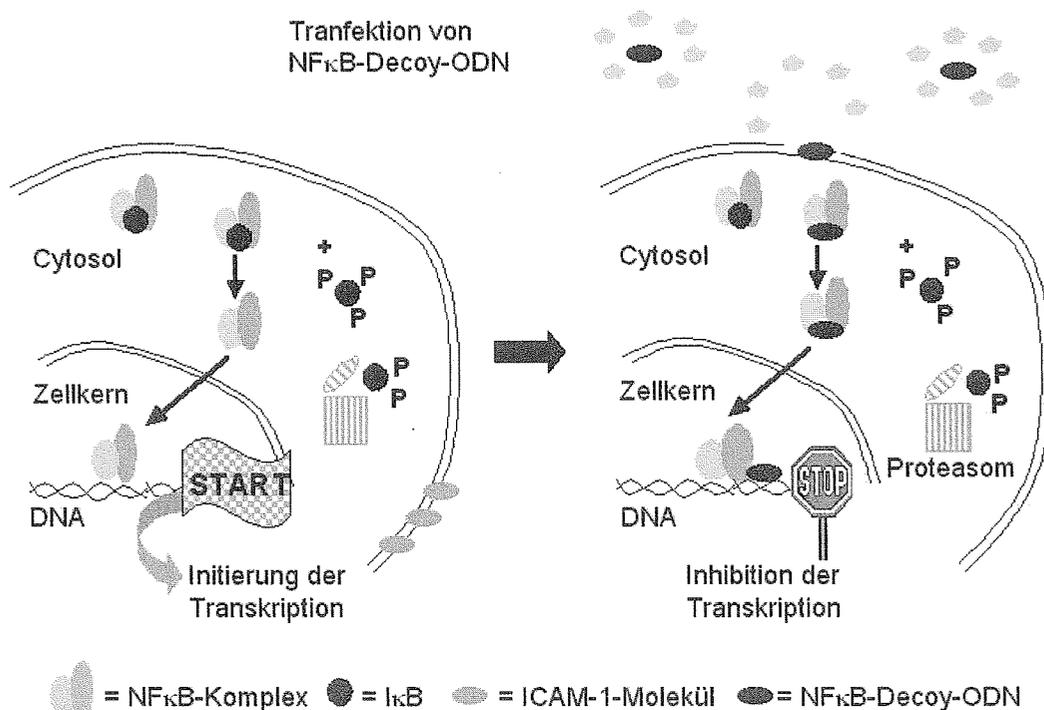


Abb. 3.3 Prinzip der NF κ B-Decoy-ODN-Transfektion zur Hemmung der endothelialen ICAM-1-Synthese

3.6.1 NF κ B-Decoy-ODN

Der Transkriptionsfaktor NF κ B (Nuklear Factor κ B) wurde als Verstärker der κ -Leichtketten-Transkription in B-Zellen identifiziert. Es sind 5 Untereinheiten (rel-A, p65, rel-C, p50 und p52) bekannt, die entweder als Homo- oder Heterodimere die Transkription von geeigneten Genen verstärken oder, im Ausnahmefall, verringern können. Die 22 Basenpaarsequenz der NF κ B-Decoy-ODN ist 5'-AGT TAG GGG GAC TTT CCC AGG C-3', wobei der unterstrichene Teil der Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF κ B entspricht und die Reihenfolge dem 5'-Strang.

3.6.2 PT-veresterte Decoy-ODN

Es wurden auch speziell modifizierte Decoy-Oligodinukleotide verwendet: die Konstrukte für NF κ B trugen zusätzlich einen Phosphat- und Schwefelteil (Phosphothioat), der nach Transfektion in die Zelle den dortigen Abbau des Decoy-ODN durch DNAsen und Lysosomen verhindern sollte (Iversen, 1991).

3.6.3 Kontroll-Decoy-ODN

Als Kontrollnukleotide wurden zwei Oligonukleotide verwendet, die durch multiple Mutation der Basenpaarsequenz die DNA-Bindung von NF κ B verhinderten. Zum Einsatz kamen so genannte „scrambled oligos“ (sinnlos kombinierte Basenpaare, 5'-ATA AAG CGA AAC TAG CAG CAG TTT C-3') und eine mutierte NF κ B-Sequenz, die durch mehrere Punktmutationen keine NF κ B-DNA-Bindung mehr zuließ (5'-GGT TAC AAC TCA CTT TCC GCT G-3').

3.7 Auswertungsverfahren

3.7.1 Pierce-Proteinbestimmung

Zur Quantifizierung der vorhandenen Proteinmengen im Versuchsansatz wurde mit dem Zelllysate eine Proteinbestimmung nach Pierce durchgeführt: für diese Messung wurden Zell-Kernlysate mit jeweils 100 μ l Triton-X-Lyse-Puffer pro 12-well verwendet. Als Messstandard dienten 10 μ l BSA (Bovines Serum Albumin, Sigma-Aldrich). Die Auswertung (Proteinmengen in mg/ml) erfolgte im ELISA-Reader (Amersham) bei 562nm (vgl. Material und Methoden 3.7.3).

3.7.2 Chemolumineszenzmessung

Zur Auswertung wurde der Dual-Luciferase Reporter Assay (DLR™, Promega) verwendet. Die Lumineszenz wurde mit einem Einzelproben-Luminometer (Eppendorf) gemessen. Durch das unterschiedliche pH-Optimum der Renilla- bzw. Firefly-Luciferase konnte innerhalb der gleichen Probe gemessen werden (Messzeit 2sec für Renilla-Luciferase und 10sec für Firefly-Luciferase), jede Probe wurde dreifach bestimmt (vgl. Material und Methoden 3.3).

3.7.2.1 Chemische Grundlagen

Bei der Firefly-Luciferasereaktion (Enzymsystem des Glühwürmchens, engl. Beetle) entsteht aus Luciferin unter Anwesenheit von ATP, O₂ und Mg²⁺ durch Oxidation Oxyluciferin, AMP, freies Phosphat, CO₂ und ein Lichtblitz, der nach Mischen von Enzym und Substrat rasch einsetzt und luminometrisch messbar ist. Für eine optimierte Reaktionskinetik enthielt das Substrat des DLR™-Assays CoenzymA.

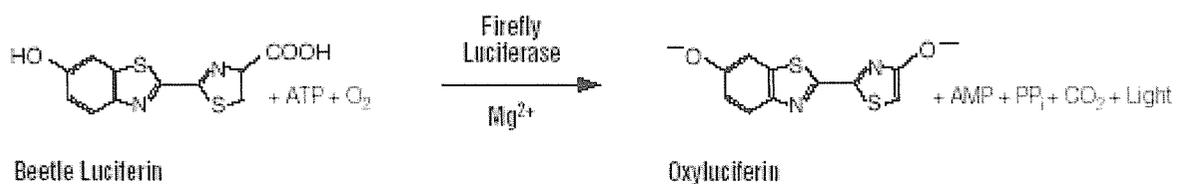


Abb. 3.4 Die Firefly-Luciferase-Reaktion: aus Luciferin entsteht Oxyluciferin und ein Lichtblitz (entnommen aus dem Herstellerprotokoll des DLR™ Assays, Promega)

Bei der sehr ähnlich verlaufenden Renilla-Luciferasereaktion (Enzymsystem aus dem Meeresorganismus *Renilla reniformis*, Seegurke) wird Coelenterazin unter O₂ in Coelenteramid, CO₂ und wiederum einen luminometrisch messbaren Lichtblitz umgesetzt. Coelenterazin entwickelt in wässriger Lösung und manchen Detergenzien (z.B. Triton-X) Autolumineszenz, was die Sensitivität im unteren Messbereich beeinträchtigte und weshalb die Proben vor der Chemolumineszenzmessung nur im PLB-Puffer (Promega) angesetzt wurden.

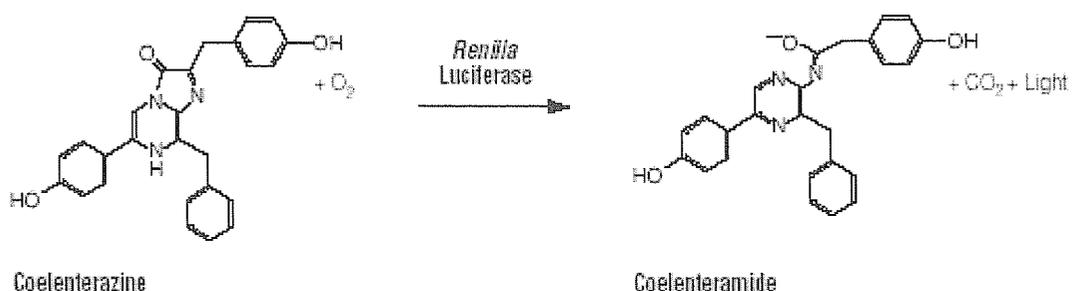


Abb. 3.5 Die Renilla-Luciferase-Reaktion: aus Coelenterazin entsteht Coelenteramid und ein Lichtblitz (entnommen aus dem Herstellerprotokoll des DLR™ Assays, Promega)

3.7.2.2 Probenvorbereitung und Ablauf der Messung

Es wurden jeweils Stammlösungen für die Luciferase Assay Reagenz II (kombiniertes Luciferin- und Coelenterazin-Substrat) und die Stop-&-Glow Lösung (pH-Verschiebung) angesetzt. Die Proben mit jeweils 100µl Zellysat in PLB-Puffer (Promega) und auf Eis wurden in 1,5ml Eppendorf-cups zentrifugiert (5.000xg, 4 °C, 1min), bevor sie zur Messung überführt wurden.

In die Messröhrchen wurden 100µl LAR II (Enzymsubstrat) vorgelegt, die Probe dazu pipettiert (möglichst rasches, probensynchrones Pipettieren und zeitgleiche Messungen) und zur ersten, 2sec Messung (Firefly-Luciferase) überführt. Im Anschluss wurden 100µl Stop-&-Glow Reagenz dazu pipettiert (pH-Verschiebung) und jede Probe direkt der zweiten, 10sec Messung (Renilla-Luciferase) unterzogen (vgl. Abb. 3.6).

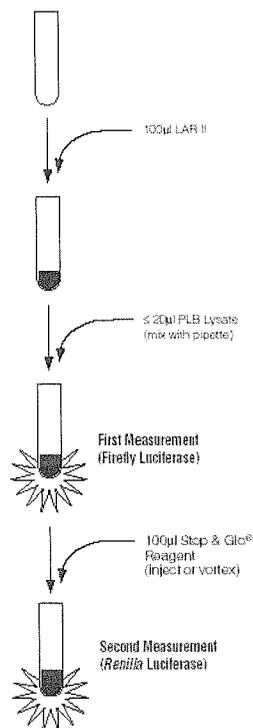


Abb. 3.6 Schematische Darstellung des Messablaufs beim Dual-Luciferase Reporter-Assay (entnommen aus dem Herstellerprotokoll des DLR™ Assays, Promega)

3.7.3 MPO-Messung und ELISA-Auswertung

Mit der MPO-Messung (Myeloperoxidase, leukozytenspezifisches Enzym) wurden die Konzentrationsverhältnisse von Leukozyten in vorbehandelte Endothelzellchargen gemessen. Die gewaschenen Proben wurden zunächst mit 1%igem HTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) lysiert, gemessen wurde in 96-well Mikrotiterplatten (Nunclon). Aus einer Stammlösung (Dianisidin 160 μM aus 5,1mg Dimethoxybenzidindihydrochlorid, Sigma-Aldrich in 100ml PBS) wurden 100 μl als Substrat verwendet. Die in der Probe enthaltene Myeloperoxidase überführte das farblose Dianisidin in Gegenwart von H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) in einen orangeroten Farbstoff. Zur Quantifizierung wurde parallel eine Leukozyten-Verdünnungsreihe (1:1 bis 1:100) angebracht.

Die Auswertung erfolgte im ELISA-Reader (BD) bei 450nm (über 20min alle 2min eine Messung), die Konzentration errechnete sich entweder aus der initialen Steigung der Messkurve, oder alternativ, als absolute Endpunktbestimmung, nachdem die MPO-Messung nach 20min mit 50 μl AcOH (Essigsäure, 1M, pH 2) gestoppt und vom ELISA-Messgerät ausgewertet wurde.

Die gemessenen ELISA-Werte der MPO-Aktivität wurden dann als PMN-Adhäsion am Endothel (in %) angegeben: dabei entsprachen 500.000 PMN (appliziert pro 6-well Endothelzellen, entsprechend einer Fläche von 6 cm^2 bzw. mittleren Zelldichte von $3,0 \times 10^5$) in der Verdünnungsreihe dem Wert 1:1 bzw. 100% PMN-Adhäsion. Die gemessenen ELISA-Werte der unterschiedlich stimulierten Endothelzellchargen wurden anhand dieser Verdünnungsreihe (1:1 bis 1:100) auf eine PMN-Adhäsion (in %) umgerechnet.

3.7.4 Statistische Auswertung

Eine Normalverteilung lag vor bei Ergebnissen einer Versuchsreihen an einem Versuchstag, nicht bei Betrachtung von Versuchen verschiedener Versuchstage. Zur statistischen Analyse wurde die einfache Varianzanalyse (ANOVA) für unverbundene, gleichartige, parametrisch verteilte Gruppen angewendet (Statistikprogramm STATA 7.0 für Mac) und dabei Unterschiede der Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als einfach signifikant (*), von $p < 0,01$ als zweifach signifikant (**) angesehen (gegenüber der Kontrolle oder dem mit Balken markierten Wert). Alle Daten wurden als Mittelwerte und mittlere Fehler davon dargestellt, die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichung sowie die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Tabellenkalkulation Microsoft Excel 2001 für Mac.

4 Ergebnisse

4.1 Evaluation der Transfektionsverfahren

4.1.1 Transfektion mittels HVJ-Liposomen

Zu Beginn des Projekts wurden die Möglichkeiten eines virosomalen Gentransfers mittels HVJ-Liposomen aus Eigenherstellung untersucht (vgl. Material und Methoden 3.2.1). Nachdem im isolierten Herzen bereits gezeigt werden konnte, dass diese ein sehr effektives Transfektionssystem darstellen (Kupatt, 1999), versuchten wir, diese Methodik auf unser in vitro Endothelzellmodell zu übertragen.

Abbildung 4.1 zeigt die Transfektionsraten, die wir damit erzielen konnten. Dabei wurden die Virushüllproteine entweder antegrad (zu Beginn des Protokolls) oder retrograd (zur fertigen Liposomenmischung) mit dem Plasmid beladen. Eine dritte Variante war die Zugabe eines Enhance (Verstärkungs)-Puffers, wie er im Superfect-Protokoll (Qiagen) verwendet wurde. Die Plasmidmenge pro Transfektionsansatz war konstant 2µg DNA (pRL-CMV Plasmid), die eingesetzte Menge Transfektionsreagenz wurde mit 100–500µl/Ansatz variiert. Die Messwerte im Luminometer unterschieden sich bei allen drei Methoden nur unwesentlich voneinander und waren gegenüber den untransfizierten Kontrollen auf weniger als den doppelten Ausgangswert gesteigert. Der HVJ-liposomale Gentransfer stellte sich damit in unserem in vitro Modell als ineffektiv dar.

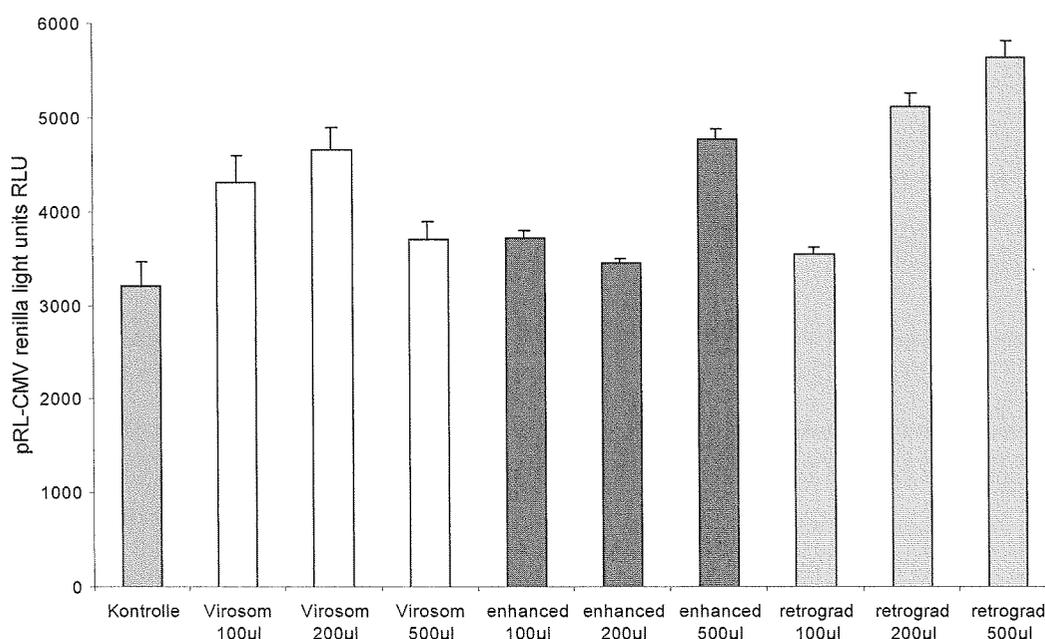


Abb. 4.1 Transfektionsraten mit HVJ-Liposomen aus verschiedenen Herstellungsverfahren (n = 5)

4.1.2 Vergleich der verwendeten Transfektionsreagenzien

Im nächsten Schritt wurden kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien (Effectene und Superfect, beide Qiagen) eingesetzt (vgl. Abb. 4.2). Dabei zeigte sich, dass Effectene konzentrationsabhängig die höchste Luciferase-Aktivität induzierte (pRL-CMV) gefolgt von Superfect, die HVJ-Liposomen dagegen keine signifikanten Transfektionsraten lieferten.

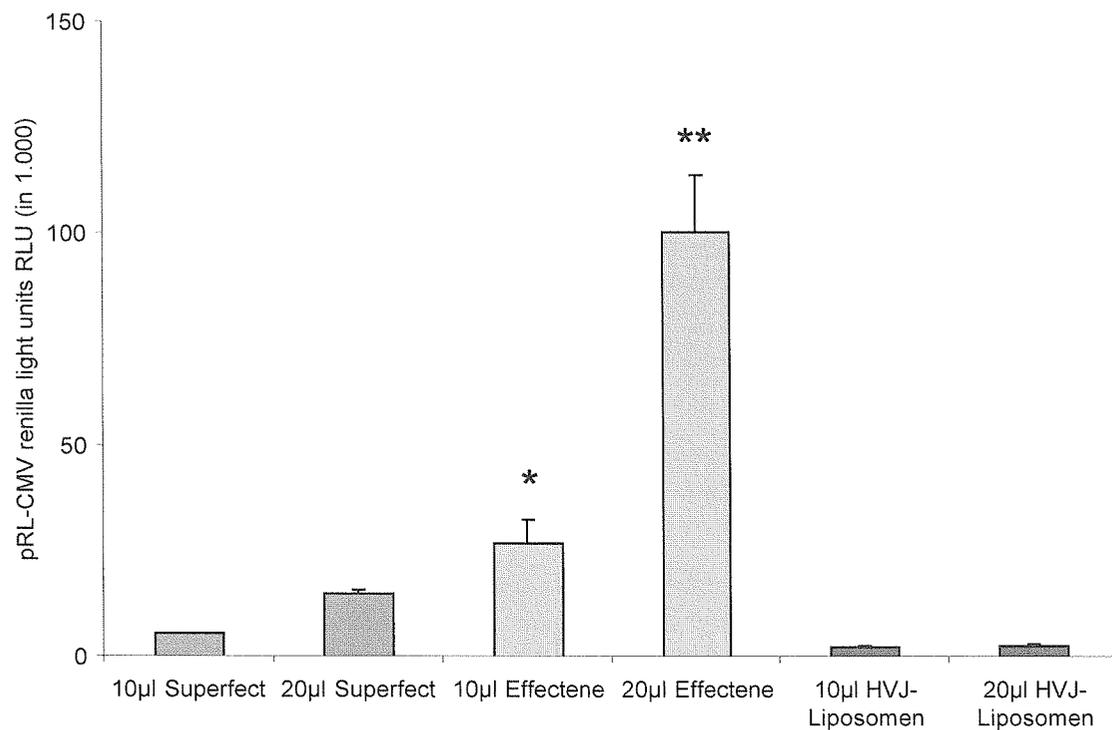


Abb. 4.2 Verschiedene Mengen an Transfektionsreagenz bei konstanter DNA-Beladung (n = 5)

Analoge Ergebnisse ergaben sich beim Einsatz unterschiedlich hoher Mengen an cDNA. Abb. 4.3 zeigt eine deutlich gesteigerte Transfektionsrate mit Superfect (13 bis 15fach bei pRL-TK bzw. 37fach bei pRL-CMV gegenüber der so genannten Mock-Kontrolle, einem DNA-losen Transfektans) und vor allem mit Effectene (8 bis 16fach bei pRL-TK bzw. 43fach bei pRL-CMV) im Vergleich zu HVJ-Liposomen (unverändert bzw. 2,5fach bei pRL-CMV).

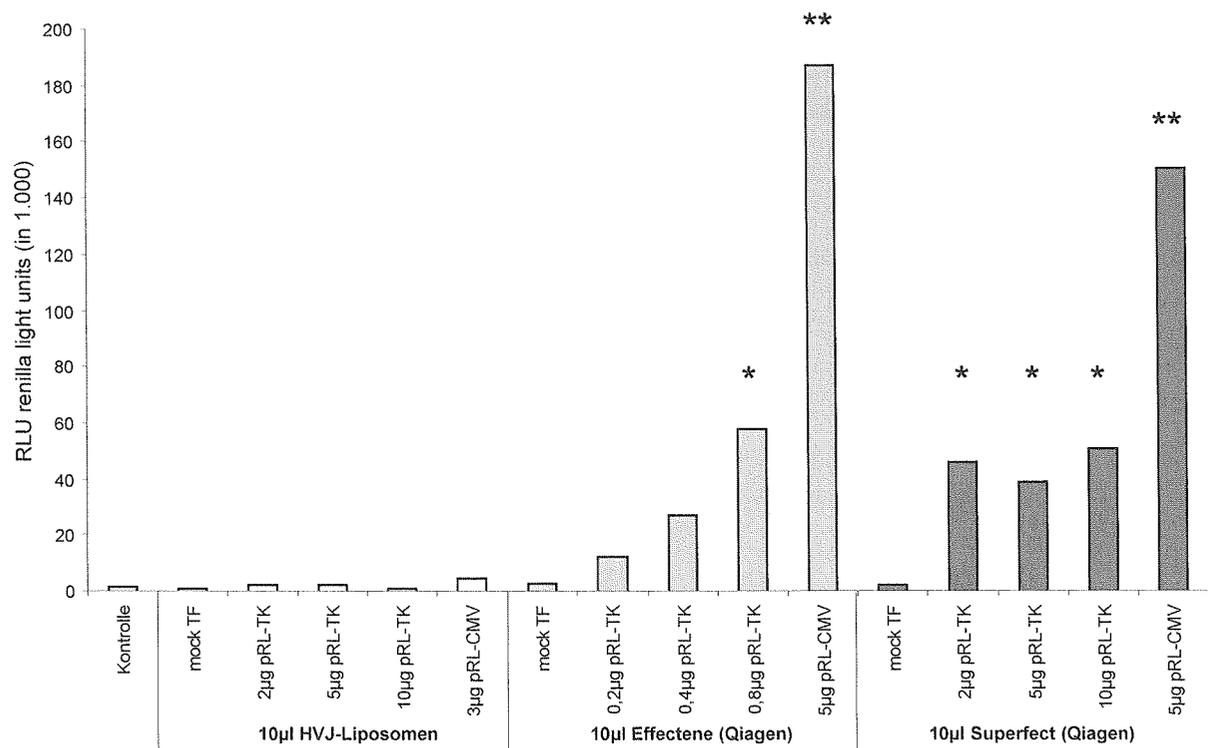


Abb. 4.3 Verschiedene DNA-Beladung bei konstanter Menge an Transfektionsreagenz (n = 3)

4.2 Evaluation der Reportergergenkonstrukte

4.2.1 Verhalten der Renilla-Luciferase

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz standen uns die beiden Renillakonstrukte pRL-CMV und pRL-TK (vgl. Material und Methoden 3.3.1) zur Verfügung. Die folgende Abb. 4.4 zeigt deren Verhalten auf den spezifischen Endothelzellreiz mit $\text{TNF}\alpha$ (200ng/ml Medium) über 24h und weitere 24h nach Transfektion des jeweiligen Reportergergenkonstrukts.

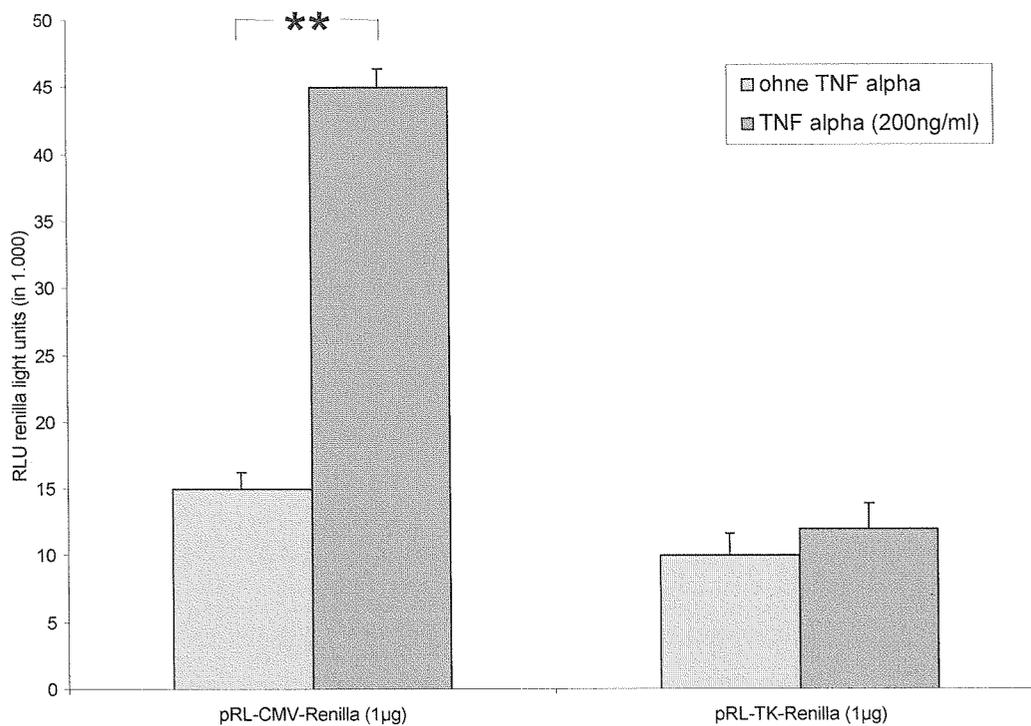


Abb. 4.4 $\text{TNF}\alpha$ -Sensitivität des Reportergergenkonstrukts pRL-CMV im Vergleich zu pRL-TK (n = 4)

Wie in Abb. 4.4 erkennbar, erwies sich nur das pRL-CMV Plasmid, nicht jedoch das pRL-TK-Konstrukt als $\text{TNF}\alpha$ -sensitiv (Expressionssteigerung um $200\pm 10\%$ gegenüber $14\pm 15\%$ beim pRL-TK Plasmid). Für die weiteren Untersuchungen wurde daher ausschließlich mit dem pRL-TK Vektor kotransfiziert, der vom $\text{TNF}\alpha$ -Stimulus unbeeinflusst blieb.

4.2.2 Verhalten der pICAM-1- und pE-Selektin-Reporterergenkonstrukte

Im nächsten Schritt wurden in unserem Zellkultursystem neonataler Ratten- und humaner Endothelzellen die unterschiedlichen Reporterergenkonstrukte für ICAM-1- und E-Selektin auf ihre Stimulierbarkeit gegenüber $\text{TNF}\alpha$ untersucht (vgl. Material und Methoden 3.3.2). Aufgetragen ist in allen folgenden Diagrammen jeweils die „relative Luciferaseaktivität“, entsprechend dem Verhältnis von pICAM-1-Luc bzw. pE-Selektin-Luc-Aktivität zum pRL-TK-Reporterergenkonstrukt.

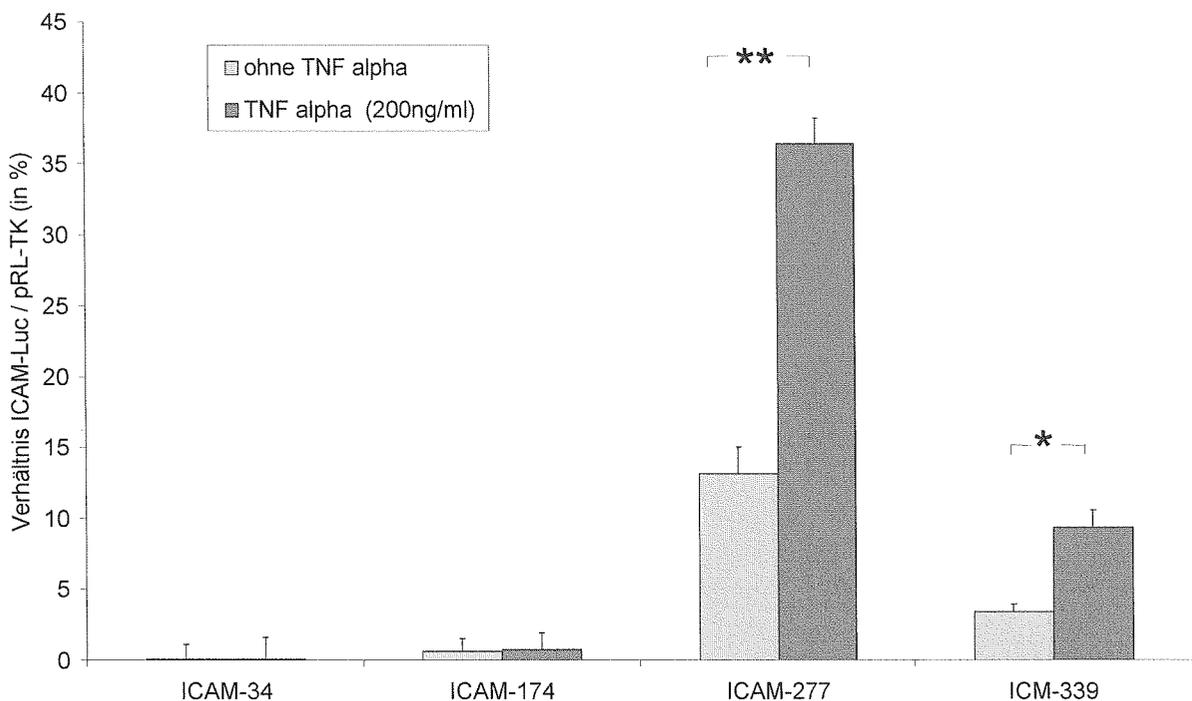


Abb. 4.5 $\text{TNF}\alpha$ -Sensibilität der pICAM-1-Reporterergenkonstrukte unterschiedlicher Basenpaarlänge (n = 4)

Abb. 4.5 zeigt, dass die Konstrukte mit kurzem ICAM-Promoter (pICAM-34-Luc und pICAM-174-Luc) eine geringe Ruheexpression besitzen ($0,7 \pm 27\%$ bzw. $1,5 \pm 32\%$). Diese Aktivität ist durch Endothelaktivierung mit $\text{TNF}\alpha$ nicht steigerbar ($0,6 \pm 31\%$ bzw. $1,8 \pm 29\%$). Die beiden ICAM-1-Reporterergenkonstrukte pICAM-277-Luc und pICAM-339-Luc (mit $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Bindungsstelle) zeigten dagegen eine deutliche Sensivität gegenüber $\text{TNF}\alpha$ -Aktivierung ($14 \pm 12\%$ bzw. $4,8 \pm 5\%$ in Ruhe gegenüber $36 \pm 7\%$ bzw. $10,5 \pm 6\%$ nach $\text{TNF}\alpha$ -Applikation).

Analog zu den pICAM-1-Konstrukten unternahmen wir Untersuchungen mit pE-Selektin-Konstrukten unterschiedlicher Basenpaarlänge. Abb. 4.6 zeigt, dass es bei dem (komplett) NF κ B-deletierten pE-Selektin zu keiner Synthesesteigerung durch TNF α (+0,15 \pm 50%) kam. Jedoch zeigte auch keines der anderen pE-Selektin-Konstrukte eine signifikante Synthesesteigerung (pL-Sel-51-Luc -7,3 \pm 14% bzw. pL-Sel-112-Luc +2,2 \pm 14%). PL-Sel-48-Luc (ein Konstrukt ohne NF κ B-Bindungsstelle) neigt zwar dazu vermehrt aktiviert zu werden, ohne dabei jedoch Signifikanz zu erreichen. Auch die Anwendung in unterschiedlichen Endothelmodellen (NECR, HMEC und HUVEC) ergab keine signifikante Aktivierung auf TNF α .

Da die Induktion der pE-Selektin-Reportergenkonstrukte durch TNF α insgesamt ausblieb bzw. nur vergleichsweise gering ausfiel, verwendeten wir im weiteren die pICAM-1-Reportergenkonstrukte für die Analyse der akuten und subakuten Endothelaktivierung.

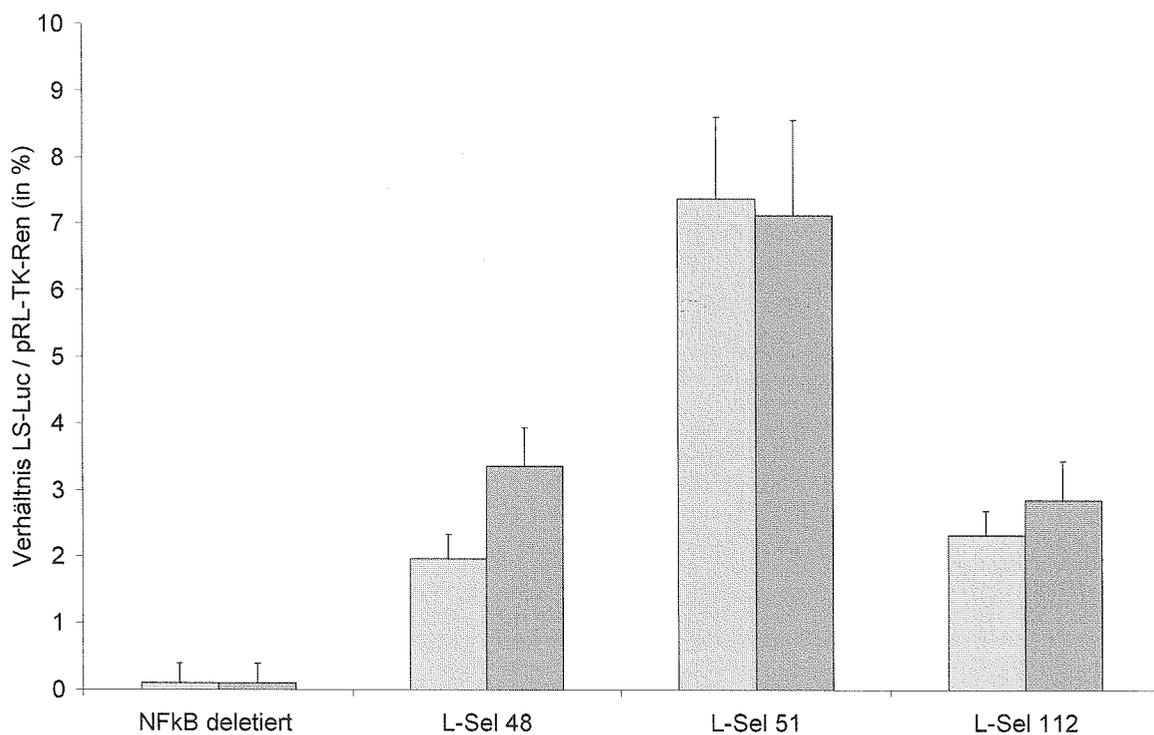


Abb. 4.6 TNF α -Sensibilität der pE-Selektin-Reportergenkonstrukte unterschiedlicher Basenpaarlänge (n = 6)

4.3 Endothelaktivierung

4.3.1 Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung

In der von uns experimentell gewählten Situation von Hypoxie und Reoxygenierung (vgl. Versuchsaufbau und Protokoll in Material und Methoden 3.4.1) wurden Endothelzellen nach O₂-Entzug auf ihr ICAM-1-Transkriptionsverhalten untersucht. Nach 24h Hypoxie und weiteren 4h Reoxygenierung zeigten die pICAM-1-Reportergergenkonstrukte folgendes Verhalten:

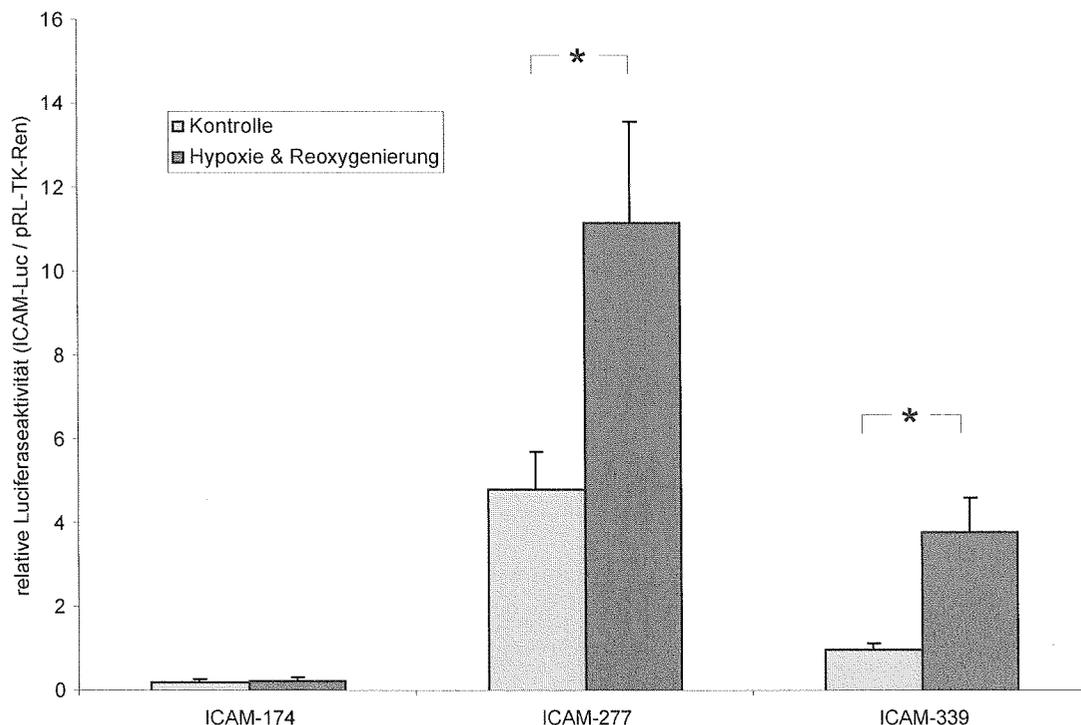


Abb. 4.7 Verhalten der pICAM-1-Reportergergenkonstrukte unter Hypoxie und Reoxygenierung (n = 4)

Wie in Abb. 4.7 gezeigt, fand sich eine vergleichbar starke Empfindlichkeit der pICAM-277- und pICAM-339-Reportergergenkonstrukte auf Aktivierung mit 24h Hypoxie und 4h Reoxygenierung (Steigerung um $140 \pm 17\%$ bzw. $236 \pm 12\%$). Das pICAM-174-Konstrukt zeigte dagegen keinen Unterschied zu normoxischen Bedingungen.

Diese Daten gaben einen ersten Hinweis darauf, dass die NF κ B-Bindungsdomäne der pICAM-277 und 339-Reportergergenkonstrukte für die Induzierbarkeit durch Hypoxie- und Reoxygenierung verantwortlich sein könnte.

4.3.2 Einfluss von PMN und Thrombozyten

Bei HUVEC, die wegen ihrer Homologie zu humanen PMN und Thrombozyten verwendet wurden, induzierte $\text{TNF}\alpha$ eine deutliche pICAM-339-Luc-Expressionsteigerung ($+145\pm 9\%$ gegenüber der unstimulierten Kontrolle). Die pICAM-339-Luc-Aktivität stieg nach zusätzlicher Applikation von PMN bzw. Thrombozyten weiter leicht an ($+236\pm 12\%$ bzw. $+189\pm 15\%$), $\text{TNF}\alpha$, PMN und Thrombozyten zusammen appliziert zeigten einen signifikanten, additiven Effekt ($+305\pm 7\%$) gegenüber der reinen Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$.

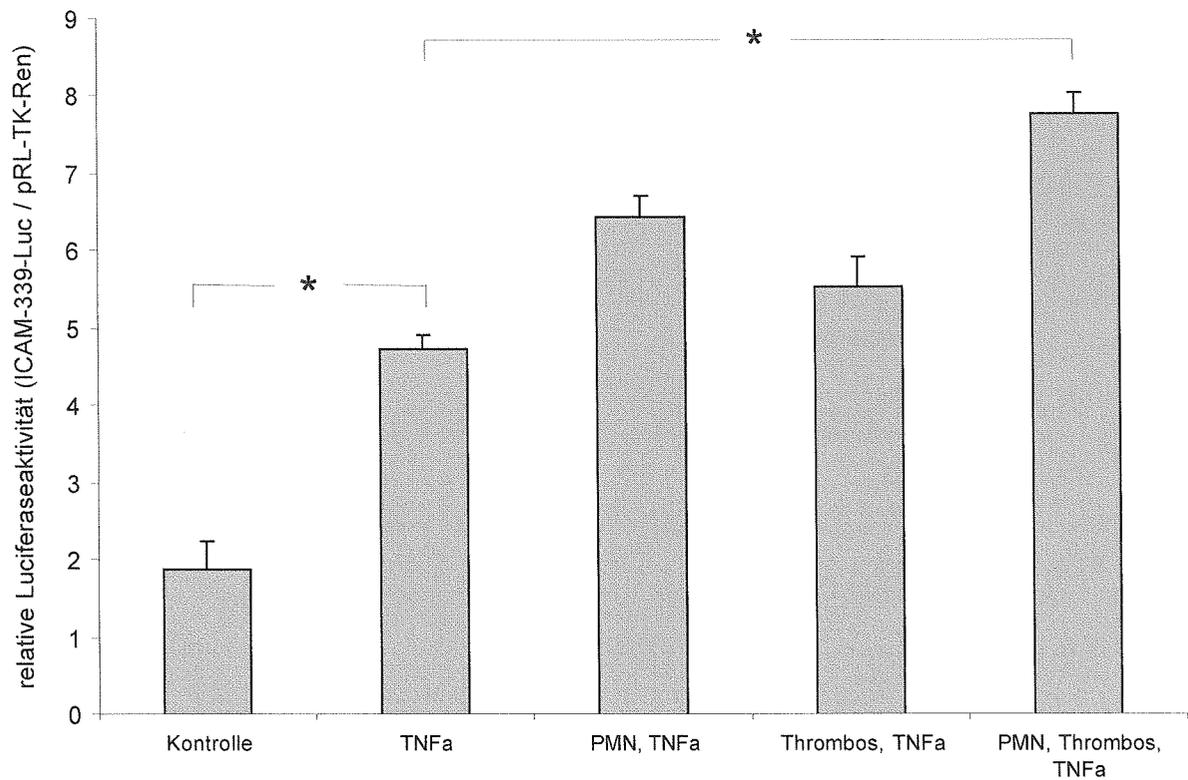


Abb. 4.8 Effekte nach Aktivierung mit $\text{TNF}\alpha$, PMN und Thrombozyten bei HUVEC (n = 4)

Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei HMEC, die mit dem pICAM-277-Luc-Reporter-genkonstrukt transfiziert wurden. Abb. 4.9 zeigt, dass $\text{TNF}\alpha$ ($+341\pm 12\%$), aber auch die (zu $\text{TNF}\alpha$) zusätzliche Gabe von PMN bzw. Thrombozyten zu einer Zunahme der pICAM-277-Luc-Aktivität führten (zusätzlich $+196\pm 17\%$ bzw. $+172\pm 17\%$). Sowohl die zusätzliche Applikation von Fibrinogen ($+240\pm 12\%$ bzw. $+192\pm 12\%$) als auch die von PMN, Thrombozyten und Fibrinogen zugleich ($+324\pm 13\%$) ließ die pICAM-277-Luc-Aktivität zwar weiter ansteigen, die gemessenen Werte lagen jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus. Voruntersuchungen mit dem pICAM-339-Reporter-genkonstrukt lieferten vergleichbare Daten.

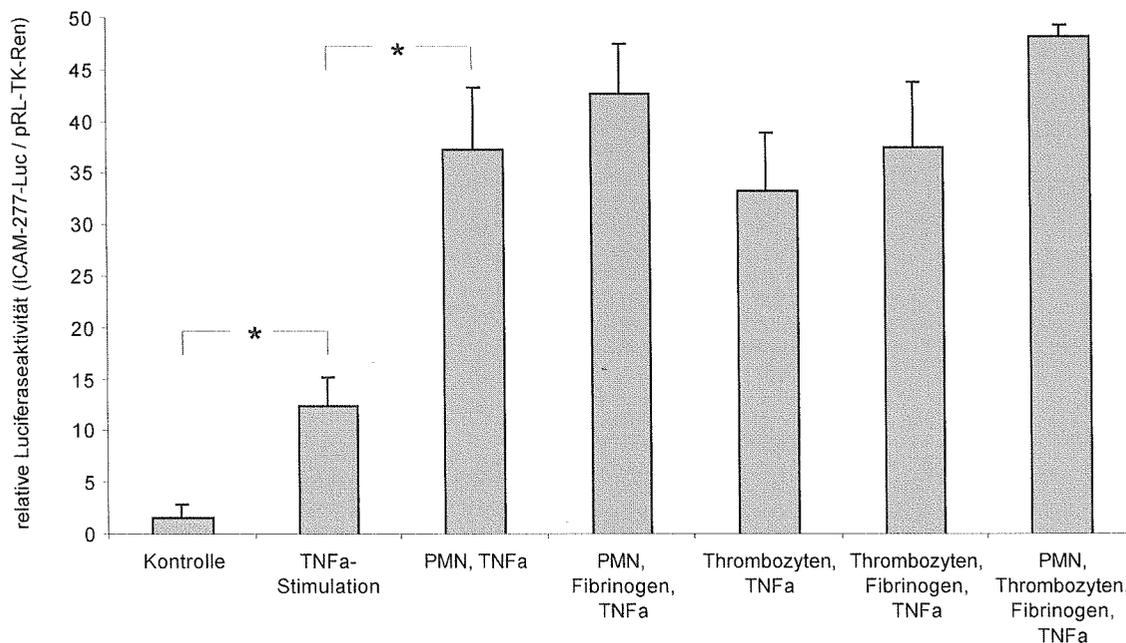


Abb. 4.9 Effekte nach Aktivierung mit $\text{TNF}\alpha$, PMN, Thrombozyten und Fibrinogen bei HMEC (n = 4)

Die Adhäsion von PMN am Endothel wurde mittels MPO-Messung (Myeloperoxidase) bestimmt und auf einen Prozentwert umgerechnet (vgl. Material und Methoden 3.7.3). In Abb. 4.10 konnte gezeigt werden, dass gegenüber der Hintergrundaktivität der unbehandelten Kontrolle ($2,5 \pm 6\%$) das mit PMN aktivierte Endothel eine Adhäsion von $35 \pm 7\%$ (der Gesamtmenge applizierter PMN) aufwies. Die zusätzliche Gabe von Thrombozyten, Fibrinogen oder beidem bewirkte zwar einen Trend zu zusätzlich mehr PMN-Adhäsion, ohne dabei jedoch Signifikanzen zu erreichen ($38 \pm 8\%$, $40 \pm 6\%$ bzw. $46 \pm 9\%$). Die zuvor beschriebenen Effekte der pICAM-277 bzw. 339-Luc-Aktivierung nach PMN-Applikation waren daher mit einer erhöhten Adhäsion von PMN am Endothel verknüpft.

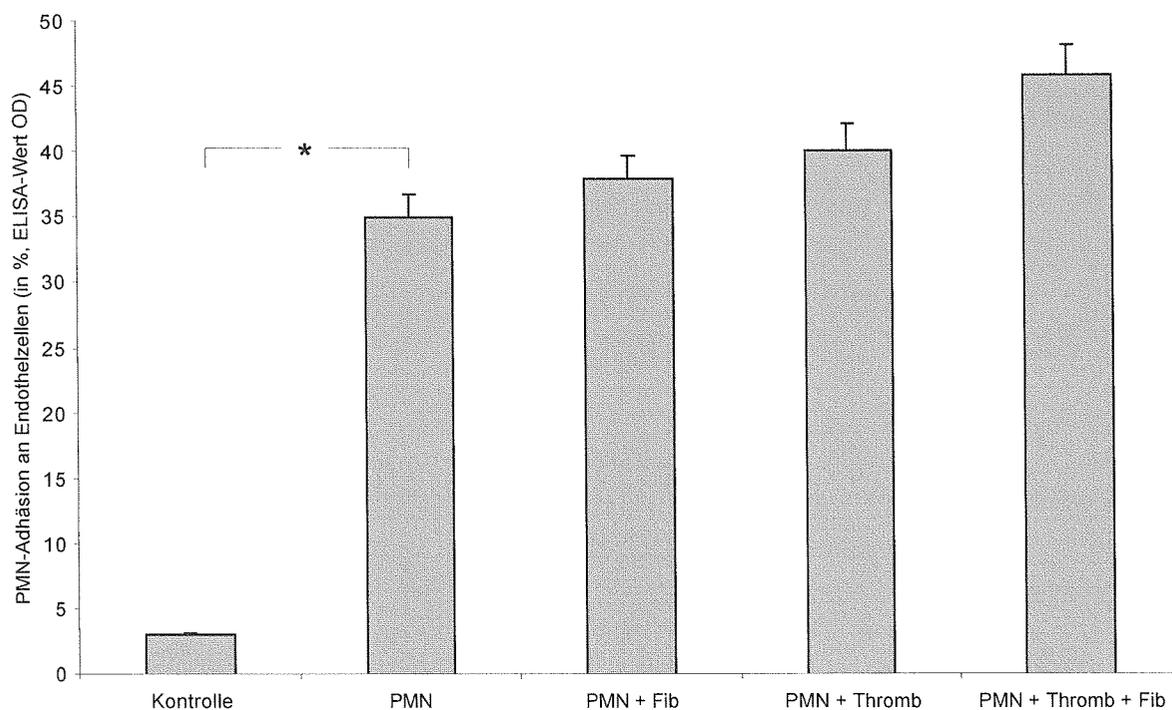


Abb. 4.10 Ausmaß adhärenter PMN am Endothel nach Applikation von PMN, Thrombozyten und Fibrinogen

4.3.3 Einfluss von PMN unter Hypoxie und Reoxygenierung

Um die *in vivo* Reperfusionssituation mit dem Anfluten von Leukozyten und Thrombozyten *in vitro* zu imitieren, kombinierten wir die drei zuvor beschriebenen Ansätze zu einem Modell der Maximalstimulation: zum Zeitpunkt der Reoxygenierung wurden PMN, Thrombozyten und Fibrinogen bzw. der Endothelaktivator $\text{TNF}\alpha$ appliziert (vgl. Material und Methoden 3.4).

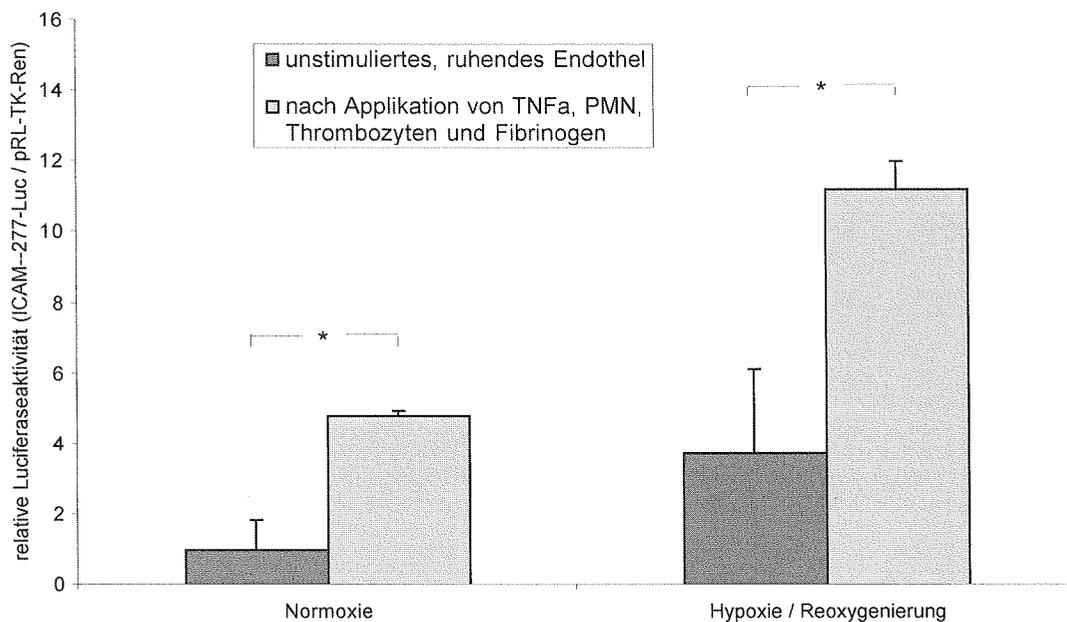


Abb. 4.11 Effekt nach Endothelaktivierung mit $\text{TNF}\alpha$, PMN, Thrombozyten und Fibrinogen am normoxischen Endothel bzw. unter Hypoxie-Reoxygenierungsbedingungen (n = 4)

In Abb. 4.11 ist bei HUVEC die durch $\text{TNF}\alpha$ -Aktivierung vorbeschriebene pICAM-277-Luc-Aktivierung zu erkennen (von $1,2 \pm 10\%$ auf $4,8 \pm 16\%$). Das gleiche Phänomen war unter Hypoxie-Reoxygenierungsbedingungen zu beobachten (von $3,9 \pm 2,3\%$ auf $11 \pm 2,7\%$), jedoch auf insgesamt höherem Niveau (3,2fach bzw. 2,3fach gegenüber Normoxie). Insgesamt erscheint sowohl einzeln als auch in Kombination der Einfluss der PMN-Adhäsion auf die Transkription von pICAM-277-Reportergenkonstrukten stark, ob innerhalb oder außerhalb der Hypoxie-Reoxygenierungssituation.

4.4 Hemmung der subakuten Endothelaktivierung mittels Transfektion von NF κ B-Decoy-Oligonukleotiden

Zur Beeinflussung der subakuten Endothelaktivierung verwendeten wir so genannte NF κ B-Decoy-Oligonukleotide (vgl. Material und Methoden 3.6). Wir verglichen dazu zunächst die Effekte von NF κ B-Decoy-ODN ohne und mit einer PT-Veresterung (Phosphothioat) mit denen einer funktionslosen NF κ B-Mutante (mehrfach punktmutierte Sequenz) bzw. einem so genannten scrambled-Oligonukleotid (funktionslose Zufallssequenz, vgl. Material und Methoden 3.6.3).

4.4.1 Hemmung nach TNF α -Aktivierung

Typischer Weise bewirkte die Applikation von TNF α am Endothel eine Expressionsteigerung von ICAM-1-Adhäsionsmolekülen (vgl. Einleitung 1.2 und Ergebnisse Abb. 4.5). In der folgenden Abb. 4.12 ist zu erkennen, dass durch Transfektion von NF κ B-Decoy-ODN (2 μ g DNA/6-well) in HUVEC dieser Effekt gehemmt werden konnte (-43 \pm 11%), die PT-veresterten NF κ B-Decoy-ODN bewirkten eine sogar noch deutlichere Hemmung (-64 \pm 6%) der pICAM-339-Luc-Expression. Durch die funktionslose NF κ B-Mutante blieb die pICAM-339-Luc-Synthese dagegen unbeeinflusst (-2 \pm 3%).

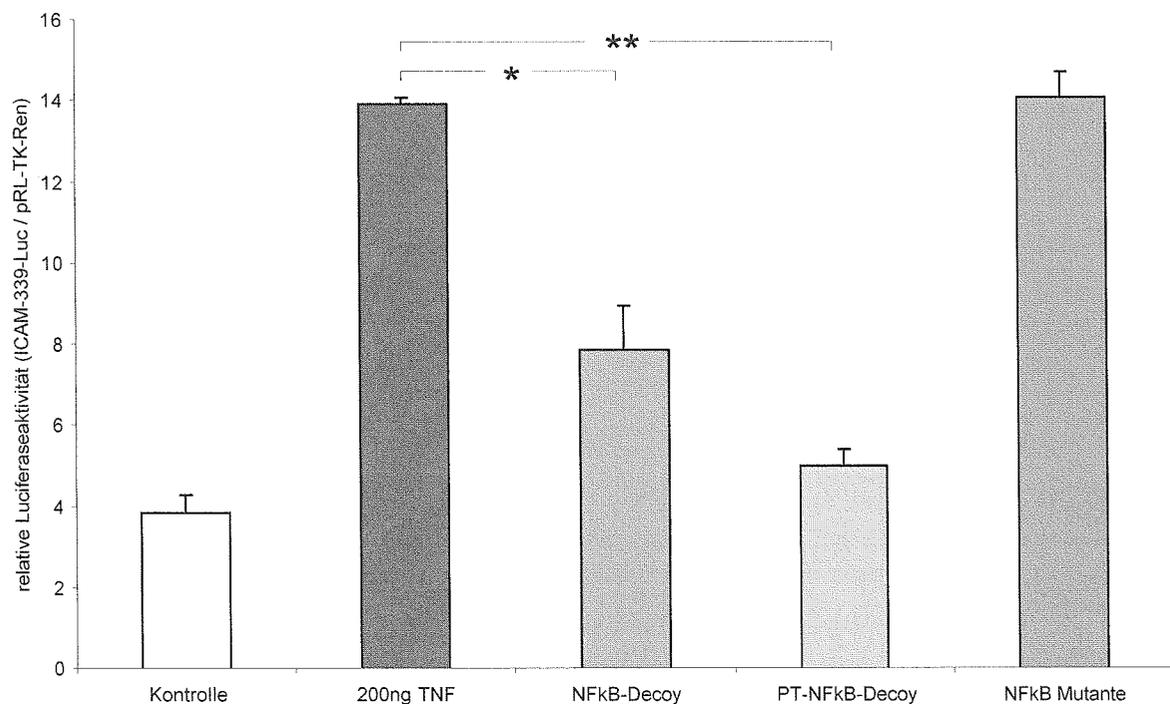


Abb. 4.12 Effekte nach NF κ B-Decoy-ODN-Transfektion bei TNF α -aktivierten Endothelzellen (n = 4)

4.4.2 Zeitlicher Verlauf der NF κ B-Decoy-ODN-Inhibition

Aus dem zuvor dargestellten sind PT-veresterte NF κ B-Decoy-ODN als effektivste ICAM-1-Transkriptionsinhibitoren hervorgegangen. Nun untersuchten wir, inwieweit der Zeitpunkt der Decoy-ODN-Transfektion möglicher Weise ein unterschiedlich starkes Inhibitionspotential ergibt. Dazu wurden Decoy-ODN mit und ohne PT-Veresterung zu verschiedenen Zeitpunkten in TNF α -aktivierte HMEC transfiziert, t=0 entsprach dabei der Applikation simultan mit der PMN-Aktivierung, bei t=12 wurde 12h zuvor, bei t=24 24h zuvor, bei t=36 36h zuvor und bei t=48 48h vor PMN-Gabe transfiziert.

Abb. 4.13 zeigt erneut, dass PT-markierte Decoy-ODN-Konstrukte den stärksten pICAM-277-Luc-inhibitorischen Effekt hatten (von $-63\pm 7\%$ bis $-74\pm 3\%$). Die nativen NF κ B-Decoy-ODN waren diesen zunächst unterlegen (von $-25\pm 6\%$ bis $50\pm 3\%$), unterschieden sich aber, je nach Applikationszeitpunkt, deutlich voneinander. Mit einer Applikationsdauer von t=48h waren sie den PT-markierte Decoy-ODN gleichwertig ($-61\pm 4\%$). Das s.c.oligo (Zufallssequenz) und die NF κ B-Mutante veränderte die Synthese nicht (selbst nach maximaler Inkubationszeit von t= 48 nur um $-4\pm 5\%$ bzw. $-2\pm 6\%$).

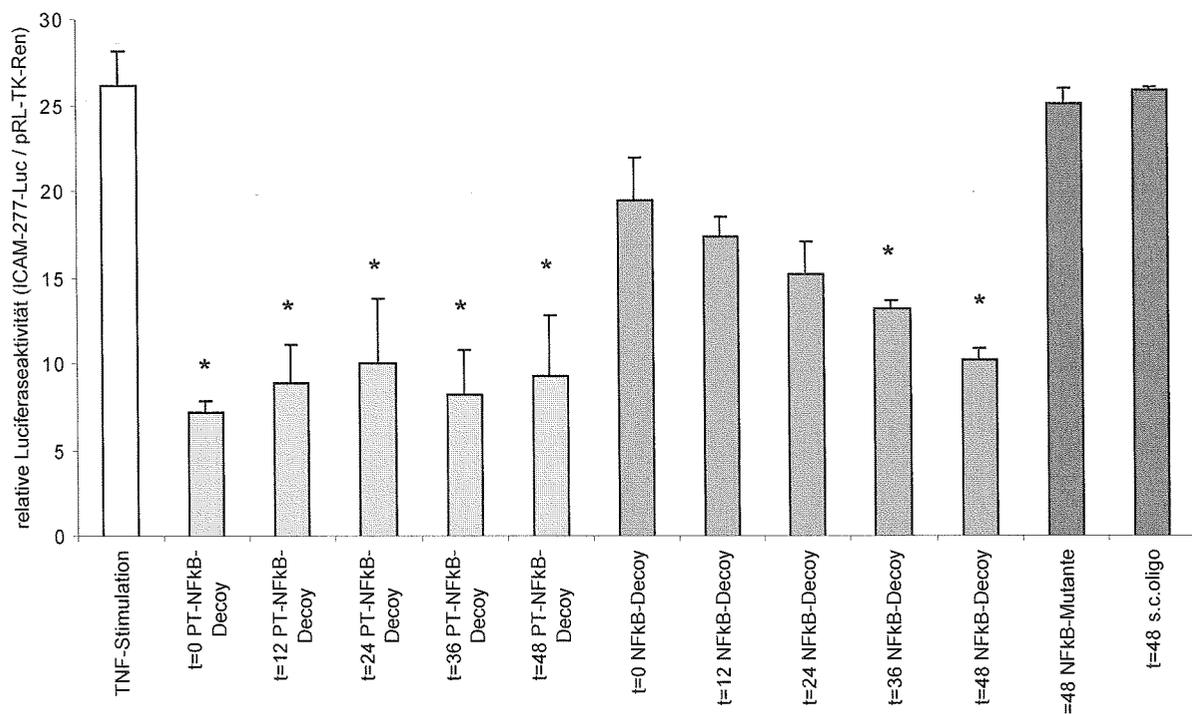


Abb. 4.13 Zeitverlauf der NF κ B-Decoy-ODN-Transfektion am TNF α -aktivierten Endothelzellen (n = 3)

4.4.3 Hemmung nach PMN-Adhäsion

Daraufhin untersuchten wir, inwieweit mit PMN stimulierte Endothelzellen durch Transfektion von NF κ B-Decoy-ODN in ihrer ICAM-1-Transkription beeinflussbar sind (Abb. 4.14 und 4.15). Zusätzlich wurden erneut verschiedene Zeitpunkte für die Decoy-ODN-Applikation verglichen. Die folgende Abb. 4.14 zeigt Daten aus 4 Versuchen mit HMEC, HUVEC und NECR lieferten im Vorfeld vergleichbare Werte:

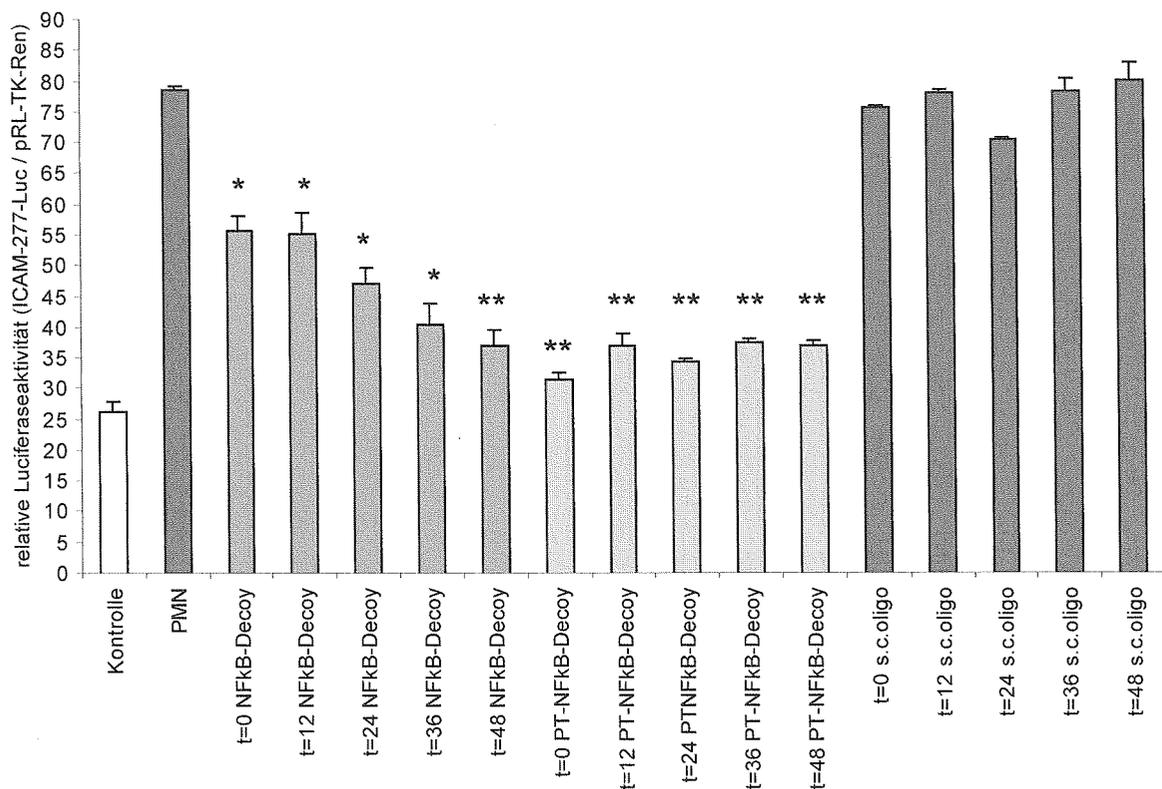


Abb. 4.14 Effekte nach PMN-Aktivierung und Decoy-ODN-Transfektion zu verschiedenen Zeitpunkten (n = 4)

Durch Transfektion von NF κ B-Decoy-ODN konnte die pICAM-277-Luc-Expression nach PMN-Applikation (+216 \pm 4%) stark gehemmt werden (-30 \pm 5%), bei früherem Applikationszeitpunkt bzw. längerer Inkubationsdauer war dieser Effekt noch deutlicher nachweisbar (maximal -51 \pm 6% bei 48stündiger Inkubation). Die Transfektion von PT-veresterten Decoy-ODN brachte hier erneut eine stärkere pICAM-277-Luc-Hemmung (-52 \pm 3% bis -65 \pm 4%), jedoch wieder ohne klare Unterschiede bei verschiedenen Applikationszeitpunkten. Nach Transfektion von s.c.oligos (Zufallssequenzen) war keine relevante Expressionshemmung messbar (-2 \pm 3% bis -7 \pm 5%).

4.4.4 Hemmung nach PMN-Adhäsion unter Hypoxie und Reoxygenierung

Als drittes Verfahren wurden Endothelzellen zusätzlich mit Hypoxie und Reoxygenierung (H&R) stimuliert. Dafür wurden die Zellen 24h O₂-depriviert, für 4h reoxygeniert und dabei zeitgleich PMN und Thrombozyten appliziert (vgl. Material und Methoden 3.4.1 und 3.4.2).

In Abb. 4.15 führte die Endothelaktivierung mit Hypoxie und Reoxygenierung (H&R) sowie PMN-Gabe zu einer 6,7fachen Steigerung der pICAM-277-Luc-Expression. Diese ist durch NFκB-Decoy-ODN-Transfektion je nach Applikationsdauer deutlich hemmbar (-30±2% bis -56±4%). Die PT-veresterten Decoy-ODN (-45±5% bis -50±3%) führten, verglichen mit den nativen NFκB-Decoy-ODN (im Gegensatz zu den Ergebnissen in Abb. 4.12 und 4.14) zu keiner verbesserten pICAM-277-Luc-Hemmung, die NFκB-Mutante zeigte keine signifikante Änderung (-6±4% bis -9±3%). Hier wurde im Gegensatz zu den Untersuchungen in Abb. 4.14 nur bis zu 36h mit Decoy-ODNs inkubiert.

Insgesamt hemmen NFκB-Decoy-ODN die ICAM-1-Transkription spezifisch, zeitabhängig und nach bis zu 48h Inkubation bei allen verwendeten Stimulationen (sowohl TNFα, PMN und Thrombozyten, als auch Hypoxie-Reoxygenierung).

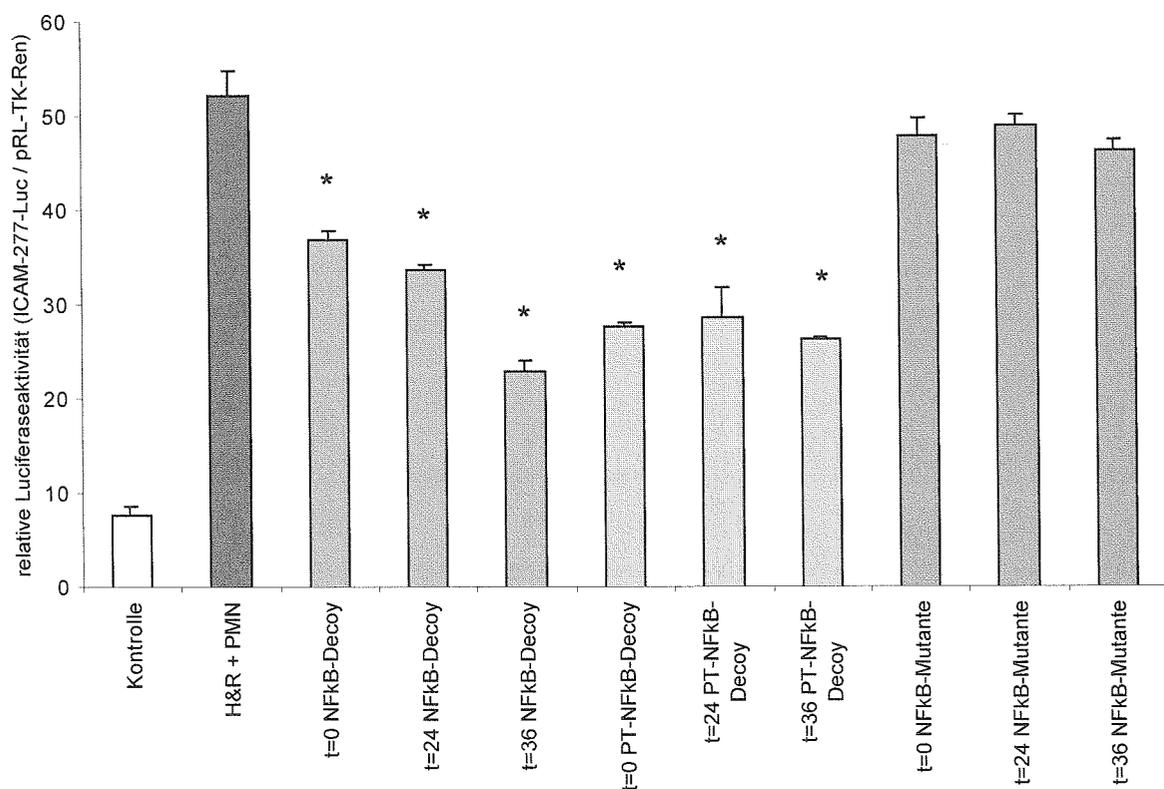


Abb. 4.15 Effekte nach 24h Hypoxie, 4h Reoxygenierung, gleichzeitiger PMN-Aktivierung und Transfektion von NFκB-Decoy-ODN an Endothelzellen (n = 4)

4.5 Hemmung der akuten Endothelaktivierung

Zur Beeinflussung der akuten Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten (PMN) bzw. Thrombozyten sind Interventionen geeignet, die direkt die Adhäsion an Endothelzellen inhibieren. Dabei kommen zum einen blockierende Antikörper, zum anderen synthetische Integrinantagonisten zum Einsatz (vgl. Material und Methoden 3.5). Anhand von MPO-Messungen wurde die Präsenz von Leukozyten (PMN) am Endothel untersucht. Das zuvor mit $\text{TNF}\alpha$ stimulierte Endothel wurde anschließend mit dem GpIIb/IIIa-Antagonisten Abciximab (Reopro) behandelt.

In Abb. 4.16 sind folgende Zusammenhänge erkennbar: zunächst bestätigte sich die in Abb. 4.10 beschriebene, additive Endothelaktivierung durch PMN, Thrombozyten und Fibrinogen. Nun wurde mit jeweils $10\mu\text{g}$ Abciximab/ml Medium inkubiert, die PMN-Adhäsion ließ sich dadurch signifikant reduzieren, und zwar sowohl in Abwesenheit (-74%) als auch in Anwesenheit (-71%) von Thrombozyten bzw. Fibrinogen, jeweils im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (OD = 0).

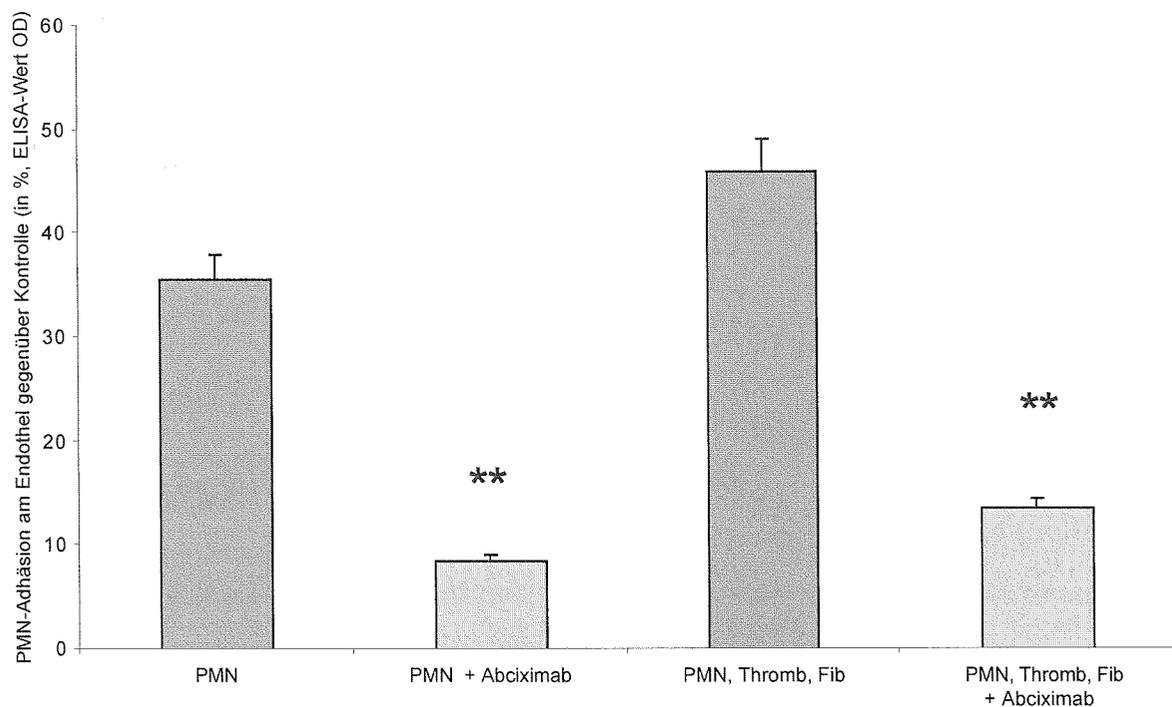


Abb. 4.16 Adhäsionshemmender Effekt von Abciximab an unterschiedlich stimulierten Endothelzellen (n = 6)

Die Untersuchungsbefunde zeigten ein starkes, adhäsionshemmendes Potential für Abciximab sowohl auf die PMN-Adhäsion allein, als auch auf PMN in Anwesenheit von Thrombozyten und Fibrinogen. Dies verglichen wir mit den anderen Adhäsionsinhibitoren Tirofiban (Aggrastat) und dem blockierenden CD18-Antikörper (IB4) bzw. dem nicht blockierenden CD18-Antikörper (11H6, vgl. Material und Methoden 3.5). Nachdem in Abb. 4.16 und Vorbefunden die kombinierte Endothelaktivierung mit PMN, Thrombozyten und Fibrinogen (im folgenden als PTF bezeichnet) die höchsten Werte lieferte, wurde diese für unsere weiteren Untersuchungen gewählt.

Die in Abb. 4.17 durch PMN, Thrombozyten und Fibrinogen (PTF, jeweils zuvor Applikation von $TNF\alpha$) induzierte PMN-Adhäsion am Endothel (+47,5% Adhäsion gegenüber Kontrolle) konnte durch alle verwendeten Adhäsionshemmer vergleichbar stark gehemmt werden: die Applikation von Abciximab führte zu einer -78%igen Reduktion adhärenter PMN, mit CD18-Antikörpern lies sich diese um -74%, mit Tirofiban um -68% reduzieren. Der Kontrollantikörper 11H6 führte dagegen zu keiner signifikanten Reduktion adhärenter PMN am Endothel (lediglich -10% gegenüber PTF).

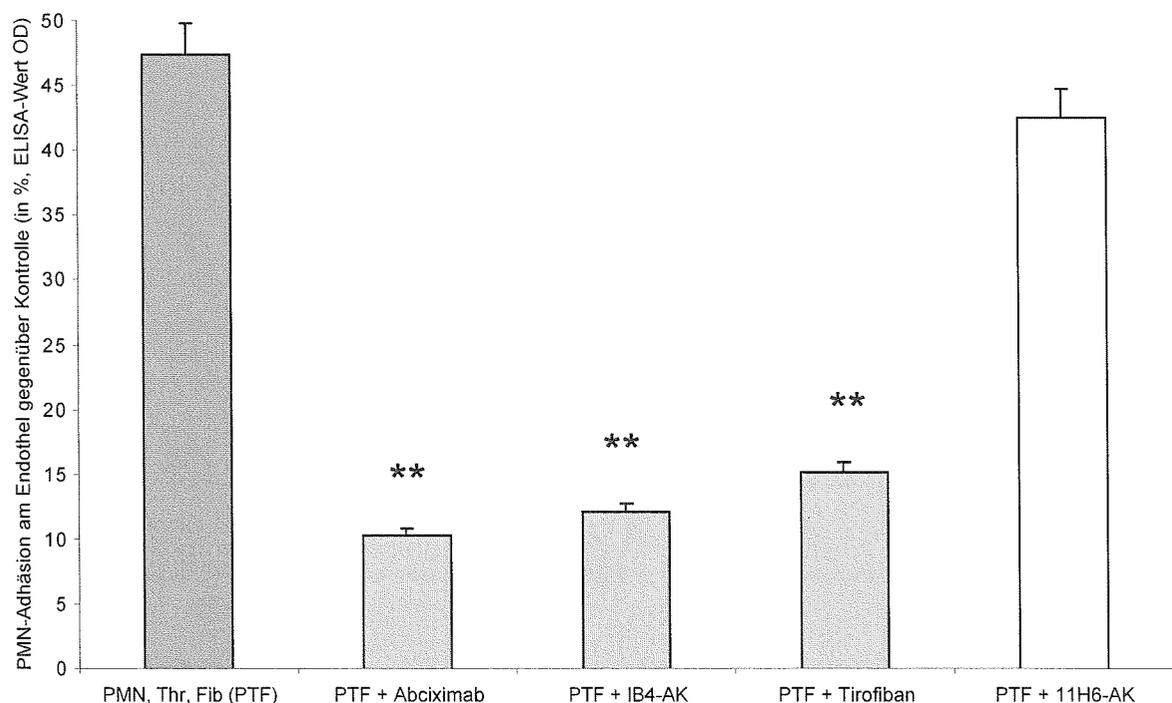


Abb. 4.17 Potential unterschiedlicher Adhäsionshemmer auf die endotheliale PMN-Adhäsion (n = 4)

4.6 Effekte auf die subakute Endothelaktivierung bei Hemmung der akuten Endothelaktivierung

Daraufhin untersuchten wir, ob die Inhibition der PMN-Adhäsion einen Effekt auf ICAM-1-Reportergenkonstrukte, dem Parameter der subakuten (Typ II) Endothelaktivierung, ausübt. Zum einen verwendeten wir die GpIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Tirofiban (Aggrastat) und Abciximab (Reopro), zum anderen erneut den CD18-Antikörper (IB4) bzw. 11H6-Antikörper zur Kontrolle.

Das Endothel, hier auch die Kontrollen, wurden zuvor jeweils mit 200ng/ml $TNF\alpha$ aktiviert. Mit HUVEC konnte in Abb. 4.18 gezeigt werden, dass bereits die reine Thrombozytenstimulation (linke, dunkle Balken) Effekte auf die pICAM-277-Luc-Expression hat: es kam zur fast 10fachen Aktivitätssteigerung und diese ICAM-1-Mehrsynthese lies sich durch Gabe von CD18-Antikörpern (IB4) um $-39\pm 9\%$, durch Abciximab um $-79\pm 4\%$, durch Tirofiban um $-57\pm 7\%$ inhibieren, nicht jedoch durch den Kontrollantikörper 11H6 ($-2\pm 6\%$). Nach reiner PMN-Aktivierung (rechte, helle Balken) kam es zu einer noch stärkeren pICAM-277-Luc-Aktivierung (17fach), die sich ebenfalls inhibieren lies: durch CD18-Antikörpern (IB4) um $22\pm 7\%$, durch Abciximab um $42\pm 9\%$, durch Tirofiban um $40\pm 3\%$ und durch den Kontrollantikörper 11H6 um nicht signifikante $5\pm 2\%$.

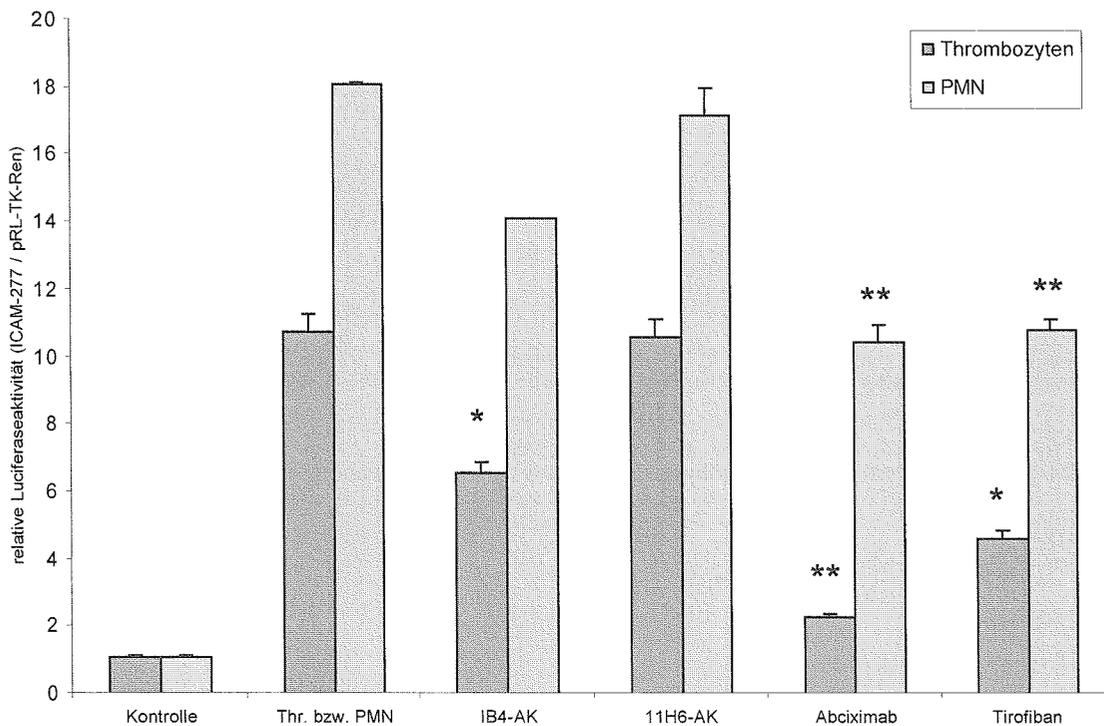


Abb. 4.18 pICAM-277 nach Thrombozyten- bzw. PMN-Aktivierung und Hemmung der Typ I-Aktivierung (n = 4)

In Abb. 4.19 (4 Versuche mit HUVEC, HMEC und NECR lieferten vergleichbare Daten) unternahmen wir nun eine kombinierte Aktivierung mit PMN, Thrombozyten und Fibrinogen (PTF) und variierten zudem die eingesetzte Menge an Inhibitoren (10 bzw. 20 µg/ml Medium). Dabei zeigten sich folgende Zusammenhänge: die pICAM-277-Luc-Expression steigerte sich nach PTF-Applikation um das 14fache gegenüber der reinen TNF α -Kontrolle, was wiederum durch den CD18-Antikörpern (IB4) konzentrationsabhängig gehemmt werden konnte (-25±6% bzw. -46±1%), noch deutlicher durch Abciximab (Reopro) mit -68±9% bzw. -74±2%, weniger deutlich durch Tirofiban (Aggrastat) mit -49±4% bzw. -55±8%. Der Kontrollantikörper 11H6 zeigte dagegen auch hier keine signifikante Hemmung (-11±2% bzw. -9±7%). Verglichen mit den Vorbefunden in Abb. 4.18, wo lediglich Thrombozyten oder PMN appliziert wurden, kam es durch die kombinierte Aktivierung (PTF) erneut zu einem additiven Effekt in der pICAM-277-Luc-Expression.

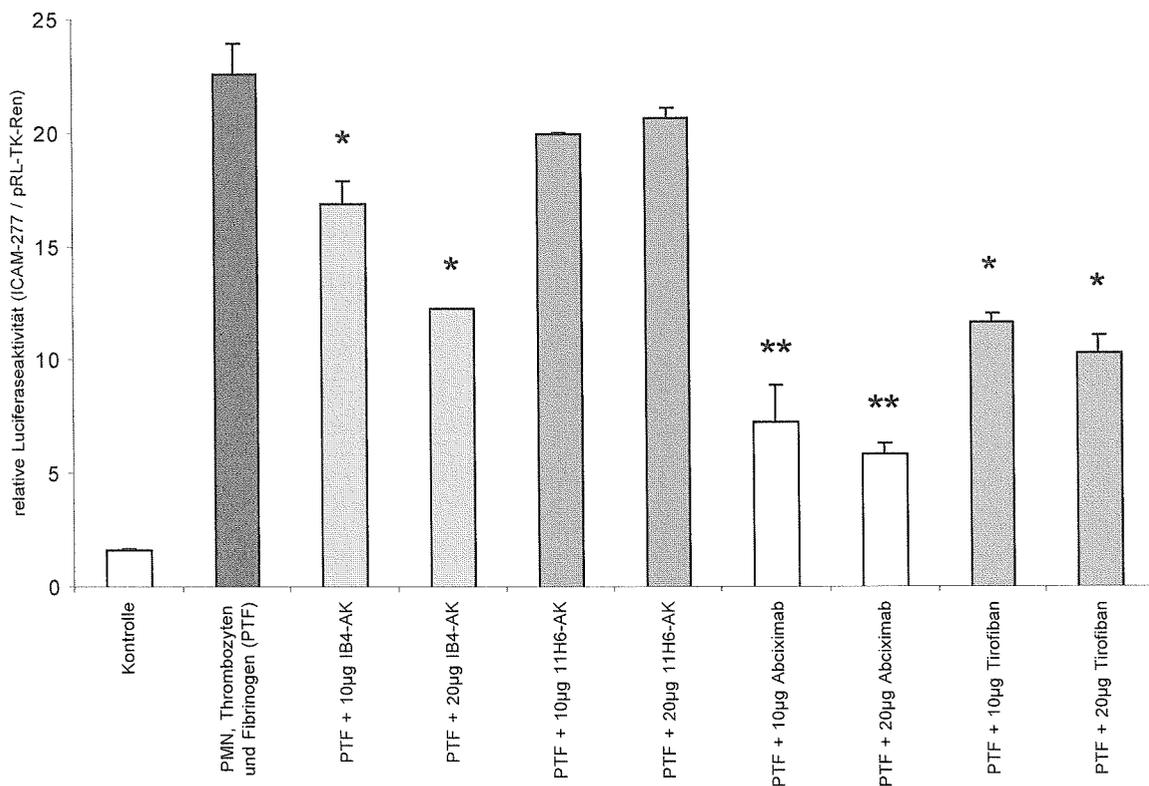


Abb. 4.19 pICAM-277-Expression nach kombinierter Aktivierung und Hemmung der Typ I-Aktivierung (n = 4)

In unserem Zellkulturmodell konnte damit gezeigt werden, dass mit Abciximab (Reopro) neben der akuten (Typ I) Endothelaktivierung auch die subakuten (Typ II) Effekte am Endothel infolge PMN-Adhäsion beeinflusst werden können. Dies galt, wenn auch in geringerem Maße, auch für Tirofiban (Aggrastat).

4.7 Vergleich von NF κ B-Decoy-ODN und Adhäsionshemmern

In Kapitel 4.5 konnte der akute Effekt (Typ I) von Adhäsionshemmern am Endothel nachgewiesen werden. Kapitel 4.6 zeigte, dass Substanzen wie die GpIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Tirofiban (Aggrastat) und Abciximab (Reopro) inhibierende Effekte auch im Rahmen der subakuten (Typ II) Endothelaktivierung vermitteln können. Nachdem bereits in Kapitel 4.4 die erfolgreiche ICAM-1-Inhibition mittels Decoy-ODN-Transfektion dargestellt werden konnte, sollte nun das Potential dieser beiden Strategien miteinander verglichen werden.

Unter Hypoxie- und Reoxygenierungsbedingungen (vgl. Material und Methoden 3.4) wurden aktivierte HUVEC (200ng TNF α /ml Medium) mit PMN, Thrombozyten und Fibrinogen gleichzeitig stimuliert (PTF), was eine 12fache pICAM-277-Expressionsteigerung gegenüber der TNF α -Kontrolle zeigte. Diese Induktion war durch Transfektion von NF κ B-Decoy-ODN (-72 \pm 8%) und den CD18-Antikörper (IB4, -64 \pm 4%) hemmbar, wohingegen Abciximab (Reopro, -51 \pm 7%) und Tirofiban (Aggrastat, -27 \pm 6%) geringere Effekte aufwiesen. Der 11H6-Kontrollantikörper bewirkte keine wesentliche pICAM-277-Luc-Inhibition (-9 \pm 4%).

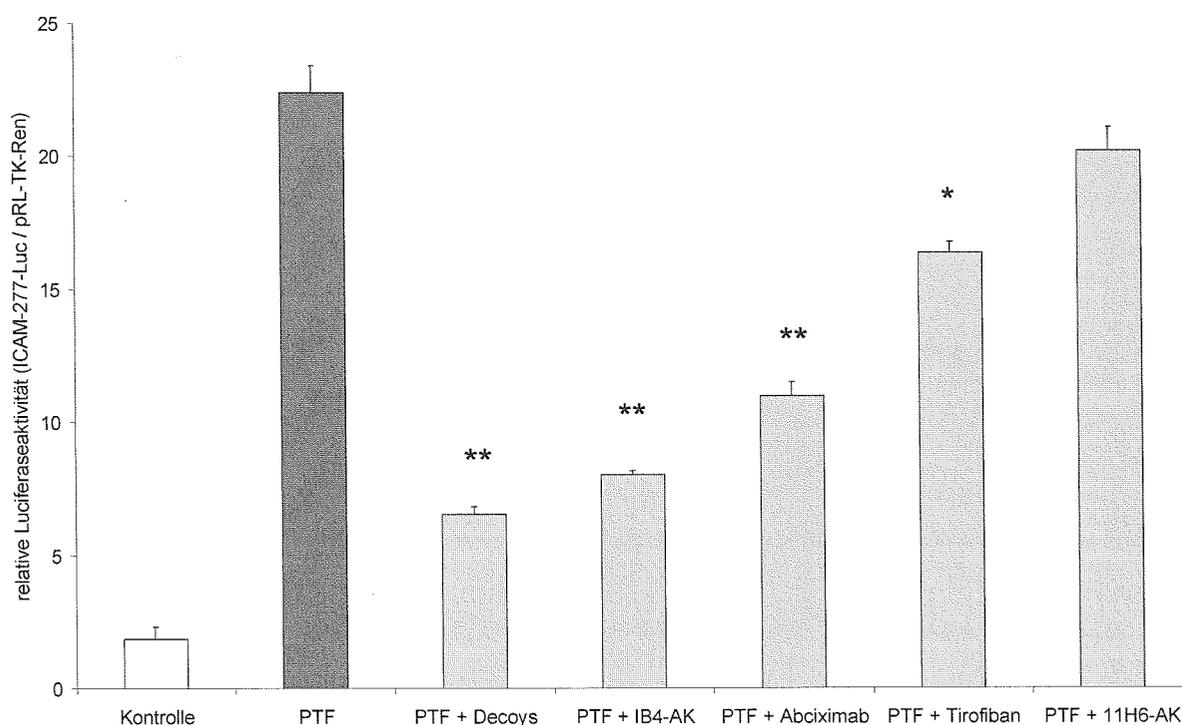


Abb. 4.20 pICAM-277 nach NF κ B-Decoy-ODN-Transfektion im Vergleich zu Adhäsionshemmern (n = 6)

Mittels Transfektion von NF κ B-Decoy-Oligodinukleotiden konnte in unseren Untersuchungen die stärkste Inhibition insbesondere der pICAM-277-Luc-Expression erzielt werden. Gleichwohl zeigten Adhäsionshemmer wie der GpIIb/IIIa-Rezeptorantagonist Abciximab (Reopro) und der CD18-Antikörper (IB4) ein ebenfalls großes Hemmpotential. Diese Erkenntnisse legten uns die Überlegung nahe, beide Hemmstrategien miteinander zu kombinieren, um eine noch bessere ICAM-1-Inhibition zu bewirken.

In Abb. 4.21 werden unsere Untersuchungsbefunde dazu dargestellt (die Daten stammen von HUVEC, vergleichbare lieferten auch HMEC): verglichen wurden jeweils die zusätzlichen Effekte von Abciximab (Reopro) oder CD18-Antikörpern (IB4) an Endothel, das zuvor entweder mit NF κ B-Decoy-ODN (weisse Balken) oder mit einer Zufallssequenz (s.c.oligo, als Negativkontrolle) transfiziert wurden (graue Balken).

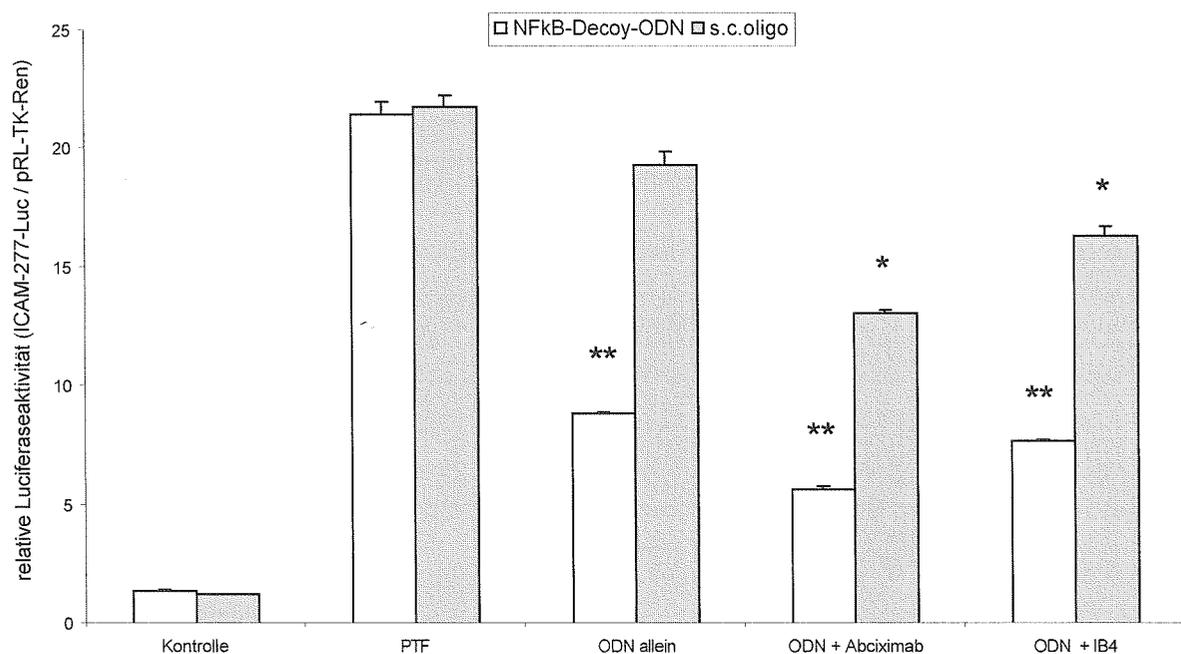


Abb. 4.21 pICAM-277-Expression nach NF κ B-Decoy-ODN bzw. s.c.oligo und Adhäsionshemmergabe (n = 4)

Die PTF-Gabe nach 24h Hypoxie und 4h Reoxygenierung bewirkte eine zunächst ca. 16fache Erhöhung der pICAM-277-Luc-Expression. Diese konnte durch Transfektion von NFκB-Decoy-ODN erfolgreich gehemmt werden ($-59\pm 4\%$), jedoch nicht durch Transfektion von s.c.oligos (Kontrollnukleotide, $-11\pm 7\%$). Die zusätzliche Gabe von Abciximab verstärkte den NFκB-Decoy-ODN-Effekt um weitere 15% ($-74\pm 4\%$ insgesamt gegenüber PTF-Aktivierung), bei s.c.oligo-transfizierten Zellen dagegen um 29% ($-40\pm 2\%$ insgesamt). Unter zusätzlicher CD18-Antikörpergabe (IB4) war kein Effekt zu messen: NFκB-Decoy-ODN-transfiziertes Endothel war mit zusätzlich 5% hemmbar ($-64\pm 3\%$ insgesamt), s.c.oligo-transfiziertes mit zusätzlich 13% ($-24\pm 4\%$ insgesamt).

Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Adhäsion von PMN auf die subakute Endothelaktivierung. Die Inhibition der (akuten) PMN- und Thrombozythenadhäsion am Endothel reduziert die Transkriptionsaktivierung durch NFκB, während nicht-adhärente PMN bzw. Thrombozyten dafür keine relevante Rolle zu spielen scheinen.

5 Diskussion

5.1 Etablierung von Zellkultur und Transfektionsmodell

Zur Untersuchung unserer Fragestellungen verwendeten wir parallel drei verschiedene Zellkulturen: mit primären, neonatalen Endothelzellen der Ratte (NECR) wurde jeder Versuchsaufbau auf seine Funktionalität hin überprüft. Mit NECR war bei uns zunächst die höchste Expressionsrate der ICAM-1 bzw. E-Selektin-Reportergenkonstrukte zu erzielen, wie auch anderenorts gezeigt werden konnte (Hein, 1998). Diese Expressionsrate konnte mit rattenspezifischem TNF α stimuliert werden. Die Stimulation mit PMN bzw. Thrombozyten wurde jedoch mit humanen Blutzellen eines gesunden Spenders durchgeführt. Hinsichtlich der Kompatibilität der Spezies musste das Modell auf humane Endothelzellen umgesetzt werden. Hierfür boten sich die gut etablierten humanen Endothelzellen der Umbilikalvene (HUVEC) und eine Tumorzelllinie humaner mikrovaskulärer Endothelzellen (CDC-HMEC-1) an, die ein mit HUVEC vergleichbares Expressionsverhalten zeigen (Ades, 1992; Xu, 1994; Tanner, 1997). Die entscheidenden Studien zur Hypoxie und Reoxygenierung bzw. PMN- und Thrombozytenapplikation wurden jeweils in beiden humanen Zellkulturmodellen (HUVEC und HMEC) durchgeführt (vgl. Ergebnisse Abb. 4.8 und 4.9).

Zunächst wurde aus verschiedenen Transfektionsverfahren die für unser Endothelzellmodell geeignete Gentransfermethode erarbeitet. Ein etabliertes Verfahren ist dabei der liposomale Gentransfer mittels kommerzieller Transfektionsreagenzien: sehr häufig verwendet wird z.B. Lipofectin™ (Invitrogen). Es konnte gezeigt werden, dass jene Methode denen der konventionellen Transfektion mittels Calciumphosphat bzw. Temperaturvarianz überlegen ist (Liu, 1997; Tanner, 1997; Teifel, 1997). Ebenso ließen sich mikrovaskuläre Endothelzellen der Ratte, ein unseren NECR vergleichbares Modell, mit derartigen, kationischen Liposomen erfolgreich und effizient transfizieren (Hein, 1998).

Die Vorteile des liposomalen Gentransfers lassen sich noch weiter optimieren, indem dieser mit attenuierten (UV-inaktivierten) Virusbestandteilen gekoppelt wird (Kaneda, 1999; 2002). Verglichen mit den rein kationischen Liposomen scheinen diese so genannten fusigenen Liposomen bzw. Virosomen überlegen (Ponimaskin, 2000). Wir übertrugen diese Methode nach einem Protokoll der Gruppe um Morishita (Dzau, 1996; Mann, 1997; Nakanishi, 1999) auf unser in vitro-Modell (vgl. Material und Methoden 3.2.1).

Trotz Varianz zahlreicher Transfektionsbedingungen und Parameter konnte damit jedoch kein suffizienter Gentransfer erzielt werden (vgl. Ergebnisse Abb. 4.1). So erscheint der HVJ-liposomale Gentransfer zwar grundsätzlich sowohl *in vitro* (Ellison, 1996; Mann, 1997) als auch *in vivo* (Dzau, 1996; Aoki, 1997) als geeignet, dennoch sind die unterschiedlichen Bedingungen eines *in vitro*-Endothelzellmodells gegenüber den *in vivo*-Verhältnissen zu berücksichtigen. Im physiologischen Gefäßsystem spielen Faktoren wie Schubspannung und der pulsatile Blutfluss eine Rolle, die *in vitro* fehlen. Möglicher Weise bedingen diese Faktoren ein verändertes Endothelzellverhalten gegenüber der HVJ-liposomalen Transfektion (Berlin, 1995; Kuijper, 1998). Insgesamt erscheint uns daher die *in vivo*-Anwendung des Gentransfer mittels HVJ-Liposomen, die einerseits in zahlreichen Voruntersuchungen belegt ist (Dzau, 1996; Aoki, 1997; Kotani, 2004) und andererseits auch in unserer Arbeitsgruppe am Schwein gezeigt werden konnte (Kupatt, 2002a), nicht auf unsere statische *in vitro*-Situation übertragbar.

Wir verglichen nun HVJ-Liposomen mit den etablierten, kommerziellen Transfektionsreagenzien Effectene und Superfect (beide Qiagen, Nikcevic, 2003). Als Kontrollen dienten zum einen untransfizierte Endothelzellen und zum anderen eine so genannte Mock-Transfektion mit leeren Liposomen. Sowohl bei Variation der Menge an Transfektionsreagenz als auch der eingesetzten DNA (Ergebnisse Abb. 4.2 und 4.3) zeigte sich eine deutlich Überlegenheit von Superfect (13 bzw. 37fach gegenüber Mock-Kontrolle) und Effectene (12 bzw. 38fach) im Vergleich zu HVJ-Liposomen (unverändert bzw. 2,5fach). Diese initial hohe Effizienz konnten wir mittels Modifikation des Herstellerprotokolls (bis zu 3fache DNA-Beladung) weiter optimieren (Teifel, 1997; Nikcevic, 2003).

Zur Evaluation der Transfektionseffizienz diente ein Renilla-Luciferase Plasmid, an das der Promoter pRL-CMV (Cytomegalievirus) bzw. pRL-TK (Herpes Simplex Virus Thymidinkinase) gekoppelt war. Renilla-Luciferase wird gängig als Kontroll-Reportergen gewählt (Ho, 2004), da sie einem fertigen Protein entspricht und zur Aktivierung keine posttranslationale Modifikation benötigt. Beim pRL-CMV Plasmid zeigte sich eine vorbeschriebene, hohe Renilla-Expressionsrate (Poxon, 1999), verglichen mit dem pRL-TK-Promoter. Dieser Effekt war jedoch stark TNF α -abhängig (vgl. Ergebnisse Abb. 4.4). Verantwortlich dafür ist der CMV-Promoter, der, anders als der TK-Promoter, eine NF κ B-Bindungsstelle enthält, die nach TNF α -Stimulation eine NF κ B-Aktivierung und gesteigerte Transkription bewirkt.

5.2 Untersuchungen zur subakuten Endothelaktivierung

5.2.1 Die zentrale Rolle von NF κ B

Die Phase der subakuten Endothelaktivierung ist geprägt von Prozessen auf der Ebene zellulärer Transkriptionsfaktoren. Als einer dieser Faktoren ist NF κ B (Nuclear Factor κ B) beschrieben, der dabei eine zentrale Rolle spielt (vgl. Einleitung 1.5.2). Wie bereits vorab dargestellt, bedarf es für dessen Aktivierung einer Reihe von Zwischenschritten, die über spezifische Rezeptoren (TRAK, GFR oder TLR, Pomerantz, 1999) und Kinasen wie die NF κ B Inducing Kinase (NIK, Woronicz, 1997), das G-Protein ras, die Phosphorylierung der Phosphoinositol-3 Kinase (PIP-3) und die Proteinkinase B (AKT, Romashkova, 1999) vermittelt werden (vgl. Abb 5.1 auf der folgenden Seite).

Diese zentrale Rolle von NF κ B ließ sich auch in unserem Endothelzellmodell ermitteln: So verwendeten wir zur Detektion der endothelialen Aktivierung ein ICAM-1- bzw. E-Selektin-Reportergensystem (vgl. Material und Methoden 3.3.2 und 3.3.3), das aus Konstrukten unterschiedlicher Basenpaarlänge bestand. Unsere Untersuchungen zeigten, dass bei den beiden kurzen ICAM-1-Reportern pICAM-34 und pICAM-174 nur eine sehr geringe Ruheexpression vorhanden war, die sich auch durch Stimulation mit TNF α nicht wesentlich steigerte (vgl. Ergebnisse Abb. 4.5). An diesen beiden Plasmiden fehlte jeweils die NF κ B-Bindungssequenz, eine 49 Monomere lange Region im ICAM-1-Promoter (Wolle, 1995). Erst bei den beiden längeren Konstrukten pICAM-277 und pICAM-339, die diese NF κ B-Bindungsstelle enthielten (bei pICAM-339 zusätzlich eine AP-1-Bindungsstelle), war eine TNF α -bedingte Regulation nachweisbar (Gorgoulis, 2003). Diese Untersuchungen zeigten, dass für die Endothelaktivierung NF κ B tatsächlich einen wichtigen Schritt darstellt.

Eine zunächst parallele Situation begegnete uns bei den E-Selektin-Reportergenen (vgl. Ergebnisse Abb. 4.6). Das um die NF κ B-Bindungsstelle deletierte Konstrukt zeigte keine Expressionsveränderung nach TNF α -Stimulation, wie auch in anderen Studien belegt werden konnte (Hallahan, 1995; Brenner, 1996). Leider verhielten sich aber auch die verwendeten E-Selektin-Reportergene mit regelhaften 2 (LS-48 und 51) bzw. 3 (LS-112 bzw. full length) NF κ B-Bindungssequenzen nicht ausreichend signifikant im Expressionsverhalten. Eine mögliche Erklärung sehen wir in (herstellungs- oder haltbarkeitsbedingt) unexakten Sequenzen an deren NF κ B-Bindungsdomänen. Vor einer sehr aufwendigen Nachsequenzierung der E-Selektin-Reportergene konzentrierten wir uns für die weiteren Studien daher ausschließlich auf das ICAM-1-Reportergensystem.

5.2.2 Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren

In unseren Untersuchungen lies sich durch $\text{TNF}\alpha$ -Gabe eine 2 bis 3fache Hochregulation des ICAM-1-Reportergens gegenüber unstimuliertem Endothel beobachten (vgl. Ergebnisse Abb. 4.5 und 4.6). Uns diente dies als Ausgangsbedingung für die Situation des aktivierten Endothels, zumal diese $\text{TNF}\alpha$ -Induktion auch als ein klassischer Weg der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung vorbeschrieben ist (Kalogeris, 1999; Becker, 2000). Wir konnte in Voruntersuchungen eine sehr frühe Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ an aktiviertem Endothel messen (Kupatt, 1999), ebenso wird $\text{NF}\kappa\text{B}$ bzw. der IKK-Komplex jedoch auch durch andere Zytokine wie Interleukin-1 und Wachstumsfaktoren (basicFGF, VEGF, IGF-1) initiiert (Dustin, 1986).

Abb. 5.1 soll eine Übersicht der beschriebenen, endothelialen Aktivierungskaskaden geben: entscheidend dabei ist, dass es nach dem initialen $\text{TNF}\alpha$ -Reiz und der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Degradation (Phosphorylierung des inhibitorischen Teils des IKK-Komplexes) zur vermehrten $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Translokation in den Zellkern kommt (Karin, 1999). Nach einer vermehrten mRNA-Synthese kann konsekutiv die Transkription gesteigert werden.

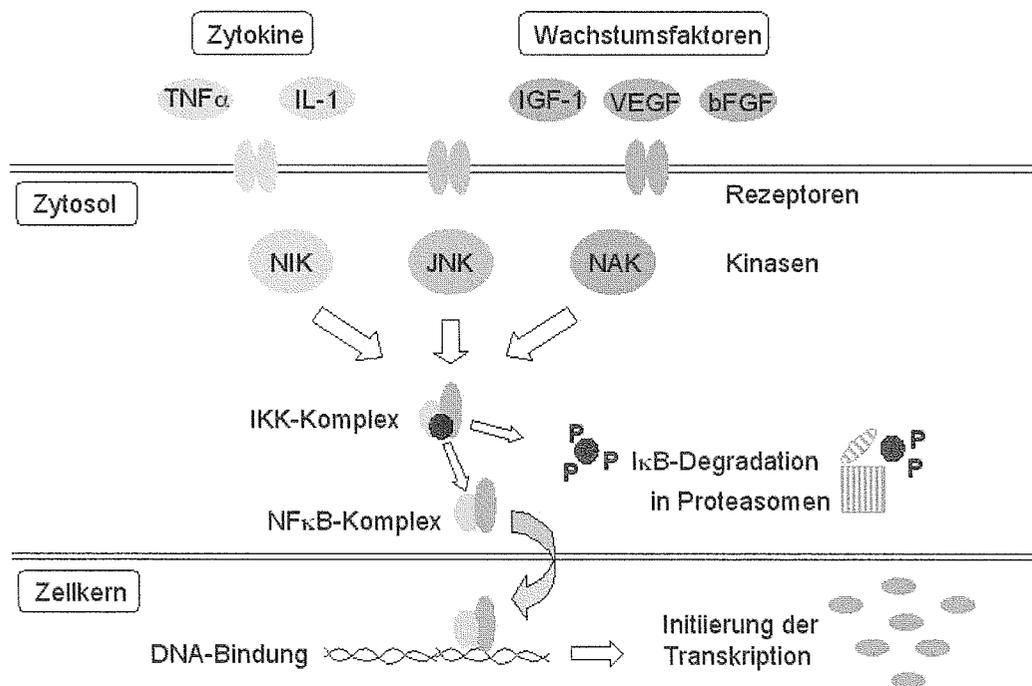


Abb. 5.1 Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf die $\text{NF}\kappa\text{B}$ -bedingte Endothelaktivierung

Durch $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation wird die Endothelzelle zur vermehrten Transkription und damit zur Expression weiterer Zytokine angeregt. Daraus lässt sich die Vorstellung eines durch $\text{TNF}\alpha$ induzierten, positiven Feedback-Mechanismus innerhalb der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalkaskade ableiten (vgl. Abb. 5.2): der initiale $\text{TNF}\alpha$ -Reiz regt eine vermehrte Proteinbiosynthese der Zelle an, die letztendlich den initialen $\text{TNF}\alpha$ -Reiz am Endothel potenziert.

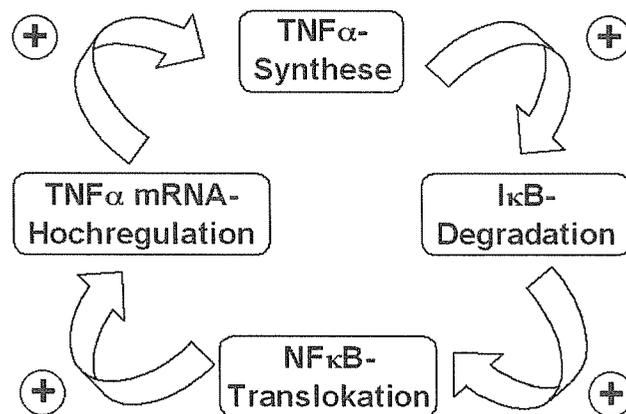


Abb. 5.2 Positiver Feedback-Mechanismus nach $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung durch $\text{TNF}\alpha$

Allerdings ist auch ein gegenregulatorischer Mechanismus nicht außer Acht zu lassen: ein negatives Feedback seitens des $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteins (zytosolischer Inhibitor von $\text{NF}\kappa\text{B}$), welches ebenfalls $\text{NF}\kappa\text{B}$ -abhängig transkribiert wird (Ozes, 1999), ist gut belegt. Der potentiell überschießenden $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Stimulation begegnet die Endothelzelle also auch mit einem eigenen, regulatorischen Mechanismus.

5.2.3 Einfluss von PMN und Thrombozyten

Endothelzellen werden auch durch PMN, Thrombozyten und Fibrinogen aktiviert und steigern dadurch die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1. Dabei spielt ebenfalls die NF κ B-Regulation eine entscheidende Rolle (vgl. Einleitung 1.3 und 1.4 sowie Kupatt, 1999; Ley, 1996; Wang, 1997).

Diese Effekte sind zahlreich vorbeschrieben: im Modell eines isolierten Rattenherzens verursacht die Applikation von PMN eine Hochregulation von ICAM-1 (mRNA Northern blot-Auswertungen, Kupatt, 1997). Dies konnten wir anhand unserer Daten auch *in vitro* bestätigen (vgl. Ergebnisse 4.3.2). In unserem Modell zeigten zudem gleichzeitig applizierte PMN und Thrombozyten eine stärkere ICAM-1-Aktivierung als jeweils PMN oder Thrombozyten allein (vgl. Ergebnisse Abb. 4.8 und 4.9). Allerdings sind hierbei die Unterschiede unseres statischen *in vitro*-Modells gegenüber den weit physiologischeren Verhältnissen eines *in vivo*- bzw. Organmodells zu berücksichtigen.

Dort konnten andere Untersuchungen auch zeigen, dass möglicher Weise P-Selektine mit CD11/CD18- (LFA-1, MAC-1) Adhäsionsmolekülen die Interaktion zwischen PMN und Endothel modulieren. Diese Regulation wird u.a. über PAF (Platelet Activating Factor) und Adenosin (Becker, 1996) bewirkt. So wurde durch Gabe eines rekombinanten Liganden bzw. monoklonalen Antikörpers gegen P-Selektin im Kleintiermodell die reperfusionsbedingte Endothel-PMN-Interaktion verringert (Lefer, 1996; Hayward, 1999).

Thrombozyten dagegen bzw. deren durch ADP oder Fibrinogen aktivierte Form vermitteln ihren Adhäsionseffekt am Endothel über CD11/CD18 und VLA-4 (Meerschaert, 1994), was in HUVEC auch unter Flussbedingungen gezeigt werden konnte (Mine, 2001). Aktivierte Thrombozyten modulieren dabei über Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1) und ICAM-1 die Endothelreaktion. In Anwesenheit aktivierter Thrombozyten konnte ebenfalls eine erhöhte NF κ B-Aktivität gemessen werden (Gawaz, 1998). Dies fand sich so auch in unseren Daten der endothelialen ICAM-1-Aktivierung (vgl. Ergebnisse Abb. 4.8 und 4.9).

Es stellt sich jedoch die Frage, inwieweit die beschriebenen Effekte nach Applikation von PMN am Endothel auch PMN-spezifisch sind. Dazu bestimmten wir in Endothelzellkulturen mittels ELISA-Myeloperoxidase-Messungen (MPO als leukozytenspezifisches Enzym, vgl. Material und Methoden 3.7.3) die PMN-Endothel-Adhäsion (in %). In Abhängigkeit von den eingesetzten Zellen (PMN allein bzw. mit Thrombozyten und Fibrinogen) fand sich eine signifikant gesteigerte Adhäsion (vgl. Ergebnisse Abb. 4.10), als Beweis einer tatsächlichen Präsenz von PMN am Endothel.

Analog zu dem beschriebenen Mechanismus eines positiven Feedbacks der NF κ B-Kaskade nach Zytokin-Stimulation (vgl. Abb. 5.2) lässt sich daher ein ebensolcher Effekt nach PMN-Applikation aufzeichnen (vgl. Abb. 5.3): so bedingt die Stimulation durch PMN eine vermehrte Freisetzung von Zytokinen und Radikalen wie TNF α , IL-1, INF- γ oder H $_2$ O $_2$ (Dustin, 1986; Rothlein, 1988; Thornhill, 1991), die über die vermehrte NF κ B-Translokation zur wiederum vermehrten ICAM-1-Transkription führt (Karin, 1999). Diese ICAM-1-Mehrsynthese ermöglicht konsekutiv die vermehrte PMN-Adhäsion am Endothel, wodurch wiederum der initiale PMN-Reiz potenziert werden kann. Dies kann dann ebenso wie nach Zytokin-Stimulation in einen positiven Feedback-Mechanismus münden.

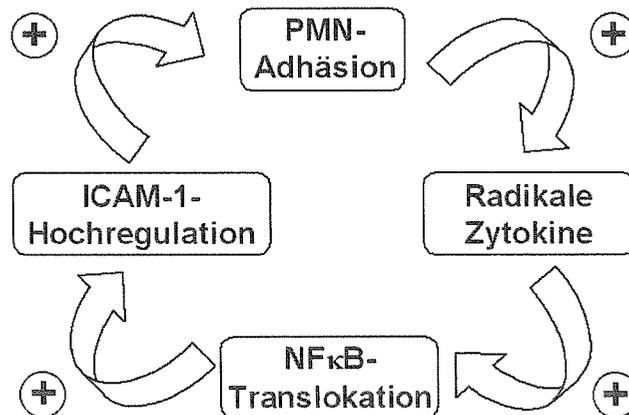


Abb. 5.3 Positiver Feedback-Mechanismus nach NF κ B-Aktivierung durch PMN

5.2.4 Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung

Die Stimulation mit Zytokinen, Wachstumsfaktoren und adhären PMN und/oder Thrombozyten führt über die NF κ B-Signalkaskade zu einer Endothelaktivierung. Eine derartige Aktivierung wird jedoch auch nach Stimulation mit Hypoxie und anschließender Reoxygenierung beschrieben (Ichikawa, 1997; Kupatt, 2000). Einerseits kann durch Hypoxie eine frühe ICAM-1-Synthese induziert werden (Beck-Schimmer, 2001), andererseits wird durch eine kombinierte Stimulation mit Hypoxie und TNF α die E-Selektin-Expression zusätzlich angeregt (Zund, 1996b). Ergänzend dazu wird beschrieben, dass Hyperoxie in Alveolarzellen zu einer vermehrten, intrazellulären Bildung von Sauerstoffradikalen führt und die NF κ B-Kaskade triggern kann (Pepperl, 2001). In isolierten Rattenherzen konnte zudem gezeigt werden, dass es nach Reoxygenierung über vermehrte Radikalbildung zu einem Anstieg der NF κ B-Aktivität und konsekutiv zur ICAM-1-mRNA-Synthese kommt (Kupatt, 1997). Die entscheidende Voraussetzung für das Ausmaß der NF κ B-vermittelten Endothelaktivierung scheint erst gegeben, wenn auf den initialen Reiz der Hypoxie eine Phase der Reoxygenierung folgt.

In unserem Zellkulturmodell simulierten wir daher diese Reperfusionssituation: Endothelzellen wurden über 24h Sauerstoff-depriviert, anschließend über 4h reoxygeniert und zeitgleich wurden PMN, Thrombozyten, Fibrinogen und der Endothelaktivator TNF α appliziert (vgl. Material und Methoden 3.4.1 und Einleitung 1.6).

Die beiden verwendeten Reportergenkonstrukte pICAM-277 und 339 zeigten in diesem Ansatz deutliche, vergleichbar starke Empfindlichkeit (Steigerung um das 2,5 bis 3fache gegenüber der Kontrolle, vgl. Ergebnisse Abb. 4.7). Damit konnten diese zunächst als Hypoxie-Reoxygenierungsabhängig definiert werden. Der kürzere, um die NF κ B-Bindungsstelle deletierte pICAM-174-Reporter verhielt sich hingegen im ICAM-1-Expressionsverhalten neutral. Die Unempfindlichkeit des pICAM-174-Fragments bestätigt erneut die Vorstellung, dass der durch Hypoxie und Reoxygenierung induzierte Weg der ICAM-1-Regulation ebenfalls über eine Aktivierung der NF κ B-Signalkaskade verläuft, was auch andere Studien zeigen konnten (Jahnke, 1995; Johnson, 1996; Cassie, 2004). Dem pICAM-174-Fragment fehlt bekannter Maßen die NF κ B-Bindungssequenz (vgl. Material und Methoden 3.3.2).

Die $\text{TNF}\alpha$ -bedingte Hochregulation der ICAM-1-Konstrukte war unter gleichzeitiger Hypoxie-Reoxygenierung und PMN-Applikation in erhöhtem Ausmaß zu beobachten (vgl. Ergebnisse Abb. 4.11). Diese additive Wirkung der verschiedenen Stimuli weist auf eine Regulierbarkeit des $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Systems hin.

Auch die E-Selektin-Expression am Endothel kann zum Beispiel über den Hypoxie-Reoxygenierungsreiz hinaus durch $\text{TNF}\alpha$ gesteigert werden (Zund, 1996a). $\text{TNF}\alpha$ scheint eine Schlüsselrolle hinsichtlich der postischämischen Inflammation zu spielen, indem weitere Faktoren aktiviert werden (Couffinhal, 1994). Die Expression von PECAM-1 dagegen ist durch Hypoxie nicht in der Weise wie durch $\text{TNF}\alpha$ induzierbar und scheint damit, anders als ICAM-1, nicht in diesen Weg der Adhäsionsaktivierung involviert (Michiels, 1998).

Bei Zusammenschau der bislang erhobenen Befunde zur Endothelaktivierung durch Zytokine, PMN, Thrombozyten bzw. Hypoxie und Reoxygenierung findet sich jeweils die $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung als charakteristisches, intrazelluläres Signal. Diese zentrale Rolle von $\text{NF}\kappa\text{B}$ in der Endothelaktivierung legt die Überlegung nahe, durch dessen Hemmung möglicher Weise einen therapeutischen, adhäsionshemmenden Effekt am Endothel zu erzielen. Unsere Arbeitshypothese stützte sich auf die in Abb. 5.4 schematisch dargestellten Zusammenhänge: der jeweils angesetzte Endothelreiz kann über positive Feedback-Mechanismen zu einer unkontrollierten Potenzierung der Endothelantwort führen, die einer Therapie bedarf.

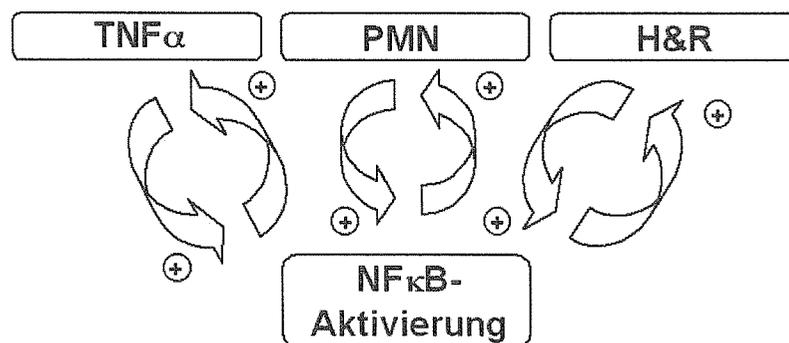


Abb. 5.4 Positiver Feedback-Mechanismus der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$, PMN oder Hypoxie- und Reoxygenierung

5.3 Möglichkeiten zur Hemmung der Endothelaktivierung

5.3.1 Hemmung der subakuten Endothelaktivierung mittels Transfektion von NF κ B-Decoy-Oligodinukleotiden

Aus unseren Beobachtungen mit den NF κ B-sensitiven ICAM-1-Reportergenkonstrukten (vgl. Diskussion 5.2.1) und den zuvor dargestellten Überlegungen ergab sich das Konzept, die NF κ B-vermittelte Endothelaktivierung therapeutisch zu beeinflussen.

Vorausgehende Untersuchungen konnten zeigen, dass so genannte Oligodinukleotide (ODN) mit der Gensequenz entsprechender Transkriptionsfaktoren wie NF κ B der molekularen Zellmanipulation dienen können (Tomita, 2003). Durch Transfektion dieser Decoy-ODN kann die NF κ B-abhängige, intrazelluläre Signaltransduktion blockiert werden (Nakamura, 2002; Morishita, 2004). Isolierte Rattenherzen zeigten nach Transfektion von NF κ B-Decoy-ODN eine signifikant bessere Toleranz bei Ischämie-Reperfusion bzw. PMN-Adhäsion (Sawa, 1997). Gleichzeitig fand sich auch eine Reduktion der Infarktgröße (Morishita, 1997). Infarzierte Rattenherzen wiesen nach NF κ B-Decoy-ODN-Transfektion zudem eine bessere Ventrikelfunktion und geringere PMN-Adhäsion (Sakaguchi, 2001) auf.

Studien in Hepatozyten zeigten, dass eine Hemmung der NF κ B-Aktivität über I κ B den Schaden durch Hypoxie-Reoxygenierung reduziert (Fan, 2004). Ein ebensolcher Effekt der NF κ B- bzw. I κ B-Beeinflussung wurde in Kardiomyozyten nachgewiesen (Onai, 2004). Andere Voruntersuchungen zeigten bei TNF α -, PMN- und Hypoxie-stimulierten HUVEC zum einen die NF κ B-Hochregulation (Western-blot) und zum anderen eine ICAM-1-, Selektin- und Interleukin-Mehrsynthese (Immunoassay- und Durchflusszytometriedaten) (Zahler, 2000). In koronaren, mikrovaskulären Endothelzellen (CMEC) wurde eine NF κ B-Hemmung durch Proteasomen-Inhibitoren (EMSA, Electro Mobility Shift Assays) beschrieben (Kupatt, 1997).

Wir verwendeten die Methodik der NF κ B-Decoy-ODN-Transfektion in unserem Zellkulturmodell (vgl. Material und Methoden 3.6) und versuchten, die TNF α -, Reoxygenierungs- und PMN-bedingte ICAM-1-Synthese zu beeinflussen. Zum Einsatz kamen NF κ B-Decoy-ODN ohne und mit einer PT-Veresterung (Phosphothioat) sowie als Kontrollen funktionslose NF κ B-Varianten (Mutante bzw. scrambled-ODN, vgl. Material und Methoden 3.6.3). In die Endothelzellen transfiziert, wirkten sie dort als fertige DNA und beeinflussten die Funktion des NF κ B-Komplex. Die Decoy-ODN verhinderten kompetitiv die Bindung des aktivierten NF κ B-Komplex an spezifische DNA-Bindungsstellen von Promotern von Zielgenen, wodurch die Transkription solcher NF κ B-abhängiger Gene wie ICAM-1- oder E- Selektin gehemmt wurde.

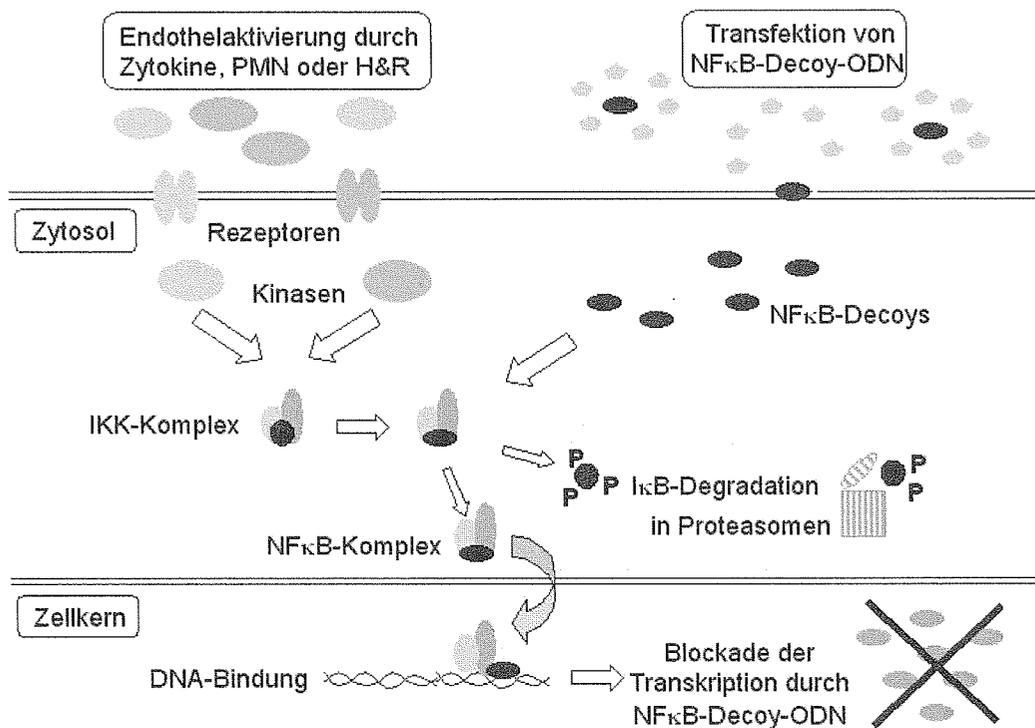


Abb. 5.5 Prinzip der ICAM-1-Synthesehemmung nach Transfektion von NF κ B-Decoy-ODN

In Voruntersuchung zeigte sich, dass bereits am nativen Endothel, das keiner Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$, PMN oder Hypoxie-Reoxygenierung ausgesetzt war, eine gewisse ICAM-1-Ruheaktivität vorhanden ist. Je nach Inkubationsdauer konnte durch Transfektion von $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Decoy-ODN die ICAM-1-Rate dort, wenn auch auf insgesamt sehr niedrigem Niveau, bereits um bis zu -75% gesenkt werden.

In $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Reporterassays am Mausmodell konnte ebenso eine $\text{TNF}\alpha$ -Induktion und entsprechende Hemmung durch Decoy-ODN-Transfektion gezeigt werden (Tomita, 2000). Durch $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Decoy-ODN-Transfektion konnte bei uns zunächst eine ICAM-1-Suppression um $-43\pm 11\%$, durch PT-(Phosphothioat) veresterte $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Decoy-ODNs um $-64\pm 6\%$ und durch die funktionslose $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Mutanten kein relevanter Effekt ($-2\pm 3\%$) erzielt werden (vgl. Ergebnisse Abb. 4.12). Die Modifikationen der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Decoy-ODN (Phosphothioat am freien Ende der Phosphatgruppe, vgl. Material und Methoden 3.6.2) hemmt intrazelluläre Exonukleasen und Proteinasen (Iversen, 1991). Die dadurch längere Halbwertszeit der PT- $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Decoy-ODN ist wahrscheinlich für die stärkere Hemmung der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -sensitiven Reporterexpression verantwortlich.

Als andere, vergleichbare Möglichkeit der molekularen Stabilisierung von transfizierten Nukleotiden sei die so genannte LNA (Locked Nucleic Acids) erwähnt (Petersen, 2000). Diese Nukleotide weisen eine zusätzliche Methylenbrücke am Ribosering auf und zeigen dadurch eine ebenfalls höhere, intrazelluläre Molekülstabilität (Koshkin, 1998; Crinelli, 2002). Hierzu bieten sich ggf. weiterführende Untersuchungen an.

5.3.2 Hemmung der akuten Endothelaktivierung

Nach einer gängigen Einteilung verläuft die endotheliale Aktivierung in zwei Phasen (Pober, 1990; Ichikawa, 1997). Es wird eine frühe Phase nach Sekunden bis Minuten (akute Phase bzw. Typ I) beschrieben, in der im wesentlichen eine posttranslationale Modifikation bereits gespeicherter Proteine stattfindet. Die subakute Phase (Typ II) hingegen beginnt nach Stunden bis Tagen und ist geprägt von einer transkriptionellen Aktivierung mit vermehrter Expression von Adhäsionsmolekülen (Kukielka, 1994; Zund, 1996b und vgl. Einleitung 1.5).

Im Rahmen der akuten Reperfusion sind zahlreiche Oberflächenrezeptoren als mitverantwortlich für das Adhäsionsgeschehen beschrieben (vgl. Einleitung 1.3). Gegen einige dieser Adhäsionsmoleküle wurden bereits therapeutische Strategien mittels monoklonaler Antikörper entwickelt. So kann der Leukotaxis über C5a-Antikörper (aktivierter Komplementfaktor), dem Leukozytenrolling über P-Selektin-AK, PSGL-1-AK, L- und E-Selektin-AK und der festen Leukozytenadhäsion mittels MAC-1 bzw. CD11b/CD18-AK begegnet werden (Nigam, 2002). Im Hundemodell konnte z.B. mittels P-Selektin-AK (Lefer, 1996) und im Kaninchenmodell mittels CD11b/CD18-AK (Simpson, 1988) der PMN-vermittelte Endothelschaden nach Reperfusion reduziert werden. Diese Erkenntnisse ließen sich jedoch bislang nur unzureichend auf den klinischen Alltag übertragen. Es existieren dagegen Ansätze, dem Effekt der ischämiegetriggerten Thrombozytenaggregation therapeutisch zu begegnen. In diesem Zusammenhang seien die GpIIb/IIIa-Antagonisten (Abciximab, Tirofiban) erwähnt, die in der modernen Behandlung z.B. des Akuten Koronarsyndroms ein Mittel der Wahl sind (vgl. Material und Methoden 3.5). Mit bewährten Wirkstoffen wie Acetylsalicylsäure oder dem ADP-Antagonist Clopidogrel versucht man, dem Aggregationsgeschehen auf thrombozytärer Seite möglichst dauerhaft zu begegnen.

Vom GpIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Abciximab (Reopro), einem monoklonalen Antikörper, sind neben einer Thrombozytenaggregationshemmung auch Effekte am aktivierten Endothel und an PMN (MAC-1-Rezeptor) beschrieben (Nigam, 2002; Schwarz, 2002). In unseren Messungen lag das adhäsionshemmende Potential von Abciximab (Reopro) nach PMN-Stimulation bei -74%, nach Stimulation mit PMN, Thrombozyten und Fibrinogen bei -71% (vgl. Ergebnisse Abb. 4.16). Weiterführend zeigte die Abciximab-Gabe zunächst einen ebenso deutlichen, adhäsionshemmenden Effekt (-78% Adhäsion nach Stimulation mit PMN, Thrombozyten und Fibrinogen gegenüber den unbehandelten Kontrollen). Die Gabe von CD18-Antikörpern (IB4, -74% adhärenente PMN) oder Tirofiban (Aggrastat, -68% adhärenente PMN) unterschied sich dem gegenüber nur unwesentlich (vgl. Ergebnisse Abb. 4.17).

5.3.3 Effekte auf die subakute Endothelaktivierung bei Hemmung der akuten Endothelaktivierung

Uns stellte sich daher die Frage, inwieweit die akute Endothelbehandlung mittels GpIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten möglicher Weise auch einen Effekt auf die subakute Endothelreaktion und damit auf die ICAM-1-Synthese hat.

Eingesetzt wurden erneut Tirofiban (Aggrastat) und Abciximab (Reopro), ein CD18-AK (IB4) und zur Kontrolle 11H6-AK (vgl. Material und Methoden 3.5). Als Stimulation diente erneut 24h Hypoxie und 4h Reoxgenation unter anschließender Applikation von einerseits Thrombozyten (10fach höhere ICAM-1-Expression), andererseits PMN (17fach höhere ICAM-1-Expression). Durch die Gabe von Adhäsionsinhibitoren war diese ICAM-1-Mehrsynthese signifikant hemmbar: Abciximab (Reopro) zeigte den stärksten Effekt, gefolgt von Tirofiban (Aggrastat) und dem CD18-Antikörper (IB4), ohne Effekt war der 11H6-Kontrollantikörper (vgl. Ergebnisse Abb. 4.18).

In unserem Modell konnte damit für Abciximab (Reopro) neben der akuten (Typ I) endothelialen Aktivierung auch ein signifikanter Effekt auf die subakute (Typ II) Endothelzellaktivierung über NF κ B-Aktivierung und auf die konsekutive ICAM-1-Mehrsynthese gezeigt werden. Auch andernorts wurde dieses Phänomen beschrieben (Schwarz, 2002). In geringerem Maße galt dies bei uns auch für Tirofiban (Aggrastat).

In einer Patientenstudie nach koronarer Stentimplantation zeigten unterschiedliche Therapie- regime mit jeweils Clopidogrel (Plavix) und Acetylsalicylsäure (Aspirin) sowie entweder Abciximab (Reopro) oder Tirofiban (Aggrastat) sehr unterschiedliche Effekte auf die Thrombozytenaggregation und Thrombinbindung (Massberg, 2003). In Therapievergleichen (wie z.B. der COMPARE-Studie) war Tirofiban bei der akuten (15min) und Abciximab tendenziell bei der subakuten (> 4h) Thrombozytenaggregation überlegen (Batchelor, 2002, vgl. auch Therapieleitlinien Akutes Koronarsyndrom der DGK).

Dass Tirofiban über die Thrombozyten- und PMN-Aggregation auch auf die damit verbundene inflammatorische Reaktion, Chemokin-Freisetzung und Adhäsionsfaktoren-Expression wirkt, zeigten Untersuchungen bei Infarktpatienten: Tirofiban-Infusionen führten zum Abfall des Serum-Entzündungsmarkers CRP (Ercan, 2004b). Ebenso zeigten sich nach Tirofiban-Infusion bei Patienten mit instabiler Angina pectoris niedrigere Serumspiegel an löslichen Adhäsionsmolekülen (sICAM-1 und sVCAM-1, Ercan, 2004a). Spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass Tirofiban am GpIIb/IIIa-Rezeptor die Molekularstruktur verändert (Sekundär- und Tertiärstruktur, Hantgan, 2002).

An diesem Rezeptor scheint zudem die Flussdynamik eine entscheidende Rolle zu spielen. In vitro unter statischen Flussbedingungen hatten verschiedene Fibane (Roxifiban, Sibrafiban, Lotrafiban und Orofiban) eine vergleichbare Adhäsionshemmung, Abciximab (Reopro) war jedoch unter Scherstress-Bedingungen, der physiologischen Situation, überlegen (Wang, 2002). Zellkulturmodelle, die in der Reperfusionssituation Flussbedingungen mit teilweise auch Vollblut imitieren, konnten unter Scherstress eine deutlich stärkere ICAM-1, VCAM-1 bzw. Selektin-Hochregulation nachweisen als unter statischen Bedingungen (Kuijper, 1998; Cassie, 2004).

Diese offenkundig physiologischere Situation unter Flussbedingungen fehlt auch in unserem statischen Endothelzellmodell, wie bereits an anderen Stellen eingeschränkt wurde (vgl. Diskussion 5.1, 5.2.3 und 5.3.4). Möglicher Weise ließen sich durch einen entsprechend aufwendigeren Versuchsaufbau auch einige der o.g. zusätzlichen Phänomene im Reperfusionsgeschehen ableiten. Zudem bieten kultivierte Endothelzellen in vitro (durch z.B. das Fehlen einer regulären Glykokalyx) auch eine andere Ausgangssituation als das physiologische Endothel in vivo. Diese veränderten Voraussetzungen bedingen, wie grundsätzlich jeder experimentelle Ansatz in vitro, mögliche Abweichungen zu den Verhältnissen in vivo.

5.3.4 Vergleich der NF κ B-Decoy-ODN-Transfektion mit Adhäsionshemmern und Perspektiven der NF κ B-Decoy-ODN-Strategie

Bislang konnten wir die Effekte von Adhäsionshemmern im Rahmen der akuten (Typ I) Endothelaktivierung zeigen und es wurde erarbeitet, inwieweit Substanzen wie GpIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Tirofiban (Aggrastat) und Abciximab (Reopro) auch inhibierende Effekte im Rahmen der subakuten (Typ II) Endothelaktivierung haben können. Zuvor wurde dargestellt, dass durch die Transfektion von NF κ B-Decoy-ODN die endotheliale ICAM-1-Synthese in entscheidendem Maße inhibierbar ist (vgl. Ergebnisse 4.4).

Einerseits konnten wir zeigen, dass durch Gabe von Adhäsionshemmer die ICAM-1-Reportergentranskription unterschiedlich stark inhibiert werden kann, und zwar am erfolgreichsten durch CD18-Antikörper (IB4), gefolgt von Abciximab (Reopro) und Tirofiban (Aggrastat), durch den Kontrollantikörper 11H6 dagegen nicht signifikant. Andererseits zeigte bei uns die Therapie mit NF κ B-Decoy-ODN im direkten Vergleich eine stärkere ICAM-1-Reportergeninhibition und stellte sich damit in unseren Untersuchungen der Gabe von Adhäsionshemmern als überlegen dar.

Unterschiedliche Ausgangspunkte legten abschließend die Überlegung nahe, beide Hemmstrategien (Adhäsionshemmer und NF κ B-Decoy-ODN-Transfektion) miteinander zu kombinieren, um möglicher Weise einen maximalen Effekt am Endothel zu erzielen. Verglichen mit den Werten nach s.c.-Transfektion (Zufallssequenzen) fanden wir beim NF κ B-Decoy-ODN-transfizierten Endothel jedoch lediglich einen geringen Effekt auf die ICAM-1-Reportergensynthese (zusätzlich -5 bis -15%) unter gleichzeitiger Gabe von Abciximab (Reopro) bzw. dem CD18-Antikörper (IB4, vgl. Ergebnisse Abb. 4.21).

Bei Zusammenschau der von uns gesammelten Befunde kann der subakuten, endothelialen Aktivierung und der damit verbundenen Mehrsynthese von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 durch einerseits Adhäsionshemmer, andererseits der Transfektion von NF κ B-Decoy-ODN erfolgreich begegnet werden. Eine Kombination dieser beiden Hemmstrategien bietet einen geringgradigen, zusätzlichen Nutzen.

Bekannter Maßen können Reperfusionssphänomene wie das myokardiale Stunning (Braunwald, 1982) und die Endotheldysfunktion (Seccombe, 1995) über eine GpIIb/IIIa-Antagonisierung therapiert werden (Kupatt, 2002b; Nigam, 2002; Schwarz, 2002). Von Tirofiban ist ebenso ein Einfluss auf die ICAM-1-Synthese beschrieben (Ercan, 2004a). Fibane zeigen dabei jedoch sehr unterschiedliches Potential am GpIIb/IIIa-Rezeptor und scheinen zudem Abciximab unterlegen (Wang, 2002). In Patientenstudien wurden nach PTCA (Percutaner Transluminaler Coronarangioplastie) bzw. Stentimplantation entweder sehr variable Ergebnisse (Batchelor, 2002) oder keine signifikante Überlegenheit einer Substanz gegenüber der anderen gefunden (Massberg, 2003).

Die NF κ B-Decoy-ODN-Strategie dagegen ist inzwischen vielfach als effiziente Therapie des endothelialen Reperfusionsschadens beschrieben (Sawa, 1997; Morishita, 2003). Sowohl in vitro (Wang, 2003) als auch im Tiermodell (Kupatt, 2002a; Yokoseki, 2001; Tomita, 2003) konnte der Reperfusionsschaden durch Gabe von NF κ B-Decoy-ODN verringert werden. In der Therapie einer experimentell erzeugten Myokarditis zeigte die NF κ B-Decoy-ODN-Transfektion gute Erfolge (Yokoseki, 2001), großes Potential wird ihr sowohl bei der Behandlung von Restenosen (Rutanan, 2002), bei der Prävention myokardialer Schädigung (Sakaguchi, 2001) und auch beim Myokardinfarkt selbst (Morishita, 1997) zugeschrieben.

Ein erfolgreicher klinischer Einsatz von NF κ B-Decoy-ODN muss kritisch abgewogen werden: erforderlich ist eine Methode zur regionalen Anwendung statt einer unkontrollierten, systemischen Applikation, zumal man weiß, dass NF κ B über das Endothel hinaus an Myozyten Apoptose induzieren kann. Insgesamt birgt die liposomale Transfektion von NF κ B-Decoy-ODN auch ein hohes Potential an Nebenwirkungen bis hin zu Allergie und Anaphylaxie. Nicht zuletzt ist auch die Pharmakokinetik der NF κ B-Decoy-ODN selbst zu berücksichtigen, inwieweit diese für eine regional und zeitlich begrenzte Anwendung geeignet sind.

Einen ersten Eindruck zukünftiger Entwicklungen des Themas der hier vorliegenden Arbeit gibt eine aktuell erschienene, klinische Fallbeschreibung: bei einem Patienten mit Myokardinfarkt zeigte sich nach zweifacher Stenteinlage in die Koronararterien im zusätzlich mit NF κ B-Decoy-ODN versorgten Gebiet eine geringere Restenoserate verglichen mit dem anderen, konventionell versorgten Stentgebiet. Ein zweiter Patient imponierte mit einer nur minimalen Intimahyperplasie 6 Monate nach Applikation von NF κ B-Decoy-ODN im Koronarstentbereich, dabei ohne wesentliche Nebenwirkungen (Jun-Ichi, 2004).

6 Zusammenfassung

Das Endothel dient im ruhenden Zustand dem Gefäß als Barriere, die jedoch durch lokale Schädigung wie Trauma, Entzündung oder Ischämie aufgelöst werden kann (Klinke, 1996; Ley, 1996). Dieses Phänomen wird auch im Zusammenhang mit der Reperfusion zuvor ischämischer Myokardareale als so genannter Reperfusionsschaden beobachtet (Jennings, 1985; Schurmann, 1997). Erst das aktivierte Endothel ermöglicht Prozesse wie das Rolling, Sticking und die Migration zuvor frei fließender PMN und Thrombozyten, die über eine Reihe von Adhäsionsmolekülen wie u.a. E-Selektin und ICAM-1 vermittelt werden (Adhäsionskaskade, Sluiter, 1993; Froese, 1994; Fuster, 1996). Vorausgehende Untersuchungen konnten zeigen, dass die Endothelaktivierung in zwei Phasen verläuft, einer akuten nach Sekunden bis Minuten (Typ I) und einer subakuten nach Stunden bis Tagen (Typ II, Pober, 1990; Ichikawa, 1997). Akute Mechanismen verwenden die Freisetzung bereits bestehender Mediatoren wie PAF, Leukotriene, H_2O_2 und posttranslationale Modifikationen, für die subakuten Effekte ist jedoch eine Neusynthese von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen erforderlich (Nawroth, 1993; Kukielka, 1994). Dabei spielen Transkriptionsfaktoren wie $NF\kappa B$ eine bedeutende Rolle (Chen, 1998; Karin, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein Zellkulturmodell mit neonatalen Rattenendothelzellen und humanen Umbilikalvenenzellen bzw. einer humanen Endothelzelllinie etabliert, womit auch Mechanismen der Hypoxie und Reoxygenierung (Reperfusionssituation) simuliert werden konnten (vgl. Material und Methoden 3.1 und 3.2). Eigens hergestellte HVJ-Liposomen (Dzau, 1996; Morishita, 1997) zeigten im Vergleich zu kommerziellen Reagenzien (Effectene, Qiagen) keine befriedigende Transfektionseffizienz, weshalb das Modell mit letzteren umgesetzt wurde (vgl. Ergebnisse 4.1 und 4.2). Nach Transfektion von Reportergenkonstrukten für ICAM-1 wurde die Expression dieser Adhäsionsmoleküle nach unterschiedlicher Zellstimulation beobachtet und mittels einer Renilla- bzw. Firefly-Luciferasemarkierung luminometrisch gemessen (vgl. Material und Methoden 3.3 und 3.7).

Auf die Stimulation mit $TNF\alpha$, PMN, Thrombozyten und/oder Hypoxie bzw. Reoxygenierung reagierten diejenigen ICAM-1-Reportergenkonstrukte in signifikantem Ausmaß, die eine entsprechende Bindungsdomäne für den Transkriptionsfaktor $NF\kappa B$ enthielten. Dort kam es regelmäßig zu einer Hochregulation der ICAM-1-Expression als Parameter einer Mehrsynthese dieser Adhäsionsmoleküle (vgl. Ergebnisse 4.3). Mittels Myeloperoxidase-Messungen (leukozytenspezifisches Enzym) konnten insbesondere adhärente PMN für diese Prozesse verantwortlich gemacht werden (vgl. Ergebnisse Abb. 4.10).

Zur Beeinflussung dieser subakuten Endothelaktivierung wurden so genannte NF κ B-Decoy-Oligodinukleotide eingesetzt (vgl. Material und Methoden 3.6), die teilweise die DNA-Bindungssequenz des intrazellulären NF κ B-Komplex besetzten. Dadurch kam es zwar noch zu einer Translokation des NF κ B-Komplex in den Zellkern, die konsekutive ICAM-1-Transkription und Proteinsynthese wurde jedoch verhindert (Tomita, 2003; Morishita, 2004). Diese NF κ B-Decoy-ODN bewirkten nach Transfektion in zuvor mit TNF α , PMN, Thrombozyten und/oder Hypoxie bzw. Reoxygenierung aktivierte Endothelzellen eine signifikante Reduktion der ICAM-1-Reportergenexpression. Noch deutlichere Effekte wurden durch eine Veresterung der NF κ B-Decoy-ODN (Phosphothioat als Proteinaseinhibitor) oder eine entsprechend frühere Transfektion (bis 48h vor Zellstimulation) gemessen (vgl. Ergebnisse 4.4).

Der akuten Interaktion zwischen Endothel und PMN bzw. Thrombozyten wird im klinischen Alltag u.a. mit GpIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten (Tirofiban und Abciximab) begegnet (Nigam, 2002; Schwarz, 2002). In unserem in vitro-Zellkulturmodell bewirkten diese Substanzen nach Endothelstimulation eine (in unterschiedlichem Ausmaß) verringerte Adhäsion von PMN und Thrombozyten am Endothel (vgl. Ergebnisse 4.5). Zudem zeigten sie überraschender Weise auch einen inhibitorischen Effekt auf die ICAM-1-Reportergenexpression und damit auf die subakute Endothelaktivierung (vgl. Ergebnisse 4.6). Abciximab war dabei Tirofiban und einem CD18-Antikörper (IB4) signifikant überlegen (vgl. Ergebnisse Abb. 4.19).

Diese Daten legten die Überlegung nahe, beiden Strategien (Adhäsionshemmer vs. NF κ B-Decoy-ODN) bezüglich ihres ICAM-1-inhibitorischen Potentials am Endothel zu vergleichen: in unseren Untersuchungen war die Transfektion von NF κ B-Decoy-ODN der Gabe von Adhäsionshemmern (Abciximab, Tirofiban oder CD18-Antikörper) überlegen (vgl. Ergebnisse Abb. 4.20). Die Kombination beider Strategien (Adhäsionshemmer und NF κ B-Decoy-ODN) zeigte geringe, zusätzliche, ICAM-1-inhibitorische Effekte (vgl. Ergebnisse Abb. 4.21).

Die Applikation von Oligodinukleotiden wird inzwischen als eine viel versprechende Therapie insbesondere ischämiebedingter, kardiovaskulärer Erkrankungen gesehen: nach Transfektion von NF κ B-Decoy-ODN wurden bislang bereits positive Effekte auf die Myokardfunktion (Sakaguchi, 2001), koronare Restenoserate (Rutanen, 2002) und den Myokardinfarkt selbst (Morishita, 1997) gezeigt. Eine aktuelle Patienten-anwendung nach koronarer Stentimplantation (Jun-Ichi, 2004) ergab bei zusätzlicher Transfektion von NF κ B-Decoy-ODN gegenüber dem konventionell versorgten Myokardareal geringere Restenoseraten.

7 Literaturnachweis

Ades E, Candal F, Swerlick R et al. HMEC-1: Establishment of an Immortalized Human Microvascular Endothelial Cell Line. *J. Invest Dermatol* 1992 (99): 683.

Altieri DC, Plescia J und Plow EF. The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen gamma chain interacts with CD11b/CD18 integrin (alpha M beta 2, Mac-1) and promotes leukocyte adhesion. *J Biol Chem.* 1993 (268): 1847.

Andrewes CH. Fifty years with viruses. *Annu Rev Microbiol.* 1973 (27): 1.

Andrian UHv, Chambers JD, McEvoy LM et al. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1991 (88): 7538.

Andrian UHv und Mackay CR. T-Cell Function and Migration - Two Sides of the Same Coin. *N Engl J Med* 2000 (343): 343.

Aoki M, Morishita R, Muraishi A et al. Efficient in vivo gene transfer into the heart in the rat myocardial infarction model using the HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan) - liposome method. *J Mol Cell Cardiol.* 1997 (3): 949.

Batchelor WB, Tolleson TR, Huang Y et al. Randomized COMparison of platelet inhibition with abciximab, tiRofiban and eptifibatide during percutaneous coronary intervention in acute coronary syndromes: the COMPARE trial. Comparison Of Measurements of Platelet aggregation with Aggrastat, Reopro, and Eptifibatide. *Circulation.* 2002 (106): 1470.

Becker BF, Zahler S, Seligmann C et al. Interaction of adenosine with leukocytes and thrombocytes. *Z Kardiol.* 1996 (85): 161.

Becker BF, Kupatt C, Massoudy P et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in myocardial ischemia and reperfusion. *Z Kardiol.* 2000 (89): IX/88-IX/91.

Beck-Schimmer B, Schimmer RC, Madjdpour C et al. Hypoxia mediates increased neutrophil and macrophage adhesiveness to alveolar epithelial cells.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2002 (85): 870.

Beug H, Katz FE, Stein A. Quantitation of membrane sites in aggregating Dictyostelium cells by use of tritiated univalent antibody. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973: 3150

Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ et al. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. Cell 1995 (80): 413.

Bevilacqua MP und Nelson RM. Selectins. J Clin Invest 1993 (91): 379.

Braunwald E und Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. Circulation 1982 (66): 1146.

Braunwald E. Shattuck lecture - cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. N Engl J Med. 1997 (337): 1360.

Brenner B, Gulbins E, Schlottmann K et al. L-selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase p56lck. Proc Natl Acad Sci U.S.A 1996 (93): 15376.

Breslow JL. Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. Nat Med. 1997 (3): 600.

Briskin MJ, McEvoy LM und Butcher EC. MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. Nature 1993 (363): 461.

Carlos TM und Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Blood 1994 (84): 2068.

Cassie S, Masterson MF, Polukoshko A et al. Ischemia/reperfusion induces the recruitment of leukocytes from whole blood under flow conditions. Free Radic Biol Med. 2004 (36): 1102.

Chen FE, Huang DB, Chen YQ und Ghosh G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature* 1998 (391): 410.

Clark EA und Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995 (268): 233.

Corbi AL, Leukocyte integrins, structure, expression and function, 1996 Heidelberg, Springer Verlag. 187.

Couffinhal T, Duplaa C, Moreau C et al. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994 (74): 225.

Crinelli R, Bianchi M, Gentilini L und Magnani M. Design and characterization of decoy oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 2002 (30): 2435.

Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol.* 1993 (171): 223.

Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK et al. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 1986 (137): 245.

Dzau VJ, Mann MJ, Morishita R und Kaneda Y. Fusigenic viral liposome for gene therapy in cardiovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 (93): 11421.

Ebnet K und Vestweber D. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol.* 1999 (112): 1.

Ellison KE, Bishopric NH, Webster KA et al. Fusigenic liposome-mediated DNA transfer into cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1996: 1385-99

Ercan E, Bozdemir H, Tengiz I et al. Decreased soluble cell adhesion molecules after tirofiban infusion in patients with unstable angina pectoris. *Thromb J.* 2004a (2): E1.

Ercan E, Tengiz I, Duman C et al. Effect of tirofiban on C-reactive protein in non-ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J.* 2004b (147): E1.

Evangelista V, Manarini S, Rotondo S et al. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18. *Blood* 1996 (88): 4183.

Fan C, Li Q, Zhang Y et al. IkappaBalpha and IkappaBbeta possess injury context-specific functions that uniquely influence hepatic NF-kappaB induction and inflammation. *J Clin Invest.* 2004 (113): 746.

Fawcett J, Holness CL, Needham LA et al. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* 1992 (360): 481.

Flynn DM, Buda AJ, Jeffords PR und Lefer DJ. A sialyl Lewis(x)-containing carbohydrate reduces infarct size: role of selectins in myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol* 1996 (271): H2086.

Frenette PS und Wagner DD. Adhesion molecules-Part I. *N Engl J Med.* 1996a (334): 1526.

Frenette PS und Wagner DD. Adhesion molecules - Part II: Blood vessels and blood cells. *N Engl J Med.* 1996b (335): 43.

Froese S, Shephard E, Adams S et al. Integrins, selectins and CAMs - the "glue of life". *S Afr Med J* 1994 (84): 759.

Fuster V, Fallon JT und Nemerson Y. Coronary thrombosis. *Lancet* 1996 (348): 7.

Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T et al. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998 (98): 1164.

Gearing AJ und Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993 (14): 506.

Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1999 (96): 2311.

Gonzalez-Amaro R, Diaz-Gonzalez F und Sanchez-Madrid F. Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs* 1998 (56): 977.

Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A et al. p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-kappaB-independent manner. *EMBO J.* 2003 (22): 1567.

Gurtner GC, Davis V, Li H et al. Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev.* 1995 (9): 1.

Hallahan D, Clark ET, Kuchibhotla J et al. E-selectin gene induction by ionizing radiation is independent of cytokine induction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 (217): 784.

Hantgan RR, Stahle MC, Jerome WG et al. Tirofiban blocks platelet adhesion to fibrin with minimal perturbation of GpIIb/IIIa structure. *Thromb Haemost.* 2002 (87): 910.

Hayward R, Campbell B, Shin YK et al. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 protects against myocardial ischemic reperfusion injury in cats. *Cardiovasc Res.* 1999 (41): 65.

Hein M, Ernst M, Moller F und Regensburger D. Gene transfer into rat heart-derived endothelial cells. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1998 (4): 460.

Heymans S, Lutun A, Nuyens D et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med.* 1999 (5): 1135.

Ho CK und Strauss JF. Activation of the control reporter plasmids pRL-TK and pRL-SV40 by multiple GATA transcription factors can lead to aberrant normalization of transfection efficiency. *BMC Biotechnol.* 2004 (4): 10.

Hogg N und Landis RC. Adhesion molecules in cell interactions.

Curr Opin Immunol. 1993 (5): 383

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.

Cell 1992 (69): 11.

Iademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD und Dean DC. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). J Biol Chem. 1992 (267): 16323.

Iademarco MF, McQuillan JJ und Dean DC. Vascular cell adhesion molecule 1: contrasting transcriptional control mechanisms in muscle and endothelium.

Proc Natl Acad Sci U.S.A 1993 (90): 3943.

Ichikawa H, Flores S, Kvietys PR et al. Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. Circ Res. 1997 (81): 922.

Issekutz TB. In vivo blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, IL-1 alpha, TNF-alpha, IFN-gamma, and C5a utilizes LFA-1, Mac-1, and VLA-4. The relative importance of each integrin. J Immunol. 1995: 6533

Iversen P. In vivo studies with phosphorothioate oligonucleotides: pharmacokinetics prologue. Anticancer Drug Des. 1991 (6): 531.

Jahnke A, Van-de-Stolpe A, Caldenhoven E et al. Constitutive expression of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is regulated by differentially active enhancing and silencing elements. Eur J Biochem. 1995 (228): 439.

Jennings RB, Schaper J, Hill ML et al. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure.

Circ Res. 1985 (56): 262.

Jensen KE, Minuse E und Ackermann WW. Serologic evidence of American experience with newborn pneumonitis virus (type Sendai). J Immunol. 1955 (75): 71.

Johnson DR, Douglas I, Jahnke et al. A sustained reduction in IkappaB-beta may contribute to persistent NF-kappaB activation in human endothelial cells.

J Biol Chem 1996 (271): 16317

Jun-Ichi S, Hiroshi I, Ryo G et al. Initial clinical cases of the use of a NF-kappaB decoy at the site of coronary stenting for the prevention of restenosis. Circ J. 2004 (68): 270.

Kalogeris TJ, Laroux FS, Cockrell A et al. Effect of selective proteasome inhibitors on TNF-induced activation of primary and transformed endothelial cells.

Am J Physiol. 1999 (276): C856.

Kaneda Y, Saeki Y und Morishita R. Gene therapy using HVJ-liposomes: the best of both worlds ? Mol Med Today. 1999 (7): 298.

Kaneda Y, Nakajima T, Nishikawa T et al. Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. Mol Ther. 2002 (2): 219.

Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies.

Blood 1996 (88): 3259.

Karin M. The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation.

J Biol Chem. 1999 (274): 27339.

Klinke R und Silbernagl S, Lehrbuch der Physiologie, 1996 Stuttgart, New York.

Thieme Verlag. 128.

Koshkin A, Singh SK, Nielsen P et al. LNA (locked nucleic acids): synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation and unprecedented nucleic acid recognition.

Tetrahedron 1998 (54): 3607–3630.

Kotani H, Nakajima T, Lai S et al. The HVJ-envelope as an innovative vector system for cardiovascular disease. Curr Gene Ther. 2004 (2): 183.

Krogerus L, Soots A, Bruggeman C et al. CMV increases TNF-alpha expression in a rat kidney model of chronic rejection. *Transplant Proc.* 2003 (35): 803.

Kubes P, Jutila M und Payne D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 1995 (95): 2510.

Kuijper PH, Gallardo Tores HI, Lammers JW et al. Platelet associated fibrinogen and ICAM-2 induce firm adhesion of neutrophils under flow conditions. *Thromb Haemost.* 1998 (80): 443.

Kukielka GL, Youker KA, Hawkins HK et al. Regulation of ICAM-1 and IL-6 in myocardial ischemia: effect of reperfusion. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 (723): 258.

Kupatt C, Weber C, Wolf DA et al. Nitric oxide attenuates reoxygenation-induced ICAM-1 expression in coronary microvascular endothelium: role of NFkappaB. *J Mol Cell Cardiol.* 1997 (29): 2599.

Kupatt C, Habazetti H, Goedecke A et al. Tumor necrosis factor-alpha contributes to ischemia- and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res.* 1999 (84): 392.

Kupatt C, Wichels R, Deiss M et al. Retroinfusion of NFkappaB decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs. *Gene Ther.* 2002a (9): 518.

Kupatt C, Wichels R, Horstkotte J et al. Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *J Leukoc Biol.* 2002b (72): 455.

Kuroya M. Newborn virus pneumonitis (type Sendai). II. The isolation of a new virus possessing hemagglutinin activity. *Yokohama Med Bull* 1953 (4): 217.

Kwee L, Baldwin HS, Shen HM et al. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development* 1995 (121): 489.

Laffon A und Gonzalez-Amaro R. Cell adhesion molecules: an overview.
Br J Rheumatol. 1995 (34): 1101.

Lefer DJ, Flynn DM und Buda AJ. Effects of a monoclonal antibody directed against P-selectin after myocardial ischemia and reperfusion. Am J Physiol. 1996 (270): H88.

Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. Cardiovasc Res. 1996 (32): 733.

Lippert H, Lehrbuch der Anatomie, 1996 Muenchen, Wien, Baltimore.
Urban und Schwarzenberg: 237.

Liu Y, Mounkes LC, Liggitt HD et al. Factors influencing the efficiency of cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. Nat Biotechnol. 1997 (2):

Maes A, Van de WF, Nuyts J et al. Impaired myocardial tissue perfusion early after successful thrombolysis. Impact on myocardial flow, metabolism, and function at late follow-up. Circulation 1995 (92): 2072.

Mann MJ, Morishita R, Gibbons GH et al. DNA transfer into vascular smooth muscle using fusogenic Sendai virus (HVJ)-liposomes. Mol Cell Biochem 1997 (172): 3.

Masinovsky B, Urdal D und Gallatin WM. IL-4 acts synergistically with IL-1 beta to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1. J Immunol. 1990 (145): 2886.

Massberg S, Mueller I, Besta F et al. Effects of 2 different antiplatelet regimens with abciximab or tirofiban on platelet function in patients undergoing coronary stenting. Am Heart J. 2003 (146): E19.

Meerschaert J und Furie MB. Monocytes use either CD11/CD18 or VLA-4 to migrate across human endothelium in vitro. J Immunol. 1994 (152): 1915.

- Michiels C, Arnould T und Remacle J. Role of PECAM-1 in the adherence of PMN to hypoxic endothelial cells. *Cell Adhes Commun.* 1998 (5): 367.
- Mine S, Fujisaki T, Suematsu M und Tanaka Y. Activated platelets and endothelial cell interaction with neutrophils under flow conditions. *Intern Med.* 2001 (40): 1085.
- Morishita R, Sugimoto T, Aoki M et al. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med.* 1997 (3): 894.
- Morishita R, Kaneda Y und Ogihara T. Therapeutic potential of oligonucleotide-based therapy in cardiovascular disease. *BioDrugs.* 2003 (17): 383.
- Morishita R, Tomita N, Kaneda Y und Ogihara T. Molecular therapy to inhibit NFkappaB activation by transcription factor decoy oligonucleotides. *Curr Opin Pharmacol.* 2004 (4): 139.
- Nakamura H, Morishita R und Kaneda Y. Molecular therapy via transcriptional regulation with double-stranded oligodeoxynucleotides as decoys. *In Vivo.* 2002 (16): 45.
- Nakanishi M, Mizuguchi H, Ashihara K et al. Gene delivery systems using the Sendai virus. *Mol Membr Biol.* 1999 (16): 123.
- Nawroth PP, Waldherr R, Zhang YM et al. Mechanism of endothelial cell activation. *Transplant Proc* 1993 (2): 2052.
- Neish AS, Williams AJ, Palmer HJ et al. Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med.* 1992 (176): 1583.
- Nigam A und Kopecky SL. Therapeutic potential of monoclonal antibodies in myocardial reperfusion injury. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2002 (2): 367.
- Nikcevic G, Kovacevic-Grujicic N und Stevanovic M. Improved transfection efficiency of cultured human cells. *Cell Biol Int.* 2003 (27): 735.

Onai Y, Suzuki J, Kakuta T et al. Inhibition of I κ B phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2004 (63): 51.

Osborn L, Hession C, Tizard R et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 1989 (59): 1203.

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA et al. NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 1999 (401): 82

Pepperl S, Dorger M, Ringel F, Kupatt C et al. Hyperoxia upregulates the NO pathway in alveolar macrophages in vitro: role of AP-1 and NF- κ B. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol*. 2001 (280): L905-L913

Petersen M, Nielsen CB, Nielsen KE et al. The conformations of locked nucleic acids (LNA). *J Mol Recognit*. 2000 (13): 44.

Pober JS und Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990 (50): 537.

Pomerantz JL und Baltimore D. NF- κ B activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *EMBO J*. 1999 (18): 6694.

Ponimaskin E, Bareesel KK, Markgraf K et al. Sendai virosomes revisited: reconstitution with exogenous lipids leads to potent vehicles for gene transfer. *Virology* 2000 (269): 391.

Postigo AA, Teixido J und Sanchez-Madrid F. The alpha 4 beta 1/VCAM-1 adhesion pathway in physiology and disease. *Res Immunol*. 1993 (144): 723.

Poxon SW und Hughes JA. A biofunctional assay to study pRL-CMV plasmid DNA formulation stability. *PDA J Pharm Sci Technol*. 1999 (53): 314.

Rice GE und Bevilacqua MP. An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* 1989 (246): 1303.

Romashkova JA und Makarov SS. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 1999 (401): 86.

Rosen SD und Bertozzi CR. The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol.* 1994 (6): 663.

Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD und Springer TA. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol.* 1986 (137): 1270.

Rothlein R, Czajkowski M, O'Neill MM et al. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *J Immunol.* 1988 (141): 1665.

Rutanen J, Markkanen J. und Yla-Herttuala S. Gene therapy for restenosis: current status. *Drugs* 2002 (62): 1575.

Sakaguchi T, Sawa Y, Fukushima N et al. A novel strategy of decoy transfection against nuclear factor-kappaB in myocardial preservation. *Ann Thorac Surg.* 2001 (71): 624.

Salk JE. A simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody. *J Immunol.* 1944 (49): 87.

Sanchez-Mateos P, Cabanas C und Sanchez-Madrid F. Regulation of integrin function. *Semin Cancer Biol.* 1996 (7): 99.

Sawa Y, Suzuki K, Bai HZ et al. Efficiency of in vivo gene transfection into transplanted rat heart by coronary infusion of HVJ liposome. *Circulation* 1995 (92): 479.

Sawa Y, Morishita R, Suzuki K et al. A novel strategy for myocardial protection using in vivo transfection of cis element "decoy" against NFkappaB binding site: evidence for a role of NFkappaB in ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 1997 (96): 280.

Schurmann G. Molecular principles and initial implications for surgery. *Cell adhesion. Chirurg.* 1997 (68): 477.

Schwarz M, Nordt T, Bode C und Peter K. The GP IIb/IIIa inhibitor abciximab (c7E3) inhibits the binding of various ligands to the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18, alphaMbeta2). *Thromb Res.* 2002 (107): 121.

Seccombe JF und Schaff HV. Coronary artery endothelial function after myocardial ischemia and reperfusion. *Ann Thorac Surg.* 1995 (60): 778.

Sen R und Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986 (47): 921.

Shattil SJ und Ginsberg MH. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* 1997 (100): 91.

Simpson PJ, Todd RF, III, Fantone JC et al. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J Clin Invest* 1988 (81): 624.

Sluiter W, Pietersma A, Lamers JM und Koster JF. Leukocyte adhesion molecules on the vascular endothelium: their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanisms underlying their expression. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993 (22): 37.

Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990 (346): 425.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994 (76): 301.

Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C et al. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 1988 (52): 925.

Staunton DE, Dustin ML und Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989 (339): 61.

Tanner FC, Carr DP, Nabel GJ und Nabel EG. Transfection of human endothelial cells. *Cardiovascular Research* 1997 (35): 522.

Teifel M, Heine LT, Milbredt S und Friedl P. Optimization of transfection of human endothelial cells. *Endothelium* 1997 (5): 21.

Thornhill MH, Wellicome SM, Mahiouz DL et al. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J Immunol.* 1991 (146): 592.

Tojima Y, Fujimoto A, Delhase M et al. NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* 2000 (404): 778.

Tomita N, Morishita R, Tomita S et al. Transcription factor decoy for NFkappaB inhibits TNF-alpha-induced cytokine and adhesion molecule expression in vivo. *Gene Ther.* 2000 (7): 1326.

Tomita N, Ogihara T und Morishita R. Transcription factors as molecular targets: molecular mechanisms of decoy ODN and their design. *Curr Drug Targets* 2003 (4): 603.

Wang JH, Sexton DM, Redmond HP et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is expressed on human neutrophils and is essential for neutrophil adherence and aggregation. *Shock* 1997 (8): 357.

Wang X, Dorsam RT, Lauver A et al. Comparative analysis of various platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists on shear-induced platelet activation and adhesion. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 (303): 1114.

Wang LL, Wei WN, Hu Y und Song SJ. Study of the inhibitory effect of NF-kappaB decoy on tissue factor gene expression and FVII activation in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2003 (24): 149.

Weber C und Springer TA. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to α IIb β 3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* 1997 (100): 2085.

Wolle J, Ferguson E, Keshava C et al. Inhibition of tumor necrosis factor induced human aortic endothelial cell adhesion molecule gene expression by an alkoxybenzo[b]thiophene-2-carboxamide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 (214): 6.

Woronicz JD, Gao X, Cao Z et al. I κ B kinase-beta: NF- κ B activation and complex formation with I κ B kinase-alpha and NIK. *Science* 1997 (278): 866.

Xu Y, Swerlick R, Sepp N et al. Characterization of Expression and Modulation of Cell Adhesion Molecules on an Immortalized Human Dermal Microvascular Endothelial Cell Line (HMEC-1). *J Invest Dermatol* 1994 (102): 833.

Yokoseki O, Suzuki J, Kitabayashi H et al. cis Element decoy against nuclear factor- κ B attenuates development of experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circ Res.* 2001 (89): 899.

Zahler S, Kupatt C und Becker BF. Endothelial preconditioning by transient oxidative stress reduces inflammatory responses of cultured endothelial cells to TNF- α . *FASEB J.* 2000 (14): 555.

Zund G, Nelson DP, Neufeld EJ et al. Hypoxia enhances stimulus-dependent induction of E-selectin on aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1996a (93): 7075.

Zund G, Dzus AL, McGuirk DK et al. Hypoxic stress alone does not modulate endothelial surface expression of bovine E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1996b: 41-5

Häufig verwendete Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase C
BD	Becton Dickinson
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
CAM	Cell Adhesion Molecule
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Center of Disease Control
cDNA	condensed Desoxyribonucleinacid
Cl	Chlorid
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
DTT	Dithioerythrit
EDTA	Ethylenediamine Tetracetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
ELAM	Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule
FCS	Fetal Calve Serum
GMP	Guanidinmonosphat
GP / Gp	Glykoprotein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O	Wasser
HAG	Hämagglutinationstest
HAU	Hämagglutinierende Units
HSV	Herpes Simplex Virus
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
HVJ	Haemagglutinating Virus of Japan (Sendai-Virus)
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin like Growth Factor
IKK	IκB Kinase
IL	Interleukin
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
LECAM	Leucocyte Endothelial Cell Adhesion Molecule
LFA	Lymphocyte Functional Antigen

LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Mac	Apple Macintosh
MAC (-1)	Membran Attack Complex
MCDB	spezielles Zellmedium (Hersteller cc-pro)
Mg	Magnesium
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger Ribonucleinacid
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NAK	NF κ B Activating Kinase
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NECR	Neonatale Endothelial Cells of the Rat
NF κ B	Nuclear Factor κ B
NIK	NF κ B Inducing Kinase
O ₂	Sauerstoff
ODN	Oligodinukleotid
PAF	Platelet Activating Factor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PIP-3	Phosphoinositol-Triphosphat (Kinase)
PKB	Proteinkinase B
PMN	Polymorphkernige Neutrophile (Granulozyten)
pRL	Renilla Luciferase Plasmid
PSGL-1	P-Selektin Glycoprotein Ligand
PT	Phosphothioat
PTCA	Percutane Transluminale Coronarangioplastie
RNA	Ribonucleinacid
TBE	Trisborat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TNFR	TNF α -Receptor
TRAF	TNF α -Receptor Activating Factor
TK	Tymidinkinase
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
VCAM	Vascular Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Fabian Müller-Hartmann
Geburt: 23.05.1973 in Würzburg
Anschrift: Lothringer Straße 28
81667 München
Nationalität: deutsch
Konfession: römisch-katholisch
Familienstand: verheiratet, einen Sohn

Klinische Tätigkeit:

01/2006 - aktuell Medizinische Klinik I, Klinikum Bogenhausen
am Städtischen Klinikum München GmbH

01/2003 - 12/2005 Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Wissenschaftliche Tätigkeit:

Mitarbeiter der Arbeitsgruppe „Kardioprotektion“ von Prof. Dr. med. P. Boekstegers,
Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern der LMU München 03/1999 - 12/2005

Mitarbeiter der Arbeitsgruppe „Vascular Genetics“ von PhD A. Hatzopoulos,
GSF-Hämatologikum für Umwelt und Gesundheit, München-Großhadern 01/2003 - 12/2003

Die hier vorliegende Medizinische Dissertation:

„Die Endothelaktivierung nach Hypoxie und Reoxygenierung - Hemmstrategien in vitro“

Mitautor bei Kupatt C, Horstkotte J, Vlastos GA et al.

„Embryonic Endothelial Progenitor Cells expressing a broad range of pro-angiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia“, FASEB J. 2005 Sep; 19 (11): 1576-8

Mitautor bei Kupatt C, Hinkel R, Vachenauer R et al.

„VEGF₁₆₅ transfection decreases postischemic NFκB-dependent myocardial reperfusion injury in vivo: role of e-nos phosphorylation“, FASEB J. 2003 Apr; 17 (6): 705-7

Mitarbeit bei Kupatt C, Wichels R, Deiss M et al.

„Retroperfusion of NFκB decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroperfusion in pigs“, Gene Ther. 2002 Apr; 9 (8): 518-26

Vortrag im Rahmen der DGK - Frühjahrstagung 2001:

„Abciximab reduziert die subakute endotheliale Aktivierung nach PMN-Endothel Interaktion in vitro“,

Stipendium der Rudolf und Brigitte Zenner Stiftung, 2000 - 2001

Praktisches Jahr innerhalb des Medizinstudiums:

05/2002 - 08/2002	Prof. Dr. med. H. Waldner, Prof. Dr. med. W. Kellermann und Dr. med. E. Höcherl, Anästhesie und Chirurgie Akademisches Lehrkrankenhaus München-Schwabing der LMU
02/2002 - 05/2002	Prof. Dr. med. G. Steinbeck, Inneren Medizin Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern der LMU München
10/2001 - 02/2002	Prof. Dr. med. H.-J. Möller, Psychiatrie und Psychotherapie, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München

Famulaturen innerhalb des Medizinstudiums:

09/2000 - 10/2000	Prof. Dr. med. G. Steinbeck, Inneren Medizin Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern der LMU München
08/1999 - 09/1999	Prof. Dr. med. J. M. Revuelta, Herz- und Gefäßchirurgie „Hospital Universitario Marqués de Valdecilla“, Santander, Spanien
03/1999 - 04/1999	Dr. med. M. Tymiec, Allgemeinärztliche Praxis und ärztlicher Notdienst der KV München
02/1998 - 03/1998	Prof. Dr. med. G. Steinbeck, Innere Medizin Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern der LMU München

Medizinische Hochschulausbildung:

10/2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Studienabschluss
09/2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/1997	Ärztliche Vorprüfung
10/1994	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Schulbildung und Zivildienst:

10/1992 - 05/1994	Arbeiter-Samariter-Bund mit Sanitätsausbildung in Würzburg
09/1983 - 07/1992	Matthias-Grünewald-Gymnasium in Würzburg
09/1979 - 07/1983	Volksschule Heuchelhof in Würzburg

Berufliche Nebentätigkeiten:

Unternehmensberatung Prof. Simon, Kucher & Partners in Bonn

Assistenz in der Praxis für Innere Medizin und Kardiologie, Dr. med. M. Linke in München

Assistenz im Ärztlichen Notdienst der KV München, Dr. med. M. Tymiec

Danksagung

Danke Herrn Prof. Dr. G. Steinbeck für die Möglichkeit eines wissenschaftlichen und ärztlichen Engagements an der Medizinischen Klinik I des Klinikums München-Großhadern. Danke Herrn Prof. Dr. P. Boekstegers für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe „Kardioprotektion“ und die stets loyale Unterstützung und Förderung. Danke Herrn PD Dr. C. Kupatt für die Überlassung und geduldige Betreuung des Themas der vorliegenden Arbeit und für seine oft ansteckende wissenschaftliche Begeisterung.

Danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Kardioprotektion“ der Medizinischen Klinik I des Klinikums München-Großhadern für ihre Freundlichkeit, dauerhafte Hilfsbereitschaft und aktive Unterstützung beim Aufbau des Zellkulturlabors und bei der Durchführung meiner Untersuchungen. Neben dem gemeinsamen, fachlichen Engagement entstanden dabei menschlicher Zusammenhalt und Freundschaften.

Danke meinen Eltern, die mir ermöglichten, meinen Weg zu gehen, der mich zu Studium, der vorliegenden Arbeit und zu so vielem mehr führt. Danke für die Sicherheit und stete Unterstützung zu jeder Zeit. Danke meiner Frau, die auch beim Entstehen dieser Arbeit mit unendlichem Verständnis, ihrer Motivation und Leichtigkeit für mich da war, und nicht zuletzt danke meinem Sohn, der meinem Weg erst die Bedeutung gibt.

