

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck

Die Bedeutung von T-Helfer-Zellen bei der Progression der koronaren Herzkrankheit

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

vorgelegt von
Stefan Max Brunner
aus
Bayreuth

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. Jörg Koglin
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. U. Hoffmann Prof. Dr. med. T. Brocker
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Heiko Methe
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Klaus Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	20.01.2005

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	Arteriosklerose	5
1.1.1	„Response to injury“-Theorie	5
1.1.2	Beteiligung des Immunsystems	9
1.2	Immunologische Prozesse und CD4 ⁺ Zellen	15
1.3	CD4 ⁺ Zellen und Arteriosklerose	22
2.	Fragestellung und Arbeitshypothese	25
3.	Material und Methoden	27
3.1	Studienpopulation	27
3.2	Blutentnahme und Blutaufbereitung	28
3.3	Separation von CD4 ⁺ Lymphozyten und CD14 ⁺ Makrophagen	28
3.4	mRNS-Extraktion aus den separierten CD4 ⁺ und CD14 ⁺ Zellen	29
3.5	RT-PCR-Assay	30
3.5.1	cDNS-Synthese	30
3.5.2	PCR-Reaktion	31
3.6	Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence activated cell sorting)	35
3.7	ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)	38
3.8	Bestimmung von CK und Troponin I	39
3.9	Statistische Auswertung	40
4.	Ergebnisse	41
4.1	Charakterisierung der Patientenkollektive	41
4.2	Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR	44
4.2.1	mRNS-Transkriptionslevel von Th1-Zellmarkern	44
4.2.2	mRNS-Transkriptionslevel von Th2-Zellmarkern	47
4.3	Ergebnisse der Durchflusszytometrie	50

4.3.1	Aktivierung von Th1-Zellen (IFN- γ ⁺ /CD3 ⁺ Zellen)	50
4.3.2	Aktivierung von Th2-Zellen (IL-4 ⁺ /CD3 ⁺ Zellen) und Th0-Zellen (IL-4 ⁺ /IFN- γ ⁺ /CD3 ⁺ Zellen)	52
4.3.3	Vergleich der Th1-Aktivierung mit Serummarkern der Myokardschädigung	54
4.4	Serum-Konzentrationen von MMP-9 und TIMP-1 im Vergleich	56
5.	Diskussion	60
6.	Zusammenfassung	70
7.	Literaturverzeichnis	72
	Legenden	91
	Danksagung	94
	Lebenslauf	96

1. Einleitung

1.1 Arteriosklerose

1.1.1 „Response to injury“-Theorie

Jenseits des 30. Lebensjahres stellt die koronare Herzerkrankung in der westlichen Welt die häufigste Todesursache dar (Braunwald 1997; Breslow 1997). Die anatomische und pathologische Grundlage für diese Erkrankung ist die Arteriosklerose. Von der WHO wird die Arteriosklerose folgendermaßen definiert: Variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut- und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Media der Arterien.

Unser heutiges Verständnis der Pathogenese arteriosklerotischer Erkrankungen gründet auf der Ende der 70er Jahre formulierten "Response-to-injury"-Theorie von Russell Ross (Ross 1976). Nach dieser Theorie können eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen als "initial injury" die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion auslösen (Ross et al. 1976, 1986, 1993). Durch diese endotheliale Dysfunktion wird eine - weitgehend unabhängig von der Art der Schädigung - monomorphe Kaskade von Ereignissen in Gang gesetzt, die zur Verlegung des Gefäßlumens und zur Ischämie des abhängigen Versorgungsgebietes führen können.

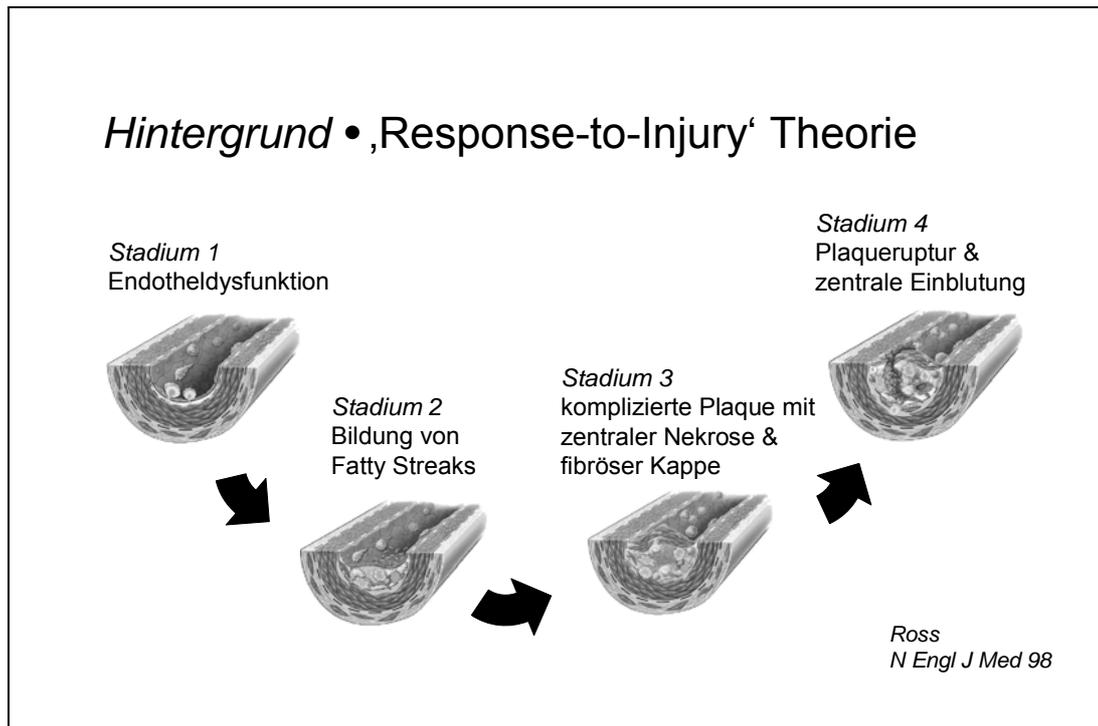


Abbildung 1
„Response to injury“ Theorie

Modellhaft wird die Progression arteriosklerotischer Läsionen bis hin zur thrombotischen Okklusion des Gefäßes mit ischämischer Infarzierung des abhängigen Myokards in vier Stadien eingeteilt:

- Initial Injury
- Fatty Streak
- Stabile Plaque
- Instabile Plaque

Das erste Stadium der Pathogenese, welches Russell Ross als „initial injury“ bezeichnet, führt zu einer endothelialen Dysfunktion. Die ersten Veränderungen im Endothel zeigen sich in einer erhöhten Permeabilität für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile. Als Ursachen, die zu dieser Dysfunktion im Gefäß führen, werden folgende Faktoren diskutiert: erhöhte und modifizierte LDL, freie Radikale, Hypertension, Diabetes mellitus, erhöhte Plasma-

Homocystein-Konzentrationen und infektiöse Mikroorganismen wie das Herpes-Virus oder Chlamydia pneumoniae. (Ross 1999)

Im zweiten Stadium lassen sich die ersten nachweisbaren Plaqueformationen finden, die sogenannten "fatty streaks", welche bereits im Kindesalter nachgewiesen werden können (Stary et al. 1994; Napoli et al. 1997). Makroskopisch imponiert diese Plaque als gelbliche, feste Läsion, die noch keine signifikante Obstruktion im Gefäßlumen bewirkt. Neben einer geringen Zahl glatter Muskelzellen, die von Lipiden (Cholesterol und dessen Ester) umgeben sind, enthalten sie lipidbeladene Makrophagen, sogenannte Schaumzellen, und andere Leukozyten (Ross 1976, 1986).

Im nächsten Stadium zeigt die Läsion eine stabile Plaque mit einer fibrösen Kappe. Makroskopisch erscheint die Läsion weißlich und ragt in das Gefäßlumen hinein. Die fibröse Kappe besteht aus mehreren Schichten glatter Muskelzellen und Bindegewebe. Darunter befindet sich eine zellreiche Zone aus teilweise mit Lipiden beladenen glatten Muskelzellen und Makrophagen. Die stabile Plaque entsteht durch eine zunehmende neointimale Akkumulation glatter Gefäßmuskelzellen und die Anreicherung extrazellulärer Matrix (Kollagen, elastische Fasern und Proteoglykanen). (Ross 1976, 1986)

Mit zunehmendem Wachstum der komplizierten Plaque bildet sich unter der zellreichen Region ein sogenannter nekrotischer Kern mit einer Ansammlung kristallisierten Cholesterols und mit einer Kalzifizierung (Ross 1976, 1986).

Das letzte Stadium wird durch das Konzept der vulnerablen Plaque bestimmt. Es ist durch eine zunehmende Instabilität der fibrösen Kappe gekennzeichnet. Die Instabilität ist zum einen die Folge des nekrotischen Kerns und einer zunehmenden Degradation der extrazellulären Matrix, zum anderen wird die Stabilität der Plaque durch die Kalzifizierung und Neovaskularisation beeinträchtigt. Als mögliche Folge dieser zunehmenden Instabilität zusammen mit einwirkenden mechanischen Scherkräften kommt es zur

Plaqueruptur (Falk et al. 1995; Fuster 1995, 1999). Diese Plaqueruptur tritt am Rand der fibrösen Kappe, der sogenannten Schulterregion, auf, die besonders reich an Schaumzellen ist. Dort ist die Plaque am dünnsten und somit am vulnerabelsten. Die Ruptur hat eine zentrale Einblutung zur Folge, die abhängig von der Thrombogenizität der Läsion zur Formation eines thrombozytenreichen Thrombus führen kann. Die Thrombogenizität der Läsion ist unter anderem abhängig von der Anwesenheit des Glykoproteins tissue factor TF. TF ist ein Schlüsselprotein bei der Auslösung des extrinsischen Systems der Gerinnungskaskade und soll ein bedeutender Regulator der Koagulation, Hämostase und Thrombose sein (Fernandez-Ortiz et al. 1994; Banner et al. 1996; Toschi et al. 1997; Badimon et al. 1999). Durch die Plaqueruptur werden Gefäßwandbestandteile wie z.B. Kollagen und Lipide freigelegt, die so dem Blut und seinen Komponenten ausgesetzt werden, was die Adhäsion von Thrombozyten fördert. Zusätzlich wird die Thrombogenizität durch eine generelle Hyperkoaguabilität im Blut gesteigert. (Davies 1990; Falk et al. 1996; Lee et al. 1997; Fuster et al. 1999; Ross 1999; Lusis 2000; Badimon et al. 2001; Libby 2001)

Das klinische Ausmaß dieser Ereignisse ist unter anderem abhängig von der Lokalisation und Größe der Thrombusformation und der Dauer der myokardialen Ischämie. Die Plaqueruptur spielt die fundamentale Rolle in der Entwicklung des akuten Koronarsyndroms (instabile Angina pectoris, akuter Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod). Ist der Thrombus, der sich nach der Plaqueruptur entwickelt, klein, bleibt der Patient häufig klinisch unauffällig. Bei relativ geringem thrombogenetischen Stimulus kann die Gefäßokklusion transient oder episodisch sein, wie es bei der instabilen Angina pectoris der Fall ist. Die instabile Angina pectoris ist im Gegensatz zur stabilen Angina pectoris durch eine abrupte Reduktion des koronaren Blutflusses charakterisiert. Eine persistierende Gefäßokklusion führt zum manifesten Myokardinfarkt. Die akute myokardiale Hypoperfusion kann weiterhin maligne ventrikuläre Arrhythmien verursachen, die zum plötzlichen Herztod führen können. (Badimon et al. 2001)

Einschränkend muss darauf hingewiesen werden, dass die stadienhafte Beschreibung der Progression der Arteriosklerose von Russell Ross Modellcharakter besitzt. Das heißt, bei einem Individuum kommen arteriosklerotische Plaques in verschiedenen Stadien vor, und nicht jede Plaque führt zwangsläufig zur Ruptur mit der Konsequenz der klinischen Manifestation des akuten Koronarsyndroms. Diese Plaques können in einem Stadium persistieren oder sich sogar zurückbilden. Außerdem ist nicht jeder Fall eines akuten Koronarsyndroms auf eine Plaqueruptur zurückzuführen. Wenn sie auch für einen Großteil der Fälle verantwortlich ist, müssen andere Ursachen, die die Sauerstoffversorgung des Myokards beeinträchtigen, wie z.B. Vasospasmus, mit bedacht werden.

1.1.2 Beteiligung des Immunsystems

Bereits vor mehr als 100 Jahren stellte der Berliner Pathologe Virchow die Hypothese auf, dass die Arteriosklerose einen entzündlichen Prozess darstelle (Virchow 1856). Dennoch konzentrierten sich die Studien zur Pathogenese der Arteriosklerose über lange Zeit auf die Endothelzellen und deren Funktion und Dysfunktion in erkrankten Gefäßen, die Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen in der Neointima und die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten im Bereich der Plaques. Erst innerhalb der letzten 20 Jahre haben wir dazugelernt, dass in jedem der von Russell Ross beschriebenen Stadien die Entzündung eine wichtige Rolle bei der Arteriosklerose spielt (Ross 1999).

Unspezifische Marker wie das CRP (C-reaktives Protein), Fibrinogen, Neopterin und Serum-Amyloid A, IL-6, Akute-Phase-Proteine, die für eine entzündliche Aktivität sprechen, wurden in einigen Arbeiten mit der koronaren Herzkrankheit in Verbindung gebracht. Sie korrelierten signifikant mit der Progression dieser Erkrankung. CRP-Level zum Beispiel liefern wichtige sowohl kurz- als auch langfristige prognostische Informationen bei der instabilen An-

gina pectoris (Liuzzo et al. 1994, 1999; Ridker et al. 1997, 2000; Maseri 1997; Biasucci et al. 1997, 1999, 2000; Ferreiros et al. 1999; Danesh et al. 2000; Garcia-Moll et al. 2000). Bei Personen mit erhöhtem CRP, die zum Abnahmezeitpunkt ansonsten klinisch unauffällig waren, konnte eine Assoziation mit zukünftigen kardialen Ereignissen gezeigt werden. Neopterin als ein weiteres Beispiel gilt als Indikator für eine Makrophagen-Aktivierung. Beim akuten Koronarsyndrom wurden erhöhte Werte gemessen (Gupta et al. 1997; Schumacher et al. 1997).

Eine Reihe unterschiedlicher Untersuchungen konnte zeigen, dass auch die Immunzellen in allen Stadien der Arteriosklerose an der Plaqueformation beteiligt sind. So kommt es in den arteriosklerotischen Läsionen zur Akkumulation von T-Zellen und Makrophagen. Nach ihrer Aktivierung sezernieren sie spezifische Effektor-Zytokine und Enzyme. (Ross 1999)

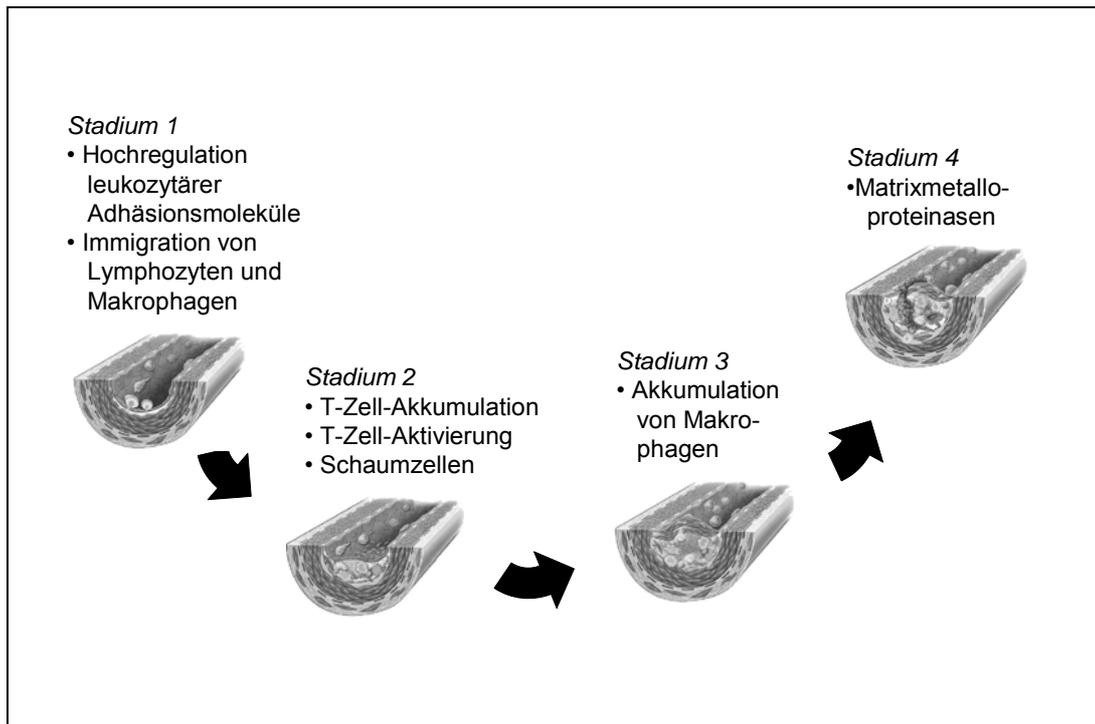


Abbildung 2
Beteiligung von Immunzellen

All diese neuen Erkenntnisse haben dazu geführt, dass die „Response-to-injury“-Hypothese von Russell Ross überarbeitet und erweitert wurde. Er beschreibt in dieser neuen Version die Arteriosklerose als Krankheit, „...that can best be described,..., as an inflammatory disease.“ (Ross 1999).

Bereits bei der von Russell Ross beschriebenen „initial injury“, der endothelialen Dysfunktion, sind Immunzellen beteiligt. Diese Dysfunktion führt zunächst zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwand (siehe oben!). Dadurch können Makromoleküle wie das LDL ungehindert immigrieren und dort akkumulieren. Die LDL-Partikel können einer Modifizierung, wie zum Beispiel einer Oxidation, unterzogen werden. Die Oxidationsprodukte stimulieren die endothelialen Zellen, was zur Freisetzung proinflammatorischer Moleküle wie Adhäsionsmoleküle, chemotaktischer Moleküle wie das monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und Wachstumsfaktoren wie der macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) führt (Lusis 2000). Die Folge ist das frühzeitige

Auftreten von aktivierten Makrophagen und Lymphozyten. Die Voraussetzung für die Immigration dieser Zellen ist die Adhäsion an der Gefäßwand, die durch das sogenannte „Homing“ und „Rolling“ gekennzeichnet ist. Dieser Vorgang wird durch Selektine (P-, E-Selektin, Interzelluläres Adhäsionsmolekül ICAM 1) gesteuert, die an ihrem Carbohydrat-Liganden (Glykokonjugate, Integrine) auf Leukozyten binden. Die feste Adhäsion von Monozyten und T-Zellen am Endothel wird unter anderem durch das Integrin VLA-4 (very late antigen) auf den Zellen gesteuert, die mit VCAM-1 (vascular-cell adhesion molecule) und der CS-1-Variante von Fibronektin interagieren (Nakashima et al. 1998; Dong et al. 1998; Shih et al. 1999; Collins et al. 2000). Für die Immigration der Leukozyten spielen zusätzlich chemotaktische Moleküle eine Rolle: monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), Osteopontin, modifiziertes LDL (Rajavashisth et al. 1990; Muller et al. 1993; Springer et al. 1996). Durch die Aktivierung dieser Zellen kommt es außerdem zu einer Hochregulation der oben erwähnten Liganden und Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die sich an diese Selektine und Chemokine binden. Diese Mechanismen führen zur Akkumulation dieser Zellen in der arteriosklerotischen Läsion (Springer et al. 1996).

Auch im Stadium der „fatty streaks“ sind Immunzellen entscheidend beteiligt. Neben lipidbeladenen Makrophagen, den sogenannten Schaumzellen, lassen sich in diesem Stadium T-Lymphozyten nachweisen. Die Schaumzellen entstehen durch die Aufnahme von oxidiertem LDL durch sogenannte Scavenger-Rezeptoren, z.B. SR-A, CD 36, CD 68 (Suzuki et al. 1997; Podrez et al. 2000; Febbraio et al. 2000). Die Expression dieser Rezeptoren wird durch Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ reguliert (Tontonoz et al. 1998). Faktoren wie der macrophage colony-stimulating factor und der granulocyte-macrophage colony-stimulating factor für Makrophagen sowie IL-2 für Lymphozyten tragen zu einer weiteren Immigration dieser Zellen bei und sind für ihr Überleben und ihre Replikation verantwortlich.

In diesem Stadium scheint auch eine CD40/CD40-Ligand-Interaktion wichtig zu sein. Auf Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen wird sowohl CD40 als auch dessen Ligand CD40L exprimiert und in diesen arteriosklerotischen Läsionen hochreguliert. Diese Interaktion resultiert in einer Produktion von inflammatorischen Zytokinen, Proteasen und Adhäsionsmolekülen (Hollenbaugh et al. 1995; Mach et al. 1998; Schönbeck et al. 2000).

Weiterhin nehmen Thrombozyten in diesem Stadium Einfluss auf das immunologische Geschehen. Sobald Thrombozyten aktiviert werden – z.B. durch freies Kollagen, geschädigtes Endothel oder auch durch Makrophagen –, schütten diese Granula aus, die Zytokine und Wachstumsfaktoren enthalten. Sie wiederum sind beteiligt an der Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen und Monozyten (Bombeli et al. 1998). Außerdem führt die Aktivierung der Thrombozyten zur Freisetzung von Arachidonsäure, die in das vasokonstriktiv wirkende Thromboxan A₂ und in Leukotriene übergeht, welche eine Immunantwort verstärken können.

In dem von Russell Ross beschriebenen fortgeschrittenen Stadium in der Progression der Arteriosklerose formieren sich fibröse Plaques mit einer fibrösen Kappe, einer zellreichen Zone und einem nekrotischen Kern. In der zellreichen Zone akkumulieren unter anderem Leukozyten und Makrophagen. Diese produzieren eine Reihe von Zytokinen (z.B. IFN- γ) und Wachstumsfaktoren, die eine Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen bewirken. Auch erhöhte Level von Homocystein und Angiotensin II haben eine stimulierende Wirkung auf glatte Muskelzellen. Dies führt somit zur Produktion von extrazellulärer Matrix, welche die fibröse Kappe bildet (Ross 1999; Lusis 2000).

Das letzte Stadium in der Progression der Arteriosklerose stellt die Plaque-Ruptur dar. Diese ist pathologischen Studien zufolge die Hauptursache akuter koronarer Ereignisse. Der Schweregrad der Stenose spielt dagegen in die-

sem Prozess, anders als bisher angenommen, eine untergeordnete Rolle (Falk et al. 1996). Das Risiko für eine Ruptur wird vor allem durch die Morphologie der Plaque bestimmt. Charakteristisch für eine vulnerable Plaque ist eine dünne fibröse Kappe und eine zunehmende Zahl inflammatorischer Zellen. Die Destabilisierung der Plaque wird zum einen durch eine Degradation der extrazellulären Matrix, die die fibröse Kappe bildet, verursacht. Zum anderen inhibiert das von T-Zellen sezernierte IFN- γ die Produktion von Matrix durch glatte Muskelzellen. Außerdem fördert IFN- γ den apoptotischen Zelltod, welcher ebenfalls zur Instabilität in der komplizierten Plaque beitragen kann (Lusis 2000).

Eine wichtige Rolle spielen in diesem Stadium proteolytische Enzyme, sogenannte Matrix-Metalloproteinasen (MMP): Kollagenasen, Gelatinasen, Elastasen, Stromelysine und Kathepsine. MMPs sind eine bedeutende Gruppe von Zn^{2+} - und Ca^{2+} -abhängigen Enzymen, die für die Degradation von extrazellulärer Matrix sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Prozessen verantwortlich sind. So spielen sie eine wichtige Rolle bei der normalen Embryogenese, bei physiologischem Remodeling oder bei Krankheiten wie der Arthritis, Osteoporose oder bei malignen Erkrankungen. Die einzelnen MMPs unterscheiden sich vor allem durch ihre Substratspezifität (Woessner 1991; Matrisian 1992; Birkedal-Hansen 1993, 1995). Eine Reihe von MMPs wird von aktivierten Makrophagen und glatten Muskelzellen in Gefäßen sezerniert, wo sie am Gefäß-Remodeling beteiligt sind. Die Aktivität dieser Enzyme wird auf drei Ebenen kontrolliert: Die Transkription wird von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie z.B. IL-1, PDGF und TNF- α gesteuert. Außerdem werden die MMPs als latente Proenzyme sezerniert, die erst durch limitierte Proteolyse aktiviert werden. Zusätzlich wird die Aktivität der MMPs durch natürlich vorkommende spezifische Inhibitoren, den sogenannten „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMP-1 und -2) beeinflusst (Woessner 1991; Matrisian 1992; Birkedal-Hansen 1993, 1995). Das System aus Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren wird neben dem bereits erwähnten physiologischen Gefäß-Remodeling insbesondere mit arterioskle-

rotischen Läsionen in Zusammenhang gebracht. So konnte dort eine gesteigerte Expression von einzelnen MMPs gezeigt werden (Henney et al. 1991; Newby et al. 1994; Dollery et al. 1995; Nikkari et al. 1995; Li et al. 1996; Pasterkamp et al. 2000). Eine zunehmende Aktivität der MMPs scheint einen entscheidenden Einfluss auf die zunehmende Instabilität und Vulnerabilität der arteriosklerotischen Plaque zu haben und mit der instabilen Angina pectoris und akuten Koronarsyndromen zu korrelieren (Moreno et al. 1994; Galis et al. 1994; Libby 1995; Shah et al. 1995; Brown et al. 1995; Lee et al. 1996; Kai et al. 1998; Inokubo et al. 2001; Uzui et al. 2002; Faia et al. 2002; Galis et al. 2002; Ikeda et al. 2003).

Eine mögliche Folge der Plaque-destabilisierenden Faktoren ist die oben beschriebene Plaqueruptur mit der darauf folgenden Thrombusformation (Falk et al. 1995; Fuster 1994, 1999).

1.2 Immunologische Prozesse und CD4⁺ Zellen

Bei der Entstehung der Arteriosklerose und der Progression zum Akuten Koronarsyndrom scheint vor allem die zelluläre Immunantwort eine entscheidende Rolle zu spielen. Heute werden die Vorgänge bei einer zellulären Immunantwort im Rahmen des sogenannten Th1/Th2-Paradigma verstanden. Die Art der zellulären Immunantwort wird primär durch das Vorhandensein von CD4⁺ Zellen bestimmt. Diese müssen zunächst aktiviert werden, um in die jeweilige T-Zell-Subpopulation ausdifferenzieren zu können. Diese Subpopulationen unterscheiden sich u.a. durch die Inducer-Zytokine, die die Richtung der Aktivierung bestimmen, und durch die Expression unterschiedlicher Effektor-Zytokine, die spezifische Effektormechanismen und –funktionen vermitteln können. (Mosmann et al. 1986; Romagnani 1991, 1994, 1999; Abbas et al. 1996)

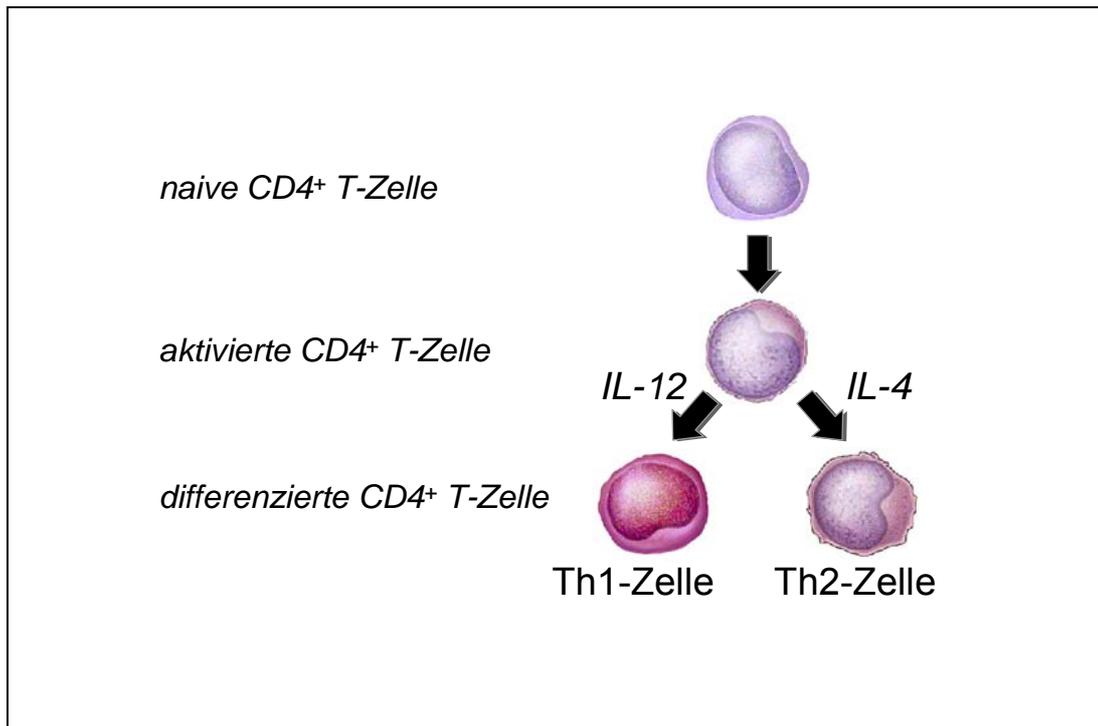


Abbildung 3
Entwicklung der T-Helfer-Zellen – Aktivierung und Differenzierung

Die Aktivierung der naiven $CD4^+$ T-Lymphozyten zu sogenannten Th0-Zellen erfolgt hauptsächlich durch Kontakt mit Proteinantigenen. Die aktivierten Th0-Zellen produzieren ein sehr breites, unspezifisches Zytokinmuster. Für die Ausdifferenzierung der Th0-Zelle in die Th1- oder Th2-Zellen ist die Bindung an den TCR (T cell receptor), zusammen mit costimulatorischen Molekülen (B7/CD28, OX40/OX40L, LFA-3/ICAM-1), und ein bestimmtes Zytokinmilieu in deren Umgebung wichtig (Maggi et al. 1992; Manetti et al. 1993; Hsieh et al. 1993; Lenschow et al. 1996; Constant et al. 1997). Zusätzlich wird die Differenzierung der Th0-Zelle von Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren bestimmt. Dies geschieht vor allem zum Zeitpunkt der Antigenpräsentation. Zu den Umwelteinflüssen zählen unter anderem der Eintrittsweg des Antigens, dessen physikalische Form, der Typ des Adjuvanten und die Dosis des Antigens. Die genetischen Faktoren sind immer noch unklar (Abbas et al. 1996).

Entscheidend für die Entwicklung der Th1-Zelle ist die Bindung an den TCR. Diese Bindung aktiviert bei Abwesenheit einer frühen IL-4-Produktion eine IFN- γ -Transkription. Zusätzlich existiert ein TCR-unabhängiger Weg, der durch die Kombination der Zytokine IL-12 und IL-18 aktiviert wird (Manetti et al. 1993; Hsieh et al. 1993; Novick et al. 1999; Murphy et al. 2000). IL-12, der stärkste Th1-Induktor, wird hauptsächlich von dendritischen Zellen produziert und durch die CD40L/CD40-Interaktion und durch die Anwesenheit von IFN- γ hochreguliert (Armant et al. 1996). Die Interaktion von IL-12 mit seinem Rezeptor resultiert in einer schnellen und selektiven Tyrosin-Phosphorylierung von STAT4 (signal transducer and activator of transcription), welcher direkt das IFN- γ -Gen reguliert (Kaplan et al. 1996). Weitere Transkriptionsfaktoren wurden gefunden, die den Promotor des IFN- γ -Gens beeinflussen. Das Zusammenspiel von verschiedenen Transkriptionsfaktoren gewährleistet eine differenzierte Regulation der IFN- γ -Promotor-Aktivität (Barbulescu et al. 1998).

Die Th1-Subpopulation ist durch die Expression der Effektorzytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α charakterisiert (London et al. 1998; Romagnani 1999). Obwohl spezifische Oberflächenmarker vermutlich nicht existieren, sind dennoch bestimmte Chemokine bevorzugt anzutreffen. Auf Th1-Zellen lässt sich bevorzugt CCR5 nachweisen (Annunziato et al. 1998; Bonecchi et al. 1998; Baggiolini 1998; Syrbe 1999).

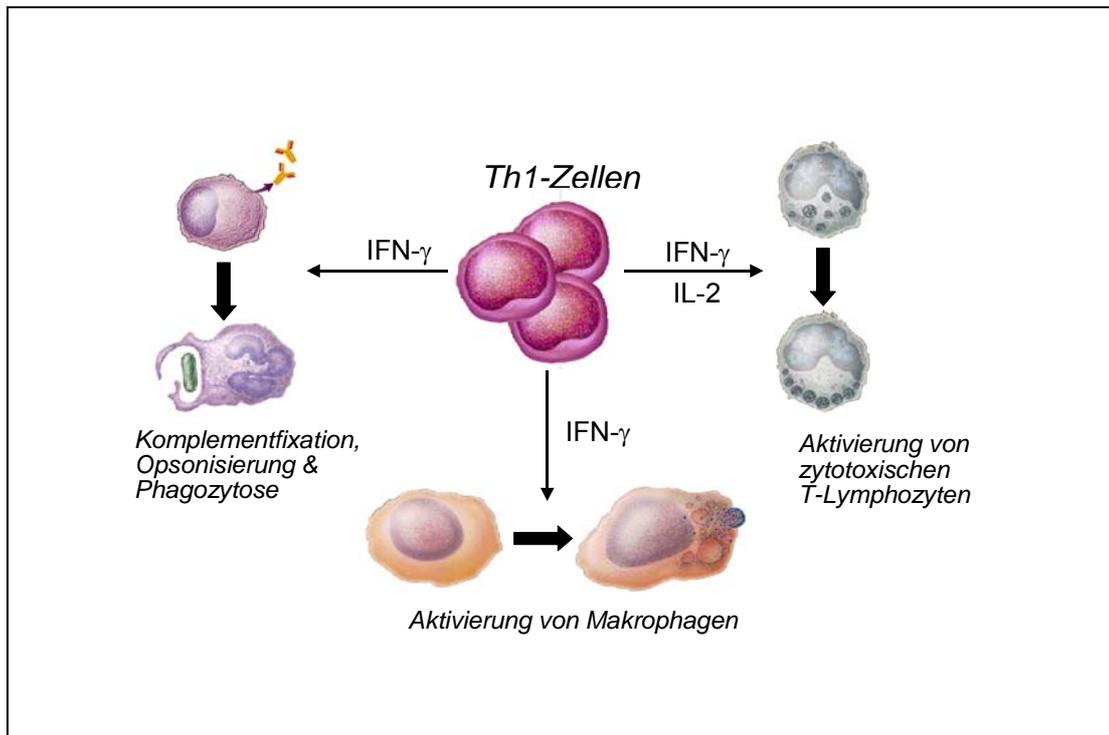


Abbildung 4
Th1-Effektorfunktionen

Die Th1-Effektorfunktion lässt sich als eine Form der zellulären Immunantwort beschreiben. So ist das Effektorzytokin IFN- γ in der Lage, Makrophagen/Monozyten zu aktivieren. IFN- γ steigert ihre mikrobizide Leistung und fördert die Komplementfixation und die Opsonisierung und somit die Zellzytotoxizität (Abbas et al. 1996). Th1-Zellen stimulieren die Differenzierung von CD8⁺ Lymphozyten in zytotoxische Zellen und die Aktivierung von Neutrophilen und NK-Zellen. Weiterhin fördern sie die Phagozytose von Mikroben und die Elimination intrazellulärer Pathogene. Die Zytokine der Th1-Zellen wirken meist proinflammatorisch und tragen auf diese Weise im Laufe einer Immunantwort auch zu den Gewebsschäden bei. Sie spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Antwort auf Selbstantigene im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankheiten. (London et al. 1998)

Die Th2-Subpopulation ist durch die Expression der Effektorzytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 charakterisiert (London et al. 1998; Romagnani 1999). Als Chemokin ist bevorzugt CRTH2 nachweisbar (Annunziato et al. 1998; Bonecchi et al. 1998; Baggiolini 1998; Nagata et al. 1999).

Für die Entwicklung von Th2-Zellen scheint in der Immunantwort eine frühe IL-4-Expression wichtig zu sein. Naive CD4⁺ Zellen sind vermutlich für eine CD28-abhängige IL-4-Produktion empfänglich, wenn sie ein schwaches TCR-Signal erhalten. Die naiven T-Helfer-Zellen sind nach initialer Aktivierung selbst in der Lage, geringe Mengen an IL-4 zu produzieren. Mit steigender IL-4-Konzentration wächst auch die Lymphozytenaktivierung. Der Effekt von IL-4 dominiert über andere Zytokine, d.h. wenn IL-4 eine gewisse Schwelle überschritten hat, dann tritt der Th2-Phänotyp auf. Weitere Quellen für die IL-4-Produktion sind bestimmte CD4⁺NK1.1⁺ Zellen und außerdem Mastzellen bzw. Basophile, die eine bereits vorhandene Th2-Antwort noch verstärken können. (Paul et al. 1994; Romagnani 2000; Murphy et al. 2000)

Die Bindung von IL-4 an seinen Rezeptor führt zu einer selektiven Tyrosin-Phosphorylierung von STAT6 (Shimoda et al. 1996). Andere Transkriptionsfaktoren aus der NF-AT-Familie (nuclear factor of activated T cells) wurden entdeckt, die den IL-4-Promotor aktivieren können; diese werden aber sowohl von Th1- als auch von Th2-Zellen exprimiert. Eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren, die von verschiedenen Zellen produziert werden, sind für die Th2-Gen-Expression entscheidend. Dazu zählen u.a. das Proto-Onkogen c-maf und GATA-3 (Rao et al. 1997; Zheng et al. 1997; Szabo et al. 1997; Kim et al. 1999; Glimcher et al. 1999).

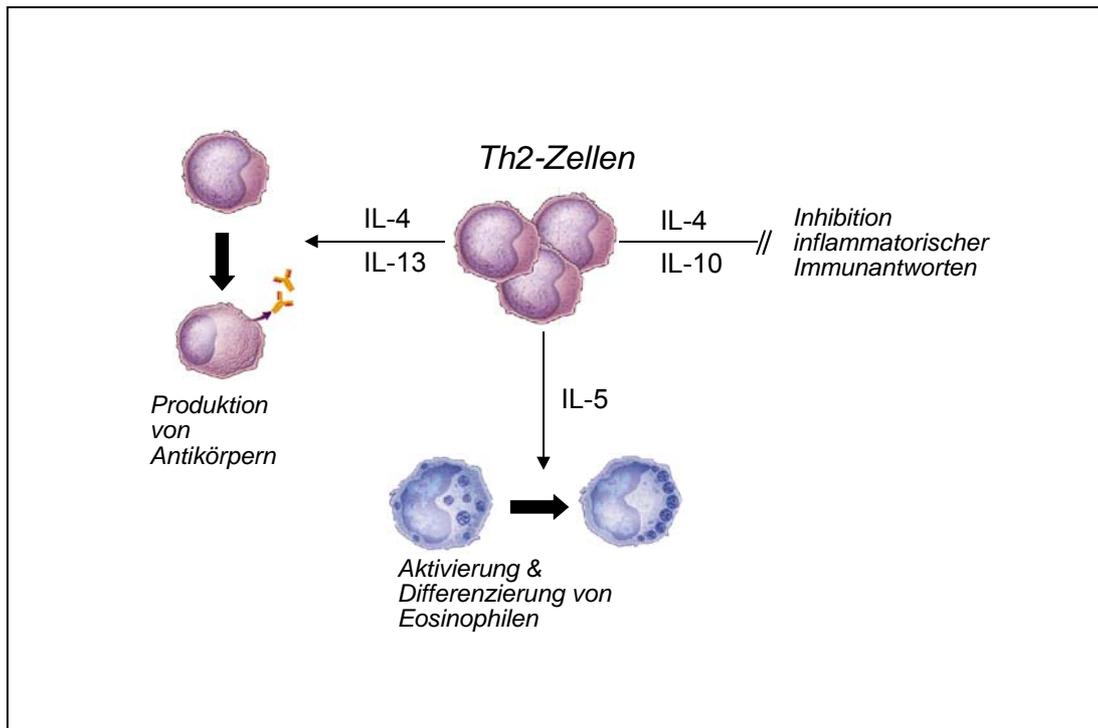


Abbildung 5
Th2-Effektorfunktionen

Die Hauptaufgabe der Th2-Zellen ist die Vermittlung einer humoralen Immunantwort. Die charakteristischen Effektorzytokine der Th2-Zellen sind in der Lage, eine starke Antikörper-Antwort auszulösen; dabei wird die Produktion von IgE und die Aktivierung und Differenzierung der Eosinophilen gefördert. Sowohl IgE als auch Eosinophile werden gewöhnlich bei Th2-Antworten gefunden, wie z.B. bei Infektionen mit Helminthen oder bei allergischen Antworten. Th2-Zellen tragen auch zur Stimulierung von B-Zellen bei, IgM und bestimmte IgG-Isotypen zu produzieren. Wichtig ist auch ihre Rolle bei der Regulation von zellvermittelten Immunantworten. Sie antagonisieren einige Funktionen von Makrophagen, inhibieren akute und chronische Entzündungen und limitieren die Th1-Immunantworten. (Abbas et al. 1996; London et al. 1998; Romagnani 2000)

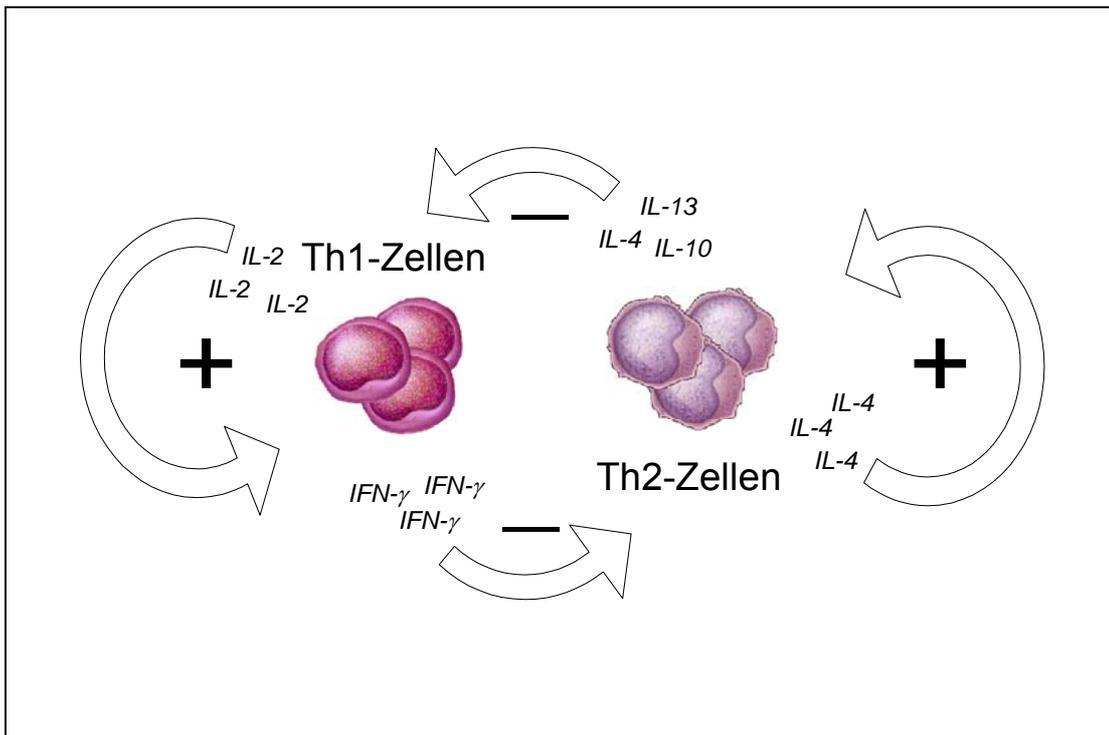


Abbildung 6
Regulation der T-Helfer-Subpopulationen

Die verschiedenen Subpopulationen der T-Helfer-Zellen sind mit Hilfe ihrer Effektorzytokine in der Lage, durch sogenannte „cross regulation“ und „feedback regulation“ sich gegenseitig zu regulieren und zu kontrollieren. Durch die Freisetzung von IL-4 amplifizieren Th2-Zellen ihre eigene Wirkung. Bei Th1-Zellen gilt das in gleicher Weise für IL-2. Das Th1-Zytokin IFN- γ hemmt die Expansion weiterer Th2-Zellen. Auf der Gegenseite werden die Th1-Zellen durch die Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 gehemmt, welche von Th2-Zellen exprimiert werden. (Abbas et al. 1996; London et al. 1998)

Neben immunphysiologischen Vorgängen werden die Subpopulationen der T-Helfer-Zellen auch mit einigen immunpathologischen Störungen in Verbindung gebracht (Romagnani 1994, 2000). In folgender Tabelle sind einige dieser Krankheiten gegenübergestellt:

Th1	Th2
Hashimoto Thyreoiditis	Omenn's Syndrom
Multiple Sklerose	Atopien
Diabetes mellitus Typ I	Progressive systemische Sklerose
Akute Abstoßungsreaktion	Kryptogenetische fibrosierende Alveolitis
M. Crohn	
Sarkoidose	

Tabelle 1

Einige prototypische pathophysiologische Zustände, die durch eine dominierende Th1- oder Th2-Antwort charakterisiert sind (Romagnani 2000)

1.3 CD4⁺ Zellen und Arteriosklerose

Unserem heutigen Wissensstand über die zelluläre Immunantwort und den Immunzellen zufolge kann man davon ausgehen, dass diese in engem Zusammenhang mit der Entstehung und Progression der Arteriosklerose stehen. Einige Arbeiten bringen CD4⁺ Zellen mit deren Effektorfunktionen als möglichen proarteriosklerotischen Stimulus in Verbindung.

Mit Hilfe von Tiermodellen wurde zunächst gezeigt, dass CD4⁺ Lymphozyten bei der Entstehung der Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielen. Als ein Modell dienten Mäuse mit einer induzierten Arteriosklerose am transplantierten Herzen als Sonderform einer immunologisch getriggerten Arteriosklerose. Im Transplantat konnten bereits früh nach der Transplantation eine Anhäufung von CD4⁺ Zellen in den Koronargefäßen gefunden werden (Koglin et al. 1998). Durch eine Blockade dieser Zellen, entweder durch anti-CD4-Antikörper oder durch eine gezielte Gendeletion, wurde die Entwicklung von arteriosklerotischen Läsionen im transplantierten Mäuseherz reduziert (Krieger et al. 1996; Räisänen et al. 1997). Eine Rekonstitution von CD4 bei diesen gendeletierten Mäusen konnte hingegen die Entstehung dieser Transplantatvaskulopathie triggern (Krieger et al. 1996).

Als ein weiteres etabliertes Arteriosklerosemodell dienen Apoprotein E-defiziente Mäuse. Ähnlich der Transplantatarteriosklerose konnte auch hier gezeigt werden, dass bei ApoE-knockout Mäusen die Gefäße von CD4⁺ Zellen infiltriert werden (Zhou et al. 1996). Mäuse, bei denen das Immunsystem blockiert war (SCID – severe combined immune deficiency), zeigen deutlich weniger arteriosklerotische Läsionen als die immunkompetenten Mäuse. Durch den Transfer von CD4⁺ Zellen konnte dieser Vorgang – ähnlich der Transplantatarteriosklerose – bei immundefizienten Mäusen rekonstruiert werden (Zhou et al. 2000).

Wie im Tiermodell, so wurde auch beim Menschen ein Zusammenhang mit CD4⁺ Zellen deutlich. Einige Studien zeigten eine Aktivierung und Expansion von CD4⁺ T-Lymphozyten bei zunehmender Instabilität der arteriosklerotischen Plaque (Hansson et al. 1989; Neri Serneri et al. 1992, 1997; Liuzzo et al. 1999).

Einen weiteren Hinweis lieferten Apoprotein E-defiziente Mäuse, die auf bestimmte Induktor-Zytokine hin untersucht wurden. Beim Vergleich der Expression von IL-4 mit IL-12 konnte gezeigt werden, dass IL-12 alleine die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen triggern kann (Lee et al. 1999).

Im Modell der Arteriosklerose am transplantierten Mäuseherzen untersuchte unsere Arbeitsgruppe den Einfluss der für CD4⁺ T-Lymphozyten typischen Transkriptionsfaktoren STAT4 und STAT6. Nach der Gendeletion dieser Transkriptionsfaktoren konnten STAT4-defiziente Mäuse die Entstehung einer Transplantatarteriosklerose unterbrechen. Bei STAT6-defizienten Mäusen waren keine Unterschiede zu erkennen (Koglin et al. 2000).

Die Th1-Antwort ist charakterisiert durch die Expression des Effektorzytokins IFN- γ . Einige Artikel weisen auf eine mögliche Bedeutung dieses Effektorzytokins hin. Bei Apoprotein E-defizienten Mäusen fand man nach Deletion des IFN- γ -Rezeptors eine deutliche Abnahme arteriosklerotischer Läsionen (Gup-

ta et al. 1997). Auch bei IFN- γ -defizienten Mäusen mit einer Transplantatarteriosklerose wurden signifikant weniger arteriosklerotische Läsionen beobachtet (Raisanen et al. 1998). Bei Patienten mit einer instabilen Angina pectoris konnte ebenfalls eine gesteigerte IFN- γ -Expression gezeigt werden (Liuzzo et al. 1999).

Als mögliche Zielzellen der Effektorfunktion von IFN- γ werden Monozyten/Makrophagen diskutiert. Makrophagen werden zusammen mit CD4⁺ Zellen in arteriosklerotischen Läsionen gefunden und zeigen mit zunehmender Instabilität eine Aktivierung (Moreno et al. 1994; Jude et al. 1994). Makrophagen von Patienten mit instabiler Angina pectoris zeigten nach Zugabe von IFN- γ in vitro eine gesteigerte Aktivität (Liuzzo et al. 2001).

2. Arbeitshypothese und Fragestellung

Basierend auf diesen Erkenntnissen über die zelluläre Immunantwort bei der Entstehung und Progression der Arteriosklerose haben wir folgende Hypothese aufgestellt:

Die Aktivierung und Differenzierung von Th1-Lymphozyten sind kausal an der Progression arteriosklerotischer Prozesse bei der koronaren Herzkrankheit mit der Folge eines akuten Myokardinfarktes beteiligt. Die Th1-Effektorfunktionen steuern diese Mechanismen und führen zu einer zunehmenden Plaqueinstabilität bei Patienten mit instabiler Angina pectoris. Zu diesen Effektorfunktionen gehört die Stimulation von Makrophagen, Matrix-Metalloproteinasen zu sezernieren, die für die Plaqueinstabilität und deren Ruptur verantwortlich sind.

Um unsere Hypothese zu verifizieren, sind wir mit folgenden Fragestellungen vorgegangen:

Zunächst haben wir für die jeweiligen Stadien charakteristische Patientenkollektive kreiert, um die Aktivierung von T-Helfer-Zellen und die Art ihrer Differenzierung in den verschiedenen Stadien der Progression der Arteriosklerose bis hin zum Myokardinfarkt zu untersuchen. Dazu wurden Patienten mit stabiler Angina pectoris, mit instabiler Angina pectoris, mit einem manifesten Myokardinfarkt und ein Kontrollkollektiv ausgewählt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und der PCR (polymerase chain reaction) haben wir zirkulierende T-Lymphozyten auf Zytokine hin untersucht, die für die T-Helfer-Subpopulationen charakteristisch sind.

In einem nächsten Schritt wollten wir abschätzen, inwieweit eine Assoziation von aktivierten Th1-Zellen und dem Auftreten von verschiedenen Myokardläsionsmarkern - Marker für die Myokardzellintegrität - besteht. Hierfür haben

wir die Kinetik der Th1-Expansion mit dem Verlauf der Myokardläsionsmarker Troponin I und Creatinphosphokinase verglichen.

Ein möglicher Effektormechanismus von Th1-Zellen zielt auf Makrophagen. Um eine mögliche Beteiligung und einen Einfluss erkennen zu können, haben wir durch ELISA in den verschiedenen Patientenkollektiven die Konzentrationen von Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren als deren Sekretionsprodukt im Blutplasma gemessen.

3. Material und Methoden

3.1 Studienpopulation

Um den zeitlichen Zusammenhang der Immunmechanismen bei der Progression akuter Koronarsyndrome zu untersuchen, wurden zwischen Juli und Oktober 2000 insgesamt 56 Patienten untersucht, die im Herzkatheterlabor des Klinikums Großhadern zur Koronarangiographie vorgestellt wurden. Abhängig von der klinischen Präsentation, den Laborergebnissen, den elektrokardiographischen Befunden und dem Ergebnis der Koronarangiographie wurden die Patienten in folgende vier Gruppen eingeteilt:

Eine Kontrollgruppe ohne jeden Anhalt für eine KHK, d.h. Patienten ohne Angina-pectoris-Symptomatik, mit normalen Laborergebnissen sowie normalen elektrokardiographischen Befunden und einem normalen Koronarangiogramm.

Eine Gruppe mit stabiler Angina pectoris, den Braunwald-Kriterien (Braunwald 1989) entsprechend definiert als über mehr als drei Monate nicht progrediente, typische Angina-pectoris-Symptomatik bei pathologischem Koronarangiogramm, normalen CK- und Troponin-Werten und regelrechtem Ruhe-Elektrokardiogramm.

Eine Gruppe mit instabiler Angina pectoris entsprechend den Braunwald-Klassen II oder III, d.h. Ruheschmerz innerhalb des letzten Monats, pathologischem Koronarangiogramm, normalem CK, mit oder ohne leicht erhöhten Troponin-Werten, mit oder ohne pathologischen elektrokardiographischen Veränderungen.

Eine Gruppe mit akutem Myokardinfarkt mit Schmerzbeginn innerhalb der letzten 12 Stunden, erhöhten CK- und Troponin-Werten und charakteristischen ST-Hebungen in ≥ 2 Ableitungen im Ruhe-Elektrokardiogramm und pathologischem Koronarangiogramm.

3.2 Blutentnahme und -aufbereitung

Bei jedem Patienten wurden vor der ersten Kontrastmittel-Injektion bei der Herzkatheteruntersuchung aus der Aortenwurzel 24 ml Vollblut entnommen und auf drei Vacutainer (Vacutainer CPT, Becton Dickinson) aufgeteilt. Die Vacutainer dienen der Separation von mononukleären Zellen aus Vollblut. Durch Zentrifugation (2800/min, 20 min, Raumtemperatur) bilden sich abhängig vom Dichtegradienten nach Ficoll drei Phasen: das Blutplasma, die mononukleären Zellen und davon durch ein Polyester-Gel getrennt die dichteren Blutbestandteile wie Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Das Blutplasma wurde abpipettiert und bis zur Weiterverarbeitung beim ELISA bei -80°C gelagert. Für die Durchflusszytometrie und die RT-PCR wurde die Phase der mononukleären Zellen abpipettiert.

3.3 Separation von CD4^+ Lymphozyten und CD14^+ Makrophagen

Um T-Helfer-Zellen und Makrophagen aus den mononukleären Zellen zu separieren, wurde die Tatsache, dass bestimmte Oberflächenmoleküle für diese Zellen charakteristisch sind, ausgenutzt. Ein spezifisches Oberflächenmolekül von T-Helfer-Zellen ist CD4 , von Makrophagen CD14 . Die Zellen wurden mit magnetisch markierten Antikörpern, sogenannten Microbeads (Miltenyi Biotec), die spezifisch das jeweilige Oberflächenmolekül binden, markiert (Monoklonale mouse anti-human CD4 [LeuTM-3a], Isotyp mouse IgG1, Klon SK3. Monoklonale mouse anti-human CD14 , Isotyp IgG2a).

Hierfür wurde die aus dem Vacutainer isolierte Phase mit den mononukleären Zellen in ein Falcon-Röhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen.

Nach dem Waschen wurde das Pellet mit 120 μ l Bindungs-Puffer (1000 μ l FCS [fötales Kälberserum, Gibco, unter Zusatz von Penicillin G und Streptomycin, Gibco], 0,148 g EDTA [Merck], 199 ml PBS [Dulbeccos]) resuspendiert. Dazu wurden 30 μ l der CD4-Bead-Suspension gegeben und 15 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Komplex mit 2 ml des Puffers resuspendiert und anschließend zentrifugiert (1200/min, 10 min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde entfernt und mit 500 μ l des Puffers resuspendiert.

Anschließend wurde die Zell-Antikörper-Suspension in eine Säule im Magnet-Separator (Miltenyi, Biotec) pipettiert. Gemäß dem Prinzip der positiven Selektion verbleiben dadurch die mit einem magnetisch markierten Antikörper beladenen CD4⁺ Zellen in der Säule. Nach drei abschließenden Waschgängen wurde die Säule aus dem Magnetseparator entnommen. Die CD4⁺ Zellen konnten nun aus der Säule eluiert werden. Aus der primär magnetisch nicht gebundenen Zellfraktion wurde in analoger Weise die CD14⁺ Zellfraktion ebenfalls magnetisch positiv selektioniert gewonnen.

3.4 mRNS-Extraktion aus den separierten CD4⁺ und CD14⁺ Zellen

Um die mRNS der isolierten CD4⁺ und CD14⁺ Zellen zu gewinnen, wurden die Zellen zunächst mit Hilfe eines Lyse-Bindungs-Puffers (Zusammensetzung: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM LiCl; 10 mM EDTA, pH 8,0; 1% LiDS; 5 mM Dithiothreitol)(Dynal) lysiert. Die mRNS ist charakterisiert durch einen Poly(A)-Schwanz an ihrem 3'-Ende, bestehend aus etwa 50 bis 200 Adenylresten. Zur Gewinnung der mRNS lässt sich diese Tatsache ausnutzen, indem man dem Zelllysate 50 μ l einer Suspension mit magnetbeladenen Oligo-(dT)₂₅-Beads (Dynal) zugibt. Bei einer Inkubation (Rotation, 3 min, Raumtemperatur) binden die Beads an den komplementären Poly(A)-Schwanz. Nach vier Waschgängen (Wash Buffer A und B, Dynal) lässt man

die Oligo-(dT)₂₅-Beads von der mRNA durch Zugabe von 30 µl 65°C warmem DEPC-H₂O lösen. Der magnetfreie Überstand wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

3.5 RT-PCR-Assay

3.5.1 cDNS-Synthese

Um die gewonnene mRNA mit Hilfe der PCR analysieren zu können, musste diese zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dies geschah mit einer reversen Transkriptase („SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase“ von Gibco) eines Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primers und eines dNTP-Gemisches, welches alle vier Basen (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in äquimolarer Verteilung enthielt. Die Komponenten für die cDNA-Synthese sind als „SuperScript-Kit“ bei der Firma Gibco erhältlich.

Zunächst wurde ein Reaktionsgemisch vorbereitet. Dazu wurden in folgender Reihenfolge zusammenpipettiert: 2 µl/Reaktion 10x PCR-Puffer (200mM Tris-HCl [pH 8,4], 500mM KCl), 2 µl/Reaktion 25 nM MgCl₂, 2 µl/Reaktion 0,1 M DTT und 10 µl/Reaktion 10 mM dNTP-Gemisch. Zuvor mussten alle Komponenten kurz zentrifugiert werden. Der Puffer und das MgCl₂ mussten vor jedem Gebrauch zusätzlich auf 72°C erhitzt werden, um das ausgefallene MgCl₂ und KCl wieder in Lösung zu bringen, und konnten danach auf Eis gestellt werden. Bis zum Gebrauch des Reaktionsgemisches wurde es bei 4°C auf Eis gelagert.

In einem zweiten Schritt wurde die mRNA denaturiert und an die Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer gebunden. Dazu wurden pro Reaktion 3,5 µl DEPC-Wasser, 7,5 µl mRNA und 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer gemischt und in einem Heizblock bei 70°C für 10 min inkubiert. Danach wurden aus dem Reaktionsgemisch (siehe oben) pro Reaktion 7 µl entnommen und zu der vorbereiteten mRNA pipettiert. Das Gemisch wurde danach 5 min bei 42°C vorinkubiert, bis man dann

jeweils 1 μ l der reversen Transkriptase (SuperSkript, RNase H⁻ RT) dazugab. Die cDNS-Synthese lief anschließend bei einer 50-minütigen Inkubation bei 42°C ab. Zum Beenden der Reaktion und zum Inaktivieren der verbliebenen reversen Transkriptase wurde das Gemisch für 15 min bei 70°C im Heizblock inkubiert.

Nach Abschluss der cDNS-Synthese wurde das noch im Gemisch befindliche RNS-Template degradiert, indem man pro Reaktion 1 μ l RNase H (E. coli) hinzugab und nochmals für 20 min bei 37°C inkubieren ließ.

Die synthetisierte cDNS wurde bei -20°C gelagert oder sofort in eine PCR-Reaktion eingesetzt.

3.5.2 PCR-Reaktion

Zu Beginn mussten für das jeweilige Gen spezifische Primer entworfen werden. Aus der bekannten cDNS-Sequenz eines Gens (Genbank) wurden unter Zuhilfenahme eines Computer-gestützten Analysealgorithmus (Mac Vector 5.0, Oxford Molecular Scientific) die jeweiligen Primer entworfen und bei der Firma Sigma Genosys bezogen. Die Spezifität der Primer wurde durch eine BLAST-Analyse bestätigt. Für jedes Primerpaar wurden die Reaktionsbestimmungen durch Gradientenuntersuchungen (optimale Annealing Temperatur) und Zyklusstudien (optimale Zykluszahl) optimiert. Im Folgenden sind die Primersequenzen und die Genbank Accession Nummern der entsprechenden cDNS-Sequenzen sowie die spezifischen Annealing Temperaturen und Zykluszahlen für die verwendeten Primer angegeben:

Die einzelnen Zyklen der PCR-Reaktion wurden mit Hilfe eines Cyclers (PE, Gene Amp PCR System 9700) durchgeführt. Dabei wurden die Proben initial für 9 min auf 94°C erhitzt, um die TAQ-Polymerase zu aktivieren. Der anschließende PCR-Zyklus setzt sich aus einer Denaturierungsphase (94°C für 30 sec), einer Annealing-Phase (Primer-spezifische Annealing Temperatur für 20 sec) und einer Extensionsphase (72°C für 60 sec) zusammen. Die PCR-Reaktion wurde jeweils durch eine abschließende Extensionsphase (72°C für 7 min) beendet.

Für die Elektrophorese wurde eine Gelkammer mit einem Fassungsvermögen für 20 Proben verwendet. Es wurde ein 2%iges Agarosegel, bestehend aus 58,5 ml H₂O, 6,5 ml 10xTAE-Buffer und 1,3 g Agarose, hergestellt. Auf das feste Gel wurden die Proben mit der cDNS aufgetragen, wobei bei jedem Gel eine Negativ-Probe (H₂O statt cDNS) und ein Standard mit verschiedenen Basenpaarlängen mitgeführt wurde. Das Gel lief bei einer Spannung von 50 V für 2 Stunden. Die Proben wanderten je nach Basenpaarlänge der cDNS unterschiedlich weit – durch ihre negative Ladung von der Kathode in Richtung Anode.

Die Gele wurden für 20 min mit SYBR Gold (Molecular Probes) gefärbt. SYBR Gold ist ein intercalierender Fluoreszenzfarbstoff, der die einzelnen Banden unter UV-Licht (BioRad, FluorS Multimager) sichtbar macht. Für die Komplexe aus Farbstoff und Nukleinsäuren liegen die Exzitationsmaxima bei 495 nm im sichtbaren und bei 300 nm im ultravioletten Bereich. Das Emissionsmaximum liegt bei 537 nm. SYBR Gold gewährleistet gegenüber dem üblicherweise verwendeten Ethidiumbromid eine wesentlich höhere Sensitivität.

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde das Programm „Quantity One“ der Firma BioRad verwendet. Um signifikante Unterschiede nachzuweisen, genügte eine semiquantitative Auswertung. Dabei erfolgte die Korrektur der Gentranskriptlevel der jeweiligen Genprodukte für die Ausgangsmenge an Gesamt-RNS in der jeweiligen Probe durch Normalisierung mit GAPDH als

konstitutiv exprimiertem "house keeping gene". Für jedes PCR-Produkt wurde der Mittelwert der jeweiligen Doppelbestimmungen verwendet. Als Ausschlusskriterium galt eine Abweichung beider Werte von >10%.

3.6 Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence activated cell sorting)

Zur weiteren Charakterisierung der Lymphozytenaktivierung wurde eine 3-Farben-Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Durchflusszytometrie ermöglicht anhand von Oberflächenmolekülen die Bestimmung einzelner Zellen und deren intrazelluläre Proteinexpression. Bei jeder Messung wurden als repräsentative Auswahl 10.000 Zellen analysiert.

Nach Isolation der mononukleären Zellfraktion über einen Ficoll Gradienten (siehe oben) wurden die Zellen in 1 ml RPMI/10% autologem Plasma (Gibco) resuspendiert. Die Lymphozyten wurden bei 37°C für 4 Stunden ex vivo im Brutschrank (5% CO₂) mit PMA (25 µg/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) in Anwesenheit von Brefeldin A (10 µg/ml) nachstimuliert. PMA dient dabei zusammen mit Ionomycin der unspezifischen Zellaktivierung. Brefeldin A blockiert intrazelluläre Transportprozesse und führt somit zur Akkumulation von Zytokinen und Proteinen im rauen endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat.

Für die Charakterisierung der Zellen wurde ein fluoreszierender Antikörper gegen CD3 – ein Oberflächenmarker von T-Lymphozyten – gerichtet. Der für T-Helfer-Zellen spezifische Oberflächenmarker CD4 konnte nicht verwendet werden, da sich dieser bekanntermaßen durch die Nachaktivierung der Zellen internalisiert und so nicht mehr messbar ist. Die intrazelluläre Färbung erfolgte mit fluoreszierenden Antikörpern gegen IFN- γ und IL-4 als Marker für eine Th1- oder Th2-Antwort.

Für die Färbung wurden je Probe drei Falcon-Röhrchen vorbereitet: das erste als Negativ-Kontrolle ohne jeglichen Antikörper, ein weiteres zur Oberflächenfärbung und einer Isotypkontrolle und das letzte zur Oberflächenfärbung mit gleichzeitiger intrazellulärer Zytokinfärbung.

Zunächst erfolgte die CD3-Oberflächenfärbung mit 10 μ l des CD3-Antikörpers PerCP-Cy5.5 (Becton Dickinson) auf je 100 μ l der stimulierten Zellsuspension für 15 min bei 4°C. Nach einem Lyse- und Permeabilisierungsschritt wurden die Zellen einmal gewaschen. Danach schloss sich eine intrazelluläre Zytokinfärbung mit FITC markierten IFN- γ -Antikörpern und PE markierten IL-4-Antikörpern (IFN- γ FITC/IL-4 PE von Becton Dickinson) an (30 min, 4°C). Zur Kontrolle der Antikörper-Bindungen wurde in einem zweiten Färberöhrchen eine intrazelluläre Isotypkontrolle (IgG FITC/IgG PE von Becton Dickinson) mitgeführt. Die Laser-Exzitation lag für alle drei Farbstoffe bei 488 nm. Der Emissions-Spektralmessbereich lag für den Farbstoff FITC bei 515-545 nm, für PE bei 564-606 nm und für PerCP bei >650.

Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer „FACScan“, die Auswertung mit dem Programm „CellQuest“, beide von Becton Dickinson. Zur Detektion ließen sich im Vorwärts- und im Seitwärtsstreulicht entsprechend der Größe zunächst die Lymphozyten erfassen. Die CD3⁺ Subfraktion wurde durch Markierung mit dem Fluorophor PerCP ausselektiert, ein Vorgang, den man „Gaten“ nennt. Im 2-dimensionalen Zytokindotplot wurden nur noch die CD3⁺ Zellen dargestellt. Jeder Punkt in dieser Darstellung entspricht also einer CD3⁺ Zelle.

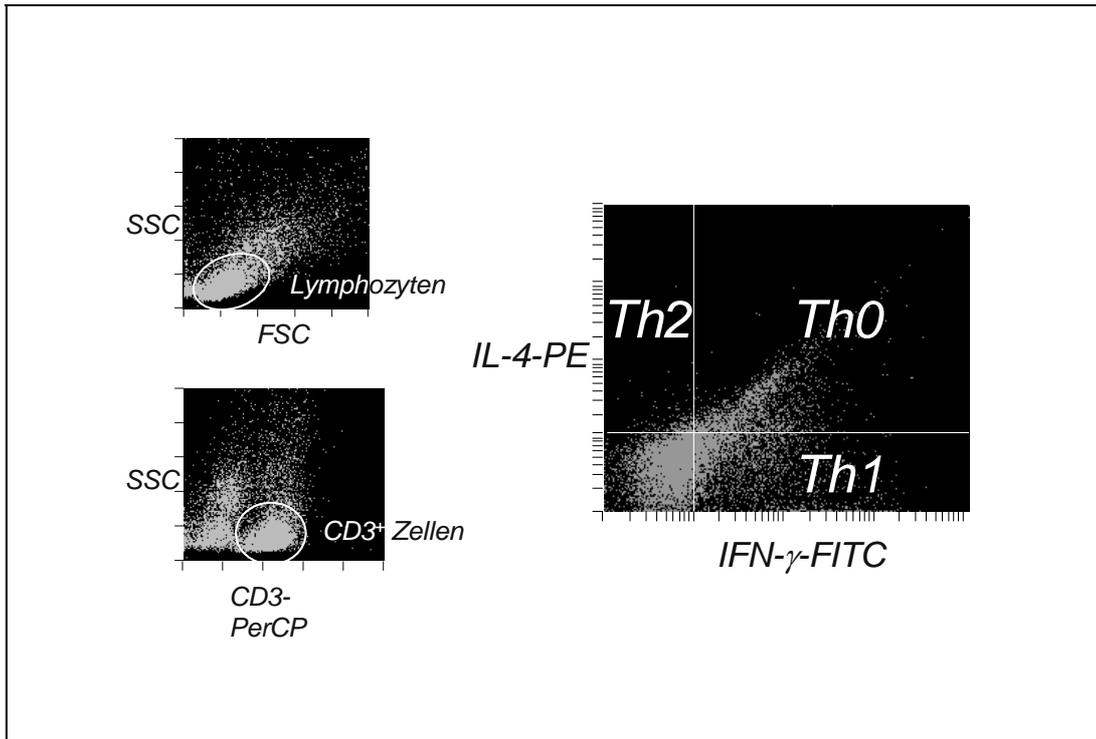


Abbildung 7

Darstellung und Auswertung der 3-Farben-Durchflusszytometrie:

Links oben: Darstellung nach Größe im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht; Erfassen der Lymphozyten

Links unten: Erfassen der CD3⁺ Zellen im CD3-Gate

Rechts: Erfassen des Anteils an IL-4⁺ und IFN- γ ⁺ Zellen unter den CD3⁺ Zellen im Zytokindotplot

Die Achsen stellen semiquantitativ die Intensität der Emission der Wellenlängen des Spektralmessbereiches der jeweiligen Zytokinfärbung dar, die x-Achse von IFN- γ , die y-Achse von IL-4. Nicht aktivierte Zellen zeigen sich demnach im linken unteren Quadranten, die durch IFN- γ -Expression charakterisierten Th1-Zellen im rechten unteren Quadranten und die durch IL-4-Expression charakterisierten Th2-Zellen im linken oberen Quadranten. Der rechte obere Quadrant stellt Zellen dar, die sowohl IFN- γ als auch IL-4 produzieren, entsprechend der Population der Th0-Zellen.

3.7 ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)

Aus jedem Patientenkollektiv wurden von neun Patienten mit Hilfe eines ELISA die Konzentrationen von MMP-9 und TIMP-1 im Blutplasma bestimmt. Dabei wird ein enzymbeladener Antikörper gegen das zu messende Protein gerichtet. Nach Zugabe des chromogenen Substrats wird die Extinktion des Reaktionsproduktes mit einem Spektrophotometer gemessen, welche der Menge des Proteins proportional ist. Die Werte können anhand einer Standardkurve ermittelt werden.

In eine 96-Well-Mikrotiter-Platte wurden eine Verdünnungsreihe mit dem Standard (50 µl = 20 ng) und die Patientenproben (50 µl, Verdünnung 1:8) pipettiert. Die Mikrotiterplatte war mit immobilisierten Antikörpern gegen MMP-9 beschichtet. Dazu wurden 50 µl eines Detektor-Antikörpers, ein biotinylierter anti-MMP-9-Antikörper, pipettiert und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschgängen wurde ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat dazugegeben, welches an den Detektor-Antikörper bindet. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Zusammen mit dem Substrat TMB (Tetra-Methylbenzidin) wurden die Proben für weitere 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Mit jeweils 100 µl 2,5N Schwefelsäure wurde die Reaktion unterbrochen. Die Extinktion der Proben wurde dann bei 450 nm und 540 nm in dem Spektrophotometer „Titerek Multiskan MCC/340“ gemessen. Nach Erstellen der Standardkurve konnten die MMP-9-Konzentrationen bestimmt werden. Der MMP-9-ELISA wurde mit Hilfe eines Kits der Firma Oncogene durchgeführt.

Analog dazu erfolgte der ELISA für TIMP-1. Dazu wurde ein Kit der Firma R&D Systems verwendet, welches eine 96-Well-Mikrotiter-Platte enthielt, die mit murinen monoklonalen Antikörpern gegen TIMP-1 beschichtet war. Der Detektor-Antikörper war mit Meerrettich-Peroxidase als Konjugat gebunden. Als Substrat wurde eine Lösung aus Hydrogen-Peroxidase und Tetra-

Methylbenzidin jeweils zu gleichen Anteilen verwendet. Die Reaktion wurde mit 2N Schwefelsäure beendet.

3.8 Bestimmung von CK und Troponin I

Die Bestimmung von CK (Creatinkinase) und Troponin I erfolgte routinemäßig im Institut der Klinischen Chemie im Klinikum Großhadern.

Zur Bestimmung der Aktivität von CK im Serum wird das Testprinzip der Firma Roche angewendet. Dabei wird CK durch NAC (N-Acetylcystein) aktiviert. In der Primärreaktion katalysiert die aktivierte CK die Dephosphorylierung von Creatinphosphat. In einer gekoppelten, durch Hexokinase katalysierten Reaktion wird Glucose durch das in der Primärreaktion gebildete ATP phosphoryliert und bildet Glucose-6-Phosphat. Danach katalysiert die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase die Oxidation von Glucose-6-Phosphat durch NADP^+ zu D-6-Phosphogluconat und NADPH. Die Bildungsgeschwindigkeit von NADPH ist direkt proportional zu der katalytischen CK-Aktivität. Sie wird durch Messung der Extinktionszunahme bei 340 nm bestimmt.

Zur Bestimmung der Troponin I-Konzentration im Serum wird ein Micro-particle Enzyme Immuno Assay (MEIA) der Firma Abbott angewendet. Dabei bindet zunächst Troponin I an einen antikörperbeladenen Mikropartikel und bildet einen Immunkomplex. An die verbliebenen ungebundenen Antikörper bindet das mit Alkalischer Phosphatase versehene Konjugat. Die Alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse des Substrats 4-Methylumbelliferyl-Phosphat zu 4-Methylumbelliferyl. Die Geschwindigkeit, mit der 4-Methylumbelliferyl regeneriert, ist dabei der Konzentration an Troponin I proportional.

3.9 Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse mit dem Programm "Stat View" von SAS Institute Cooperation wurden der Unpaired T-test und die ANOVA-Varianzanalyse und für den Post-hoc-Test das Bonferroni-Dunn-Verfahren verwendet. Der T-test ermöglicht den Vergleich zweier Gruppen miteinander. Mit der ANOVA-Varianzanalyse kann man erkennen, ob Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen bestehen, wobei der Post-hoc-Test erfasst, zwischen welchen einzelnen Gruppen die Unterschiede bestehen. Für den T-test und der ANOVA-Varianzanalyse wurden signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$ angenommen. Dementsprechend ergaben sich im Post-hoc-Test signifikante Unterschiede bei dem korrespondierenden Wert von $p < 0,0083$.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Patientenkollektive

Zunächst wurden allgemeine Daten zu den Patientenkollektiven erfasst und diese miteinander verglichen: Im Kontrollkollektiv befanden sich 11 Patienten mit einem Durchschnittsalter von $48,5 \pm 5,7$ Jahren. Es wurden 18 Patienten mit einer stabilen Angina pectoris mit einem Durchschnittsalter von $65,6 \pm 3,2$ Jahren untersucht, 13 Patienten mit instabiler Angina pectoris - entsprechend der Braunwald-Klassen II und III - mit einem Durchschnittsalter von $71,2 \pm 2,9$ Jahren und 14 Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt mit einem Durchschnittsalter von $62,0 \pm 3,4$ Jahren.

Außerdem wurden Laborparameter zwischen den Kollektiven verglichen, die Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen haben können. Bei der Bestimmung von Gesamtcholesterin (Normwert: 140-240 mg/dl) ergaben sich bei der Messung folgende Mittelwerte: im Kontrollkollektiv $197,0 \pm 15,7$ mg/dl, bei den Patienten mit stabiler Angina pectoris $179,1 \pm 11,9$ mg/dl, bei den Patienten mit instabiler Angina pectoris $171,2 \pm 9,3$ mg/dl und bei den Patienten mit akutem Myokardinfarkt $200,8 \pm 11,4$ mg/dl. Im ANOVA-Test wurde ein P-Wert von $p=0,25$ errechnet. Somit bestehen zwischen den einzelnen Gruppen hierbei keine signifikanten Unterschiede.

Beim Vergleich des aktuellen Blutzuckerspiegels (Normwert nüchtern: 70-115 mg/dl) wurden folgende Werte festgestellt: für das Kontrollkollektiv $112,8 \pm 6,1$ mg/dl, für Patienten mit stabiler Angina pectoris $114,1 \pm 7,7$ mg/dl, für Patienten mit instabiler Angina pectoris $115,7 \pm 9,2$ mg/dl und für Patienten mit akutem Myokardinfarkt $124,0 \pm 6,3$ mg/dl. Der ANOVA-Test ergab einen P-Wert von $p=0,77$. Es zeigten sich auch beim Vergleich des Blutzuckerspiegels keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Patientenkollektiven.

Schließlich wurden die Gruppen noch in der Anzahl der Leukozyten (Normwert: 4,0-11,0 G/l) und speziell der von uns genauer untersuchten $CD3^+$ Zel-

len verglichen. Im Kontrollkollektiv fand sich für die Gesamtzahl der Leukozyten ein Mittelwert von $6,8 \pm 0,3$ G/l, bei Patienten mit stabiler Angina pectoris $7,2 \pm 0,5$ G/l, bei Patienten mit instabiler Angina pectoris $7,5 \pm 0,8$ G/l und bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt $9,5 \pm 1,0$ G/l. Mit $p=0,11$ im ANOVA-Test ergaben sich keinerlei signifikanten Unterschiede.

Die Bestimmung der absoluten Zahl $CD3^+$ Zellen ergab im Kontrollkollektiv einen Mittelwert von $3,2 \pm 0,1$ G/l, bei den Patienten mit stabiler Angina pectoris $2,8 \pm 0,2$ G/l, bei Patienten mit instabiler Angina pectoris $2,8 \pm 0,3$ G/l und bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt $3,5 \pm 0,4$ G/l. Der ANOVA-Test ergab mit $p=0,30$ keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Bestimmung des CRP (Normwert: $<0,5$ mg/dl) ergab sich im Kontrollkollektiv ein Wert von $0,0 \pm 0,0$ mg/dl, im Kollektiv der stabilen Angina pectoris $0,13 \pm 0,43$ mg/dl, im Kollektiv der instabilen Angina pectoris $0,77 \pm 1,35$ mg/dl und im Kollektiv des akuten Myokardinfarkts $1,95 \pm 4,21$ mg/dl. Es zeigten sich mit $p=0,33$ im ANOVA-Test keine signifikanten Unterschiede.

Die Messung des arteriellen Mitteldrucks ergab im Kontrollkollektiv einen Mittelwert von $93,3 \pm 16,3$ mmHg, bei den Patienten mit stabiler Angina pectoris $92,7 \pm 16,5$ mmHg, bei den Patienten mit instabiler Angina pectoris $94,9 \pm 10,6$ mmHg und bei den Patienten mit akutem Myokardinfarkt $98,4 \pm 18,0$ mmHg. Auch hier ergaben sich mit $p=0,83$ im ANOVA-Test keine signifikanten Unterschiede.

	Kontrolle (n=11)	Stabile AP (n=18)	Instabile AP (n=13)	Akuter Infarkt (n=14)	ANOVA
Alter (Jahre)	48,5±5,7	65,6±3,2	71,2±2,9	62,0±3,4	
Cholesterin ges. (mg/dl)	197,0±15,7	179,1±11,9	171,2±9,3	200,8±11,4	P=0,25
Glucose (mg/dl)	112,8±6,1	114,1±7,7	115,7±9,2	124,0±6,3	P=0,77
Leukozyten (G/l)	6,8±0,3	7,2±0,5	7,5±0,8	9,5±1,0	P=0,11
CD3⁺ Zellen (G/l)	3,2±0,1	2,8±0,2	2,8±0,3	3,5±0,4	P=0,30
CRP (mg/dl)	0,0±0,0	0,13±0,43	0,77±1,35	1,95±4,21	P=0,33
Mittlerer Blutdruck (mmHg)	93,3±16,3	92,7±16,5	94,9±10,6	98,4±18,0	P=0,83

Tabelle 2
Charakterisierung der Patientenkollektive

4.2 Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR

4.2.1 mRNS-Transkriptionslevel von Th1-Zellmarkern

Mit Hilfe der semiquantitativen Analysen der RT-PCR-Assays wurden in einem ersten Schritt orientierend die Aktivierungsmuster der T-Helfer-Zellen auf mRNS-Ebene erfasst. Zwischen den Patientenkollektiven zeigten sich signifikante Unterschiede für alle charakteristischen Zytokine der Th1-Antwort. Für IFN- γ ergab sich im Kontrollkollektiv ein korrigierter Mittelwert von $0,65 \pm 0,07$ [relative Einheit]. In der Gruppe mit stabiler Angina pectoris fand sich ein Wert von $0,58 \pm 0,06$ [relative Einheit], in der Gruppe mit instabiler Angina pectoris $1,14 \pm 0,18$ [relative Einheit] und in der Gruppe mit akutem Myokardinfarkt $0,43 \pm 0,08$ [relative Einheit]. Daraus errechnete sich im ANOVA-Test ein Wert von $p=0,0003$ und deutet somit auf signifikante Unterschiede hin. Es zeigte sich eine Erhöhung der korrigierten IFN- γ -Werte bei Patienten mit instabiler Angina pectoris gegenüber allen anderen Gruppen ($p < 0,005$ versus Kontrolle, $p < 0,0005$ versus stabiler Angina pectoris, $p < 0,0001$ versus akuter Myokardinfarkt). Die Unterschiede zwischen den anderen Gruppen waren nicht signifikant.

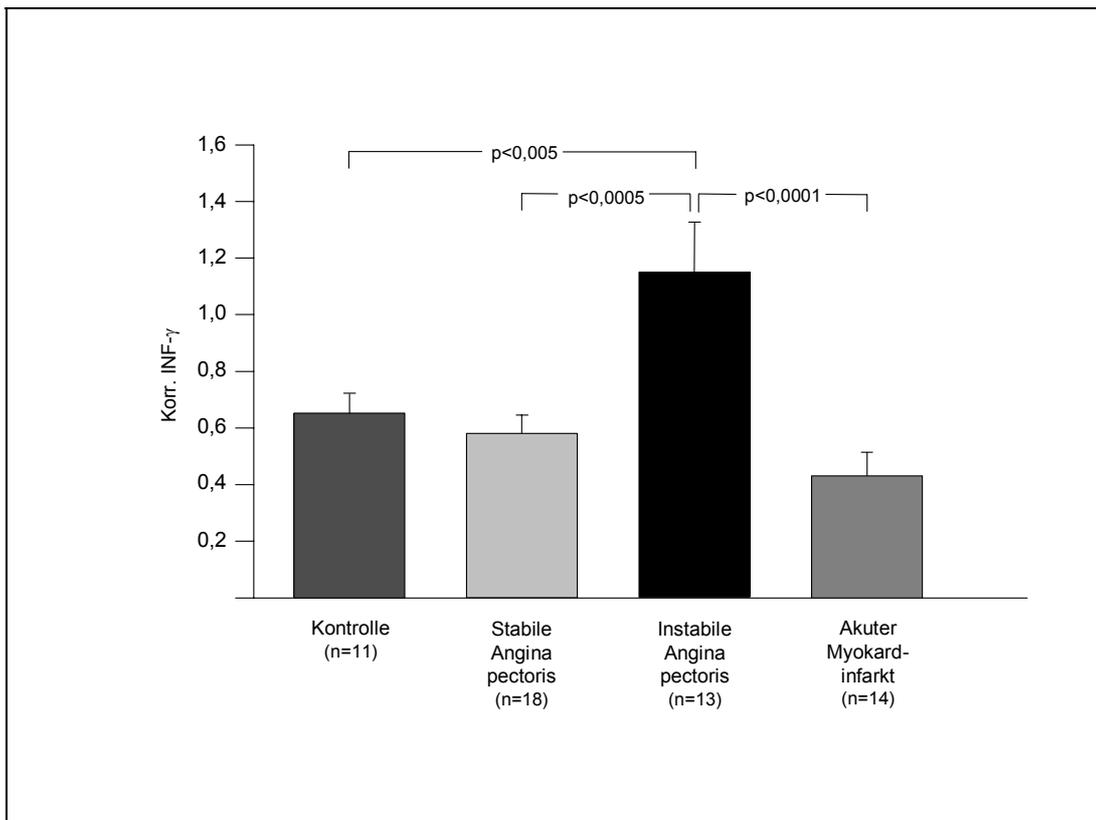


Abbildung 8
Vergleich der mRNS-Transkriptionslevel von IFN- γ

Für IL-2, einem weiteren charakteristischen Zytokin des Th1-Zytokinmusters, konnten ähnliche Ergebnisse nachgewiesen werden. Die errechneten Mittelwerte für IL-2 ergaben im Kontrollkollektiv $0,21 \pm 0,03$ [relative Einheit], bei Patienten mit stabiler Angina pectoris $0,54 \pm 0,12$ [relative Einheit], bei Patienten mit instabiler Angina pectoris $0,89 \pm 0,27$ [relative Einheit] und bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt $0,30 \pm 0,09$ [relative Einheit]. Der ANOVA-Test deutet mit $p < 0,05$ auf signifikante Unterschiede hin. Wie auch für IFN- γ fanden sich bei dem Kollektiv mit instabiler Angina pectoris gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte Werte ($p < 0,005$ versus Kontrolle). Die eingetretenen Unterschiede zwischen dem Kollektiv mit instabiler Angina pectoris und dem Kollektiv mit stabiler Angina pectoris und dem Kollektiv mit akutem Myokardinfarkt zeigten bei gegebener n-Zahl keine Signifikanzen.

Die Bedeutung von T-Helfer-Zellen bei der Progression
der koronaren Herzkrankheit

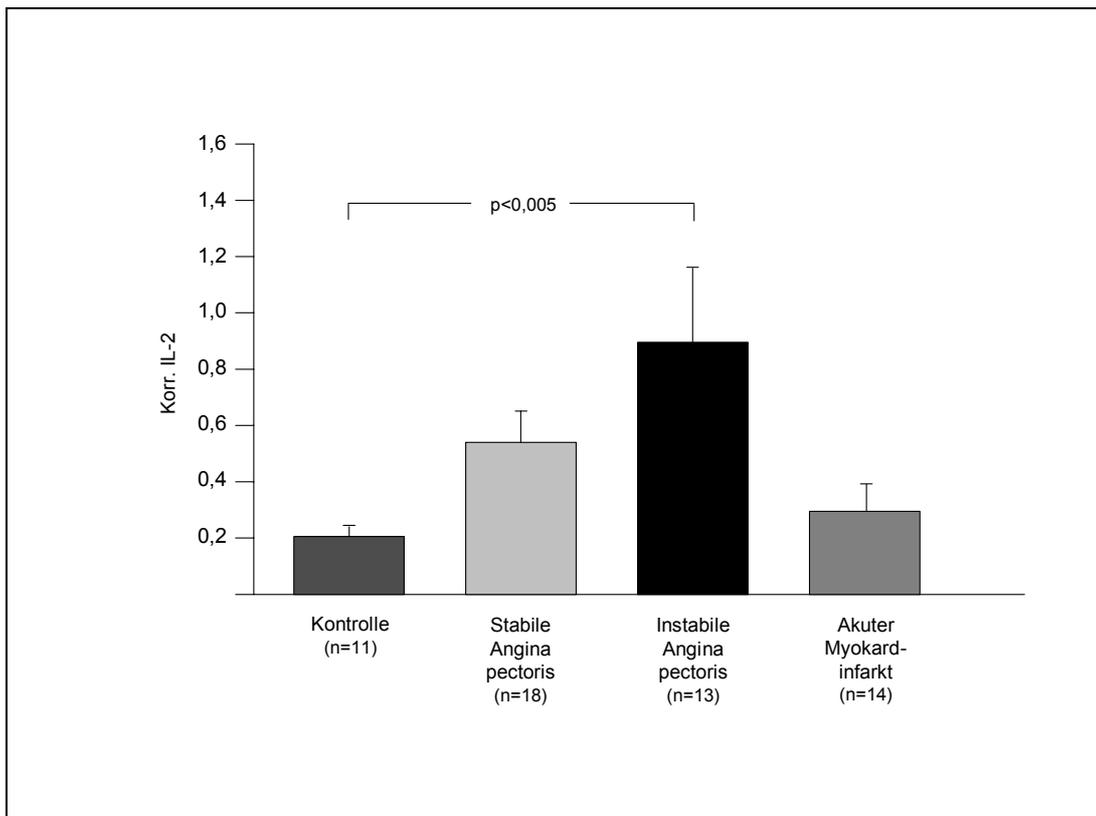


Abbildung 9
Vergleich der mRNA-Transkriptionslevel von IL-2

Zusätzlich wurden die korrigierten Werte für STAT4, dem entscheidenden Transkriptionsfaktor einer Th1-Antwort, ermittelt. Dabei entstanden folgende Ergebnisse: für das Kontrollkollektiv ein Wert von $0,64 \pm 0,04$ [relative Einheit], für Patienten mit stabiler Angina pectoris $0,67 \pm 0,04$ [relative Einheit], für Patienten mit instabiler Angina pectoris $1,03 \pm 0,05$ [relative Einheit] und für Patienten mit akutem Myokardinfarkt $0,57 \pm 0,06$ [relative Einheit]. Auch hier zeigten sich Signifikanzen im ANOVA-Test ($p < 0,0001$). So wurden auch bei STAT4 in der Patientengruppe mit instabiler Angina pectoris im Vergleich mit den anderen Gruppen deutlich erhöhte Werte ermittelt ($p < 0,0001$ versus Kontrolle, $p < 0,0001$ versus stabiler Angina pectoris, $p < 0,0001$ versus akutem Myokardinfarkt). Auch für STAT4 fallen beim Vergleich der anderen Gruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf.

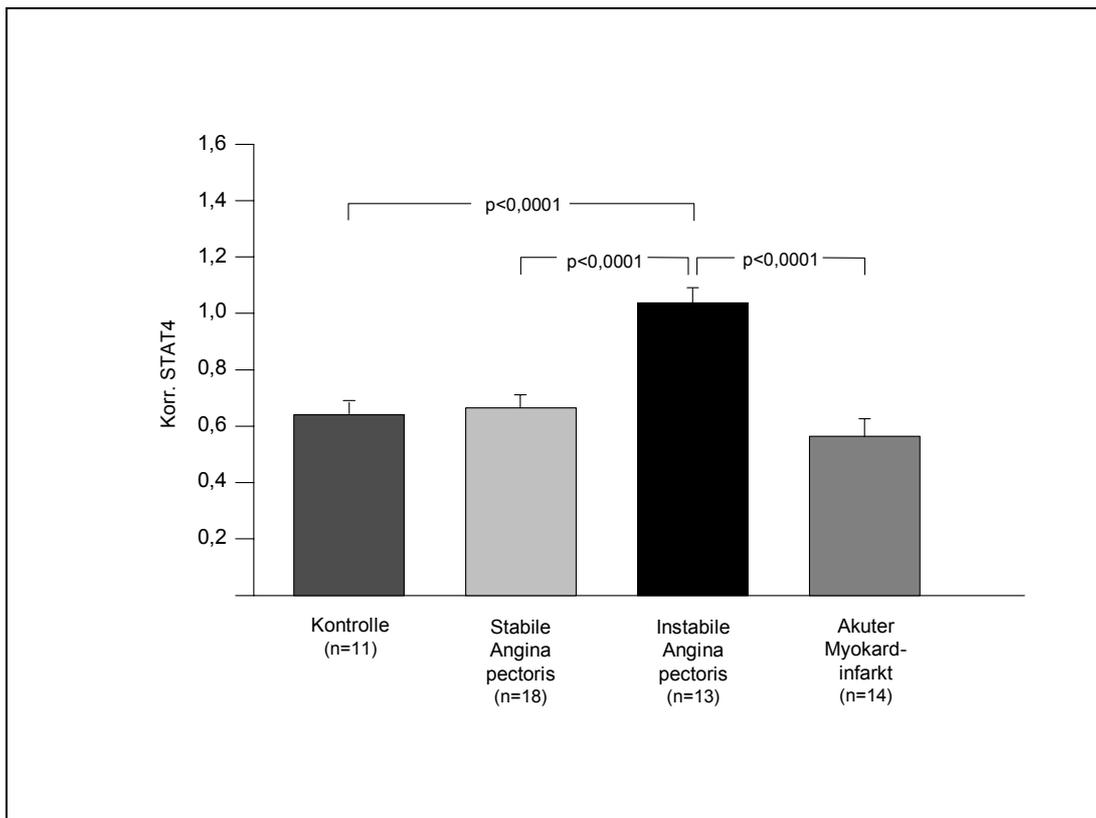


Abbildung10
Vergleich der mRNA-Transkriptionslevel von STAT4

Die signifikante Erhöhung der Transkriptionslevel von $\text{IFN-}\gamma$, IL-2 und deren Transkriptionsfaktor STAT4 bei Patienten mit instabiler Angina pectoris unterstützen die Hypothese, dass eine Th1-Antwort an der Progression der koronaren Herzerkrankung beteiligt ist.

4.2.2 mRNA-Transkriptionslevel von Th2-Zellmarkern

Bei charakteristischen Markern einer Th2-Antwort zeigten sich in den RT-PCR-Assays keinerlei signifikanten Unterschiede. Zunächst wurden die korrigierten Werte für das typische Th2-Zytokin IL-4 ermittelt. Für das Kontrollkollektiv errechnete sich ein Mittelwert von $0,72 \pm 0,08$ [relative Einheit], für die Patienten mit stabiler Angina pectoris $0,74 \pm 0,06$ [relative Einheit], für die Pa-

tienten mit instabiler Angina pectoris $0,77 \pm 0,11$ [relative Einheit] und für die Patienten mit akutem Myokardinfarkt $0,65 \pm 0,10$ [relative Einheit]. Mit $p=0,801$ im ANOVA-Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven.

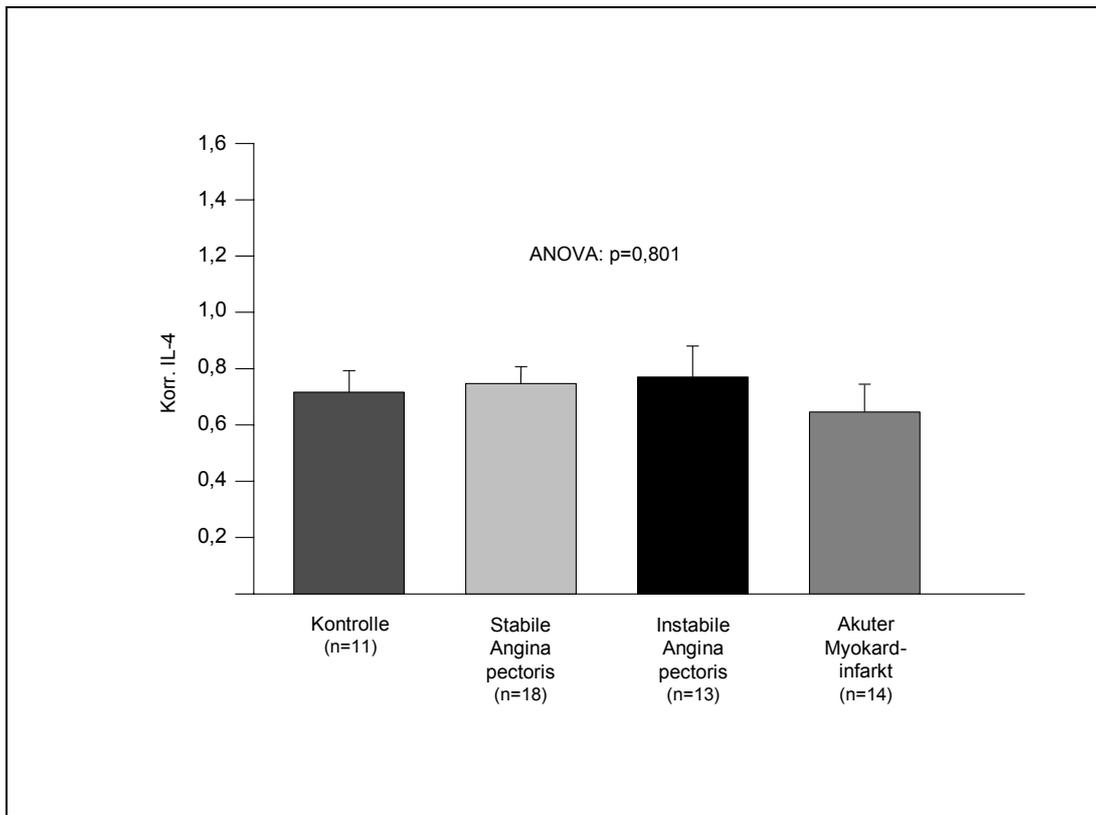


Abbildung 11
Vergleich der mRNA-Transkriptionslevel von IL-4

Für das Zytokin IL-10, einem weiteren typischen Th2-Zellmarker, wurde im Kontrollkollektiv ein Wert von $0,26 \pm 0,08$ [relative Einheit] ermittelt, bei Patienten mit stabiler Angina pectoris $0,43 \pm 0,09$ [relative Einheit], bei Patienten mit instabiler Angina pectoris $0,41 \pm 0,12$ [relative Einheit] und bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt $0,64 \pm 0,20$ [relative Einheit]. Der ANOVA-Test ergab

einen P-Wert von $p=0,258$. Es liegen also auch für IL-10 keine signifikanten Unterschiede vor.

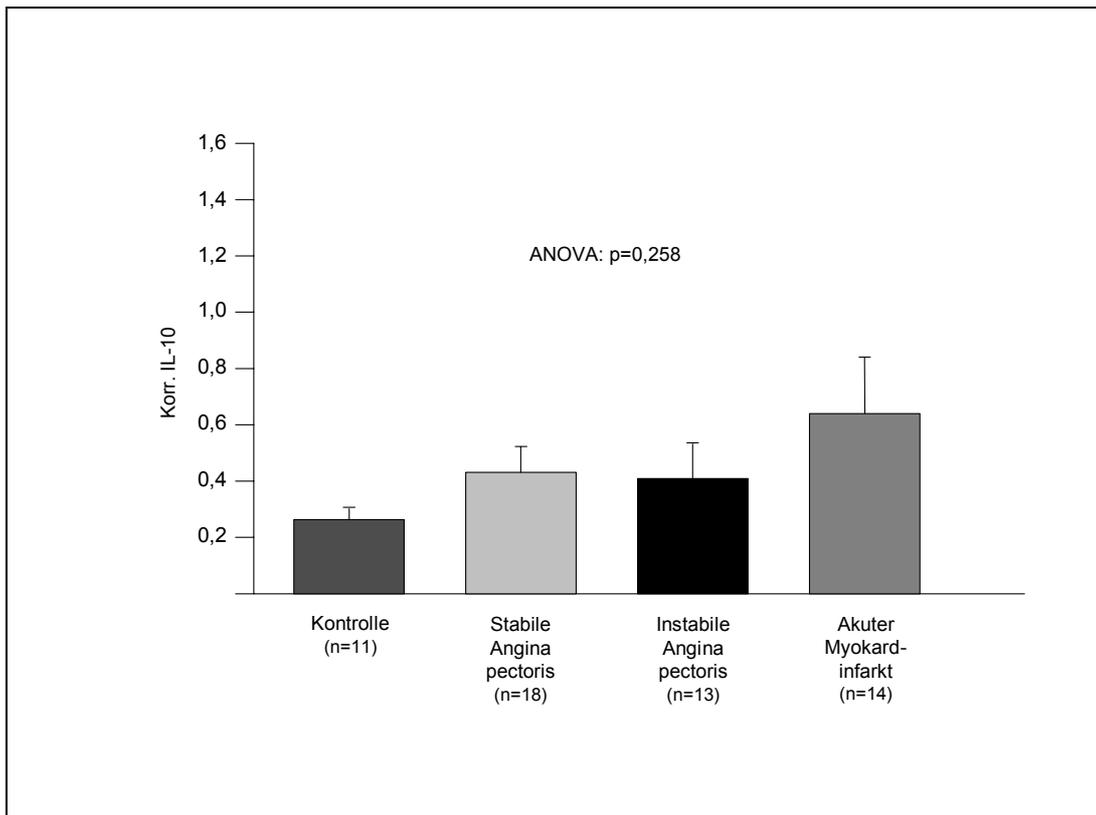


Abbildung 12
Vergleich der mRNA-Transkriptionslevel von IL-10

Analog der Th1-Antwort wurde auch für die Th2-Antwort der typische Transkriptionsfaktor STAT6 als Regulator der Zytokinexpression untersucht. Für die Kontrollgruppe ergab sich ein Mittelwert von $0,23 \pm 0,02$ [relative Einheit], für Patienten mit stabiler Angina pectoris $0,22 \pm 0,02$ [relative Einheit], für Patienten mit instabiler Angina pectoris $0,23 \pm 0,03$ [relative Einheit] und für Patienten mit akutem Myokardinfarkt $0,21 \pm 0,03$ [relative Einheit]. Es konnten mit $p=0,893$ im ANOVA-Test keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

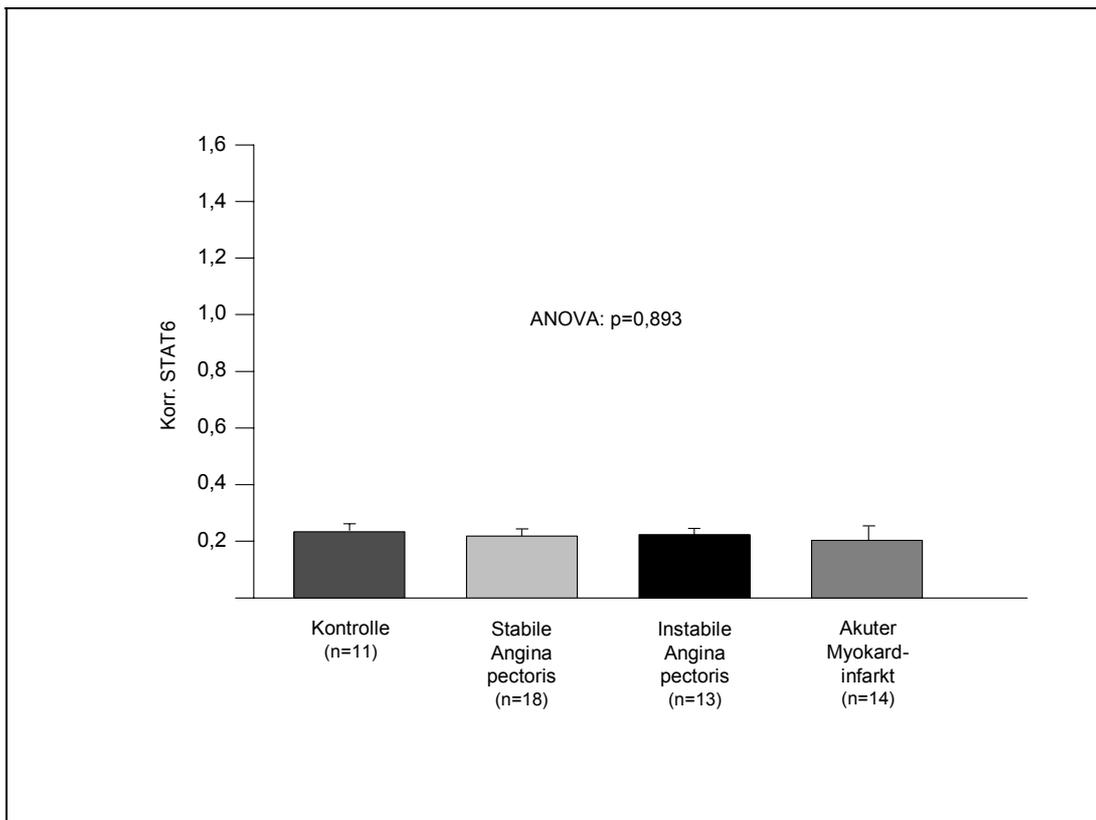


Abbildung 13
Vergleich der mRNA-Transkriptionslevel von STAT6

Für die typischen Zytokine einer Th2-Antwort, nämlich IL-4 und IL-10 sowie für deren Transkriptionsfaktor STAT6 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Diese Ergebnisse legen orientierend nahe, dass es zur Aktivierung einer Th1- und nicht einer Th2-Antwort kommt.

4.3 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

4.3.1 Aktivierung von Th1-Zellen (IFN- γ^+ /CD3 $^+$ Zellen)

Zur Bestätigung und weiteren Charakterisierung unserer Ergebnisse wurde die Zytokin-Expression von T-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf Protein-Ebene untersucht. Die Auswertung der gewonnenen Daten erbrachte folgende Ergebnisse: Der Anteil von IFN- γ^+ /CD3 $^+$ Zellen unter den CD3 $^+$ Zel-

len zeigte zwischen den Patientenkollektiven deutliche Unterschiede (ANOVA-Test: $p < 0,0001$). In der Kontrollgruppe waren $7,6 \pm 3,5\%$ aller $CD3^+$ Zellen $IFN-\gamma$ -positiv. Diese Subpopulation war im Vergleich dazu bei Patienten mit stabiler Angina pectoris mit $14,5 \pm 4,5\%$ signifikant erhöht ($p < 0,008$ versus Kontrolle). Die Patienten mit einer instabilen Angina pectoris zeigten einen weiteren Anstieg und erreichten das höchste Niveau der Expansion von $IFN-\gamma$ -produzierenden Zellen. Der Anteil dieser Zellen lag bei $34,8 \pm 5,6\%$ ($p < 0,0001$ versus stabile Angina pectoris). Bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt ist diese Expansion $IFN-\gamma$ produzierender T-Zellen nicht zu erkennen. Dieses Patientenkollektiv zeigte mit $6,6 \pm 2,3\%$ aller $CD3^+$ Zellen einen deutlich niedrigeren Anteil an $IFN-\gamma$ -produzierenden Zellen ($p < 0,0001$ versus instabiler Angina pectoris) und somit einen dem Basalwert der Kontrollgruppe ähnlichen Wert.

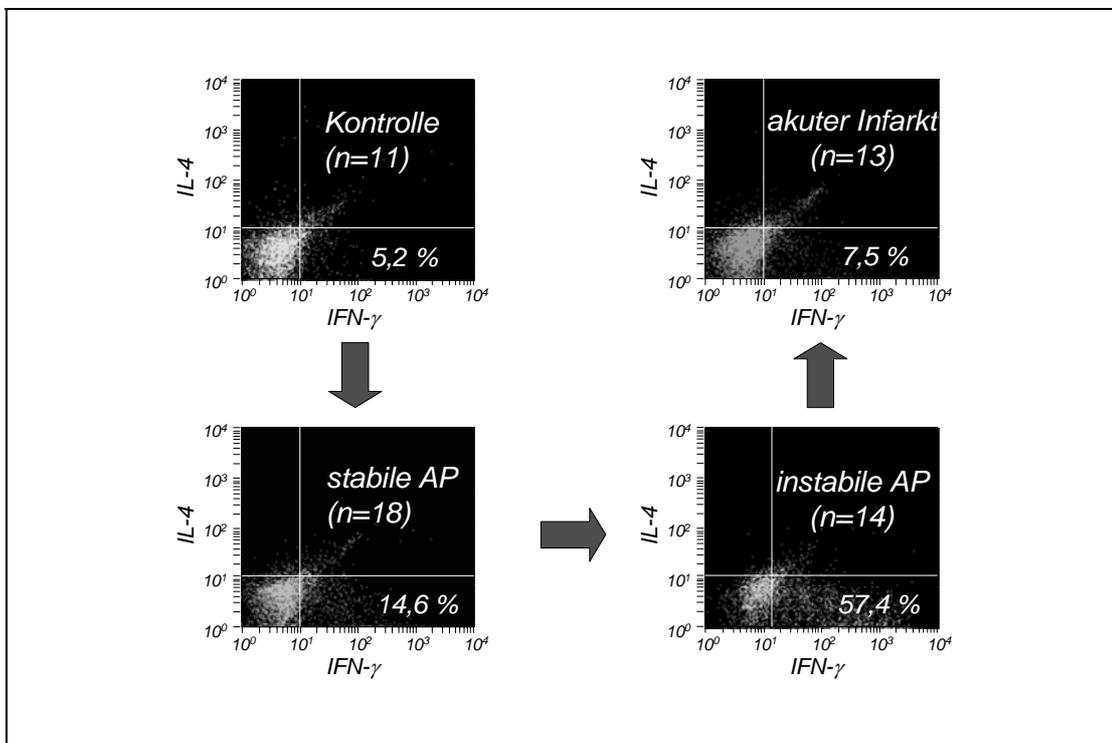


Abbildung 14
Beispiele der FACS-Analyse aus den einzelnen Kollektiven

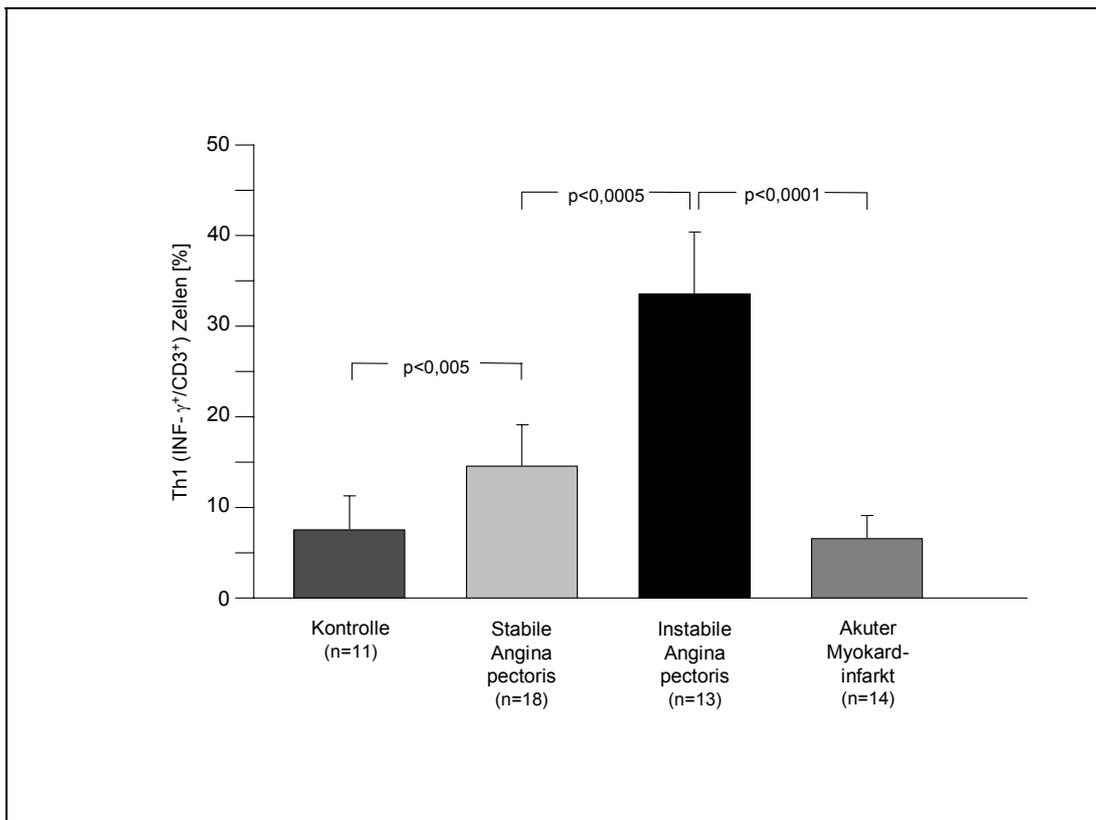


Abbildung 15
Vergleich der Aktivierung von Th1-Zellen
(IFN- γ^+ /CD3 $^+$ Zellen)

4.3.2 Aktivierung von Th2-Zellen (IL-4 $^+$ /CD3 $^+$ Zellen) und Th0-Zellen (IL-4 $^+$ /IFN- γ^+ /CD3 $^+$ Zellen)

Im Gegensatz zu den Th1-Zellen zeigten die Th2-Zellen zwischen den verschiedenen Patientenkollektiven keine signifikanten Unterschiede (ANOVA-Test: $p=0,28$). Der Anteil der IL-4 $^+$ /CD3 $^+$ Zellen, die charakteristisch für eine Th2-Antwort sind, ergab unter den gesamten CD3 $^+$ Zellen folgende Werte: Die Kontrollgruppe zeigte bei $0,9\pm 0,3\%$ der Zellen eine IL-4-Produktion. Bei Patienten mit stabiler Angina pectoris lagen die Werte bei $1,7\pm 0,4\%$. Der Anteil dieser Zellen lag in der Gruppe mit instabiler Angina pectoris bei $0,7\pm 0,3\%$ und schließlich waren bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt $1,2\pm 0,4\%$ der Zellen IL-4-positiv.

Die Bedeutung von T-Helfer-Zellen bei der Progression
der koronaren Herzkrankheit

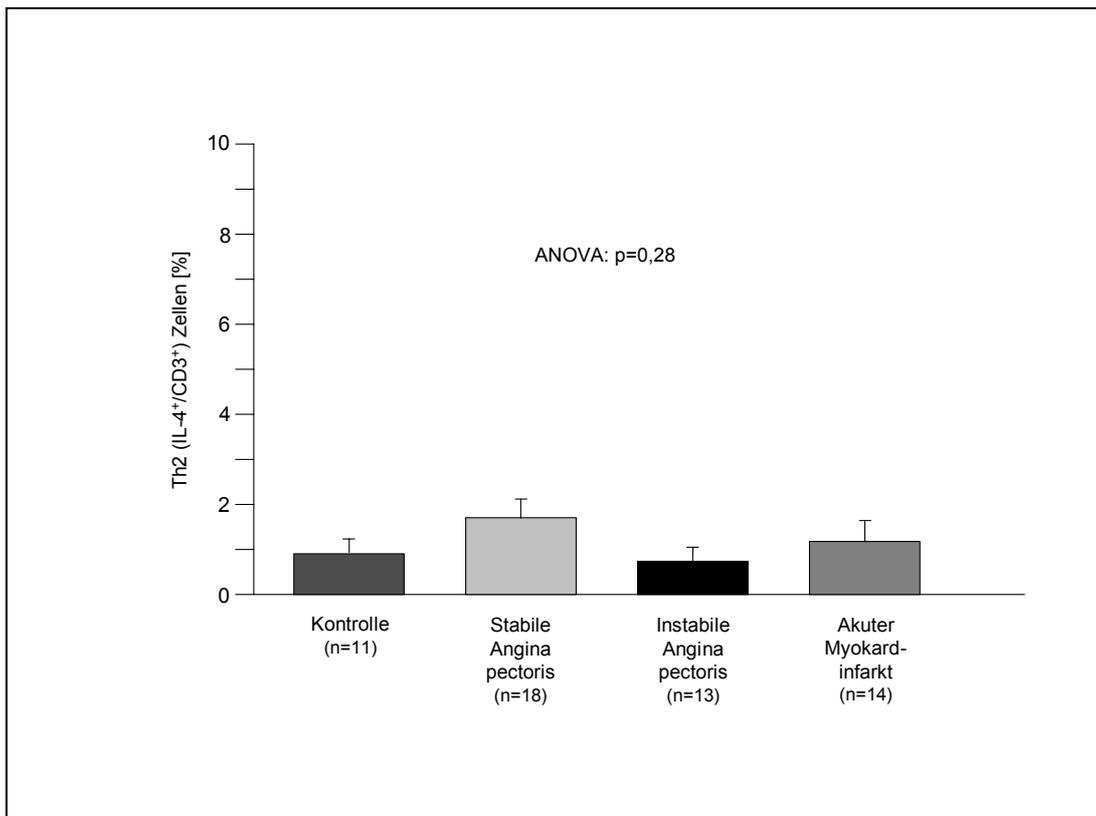


Abbildung 16
Vergleich der Aktivierung von Th2-Zellen
(IL-4⁺/CD3⁺ Zellen)

Ähnliche Ergebnisse lieferte die Messung der Th0-Zellen, die durch die Produktion sowohl von IFN- γ als auch von IL-4 gekennzeichnet sind. Die Kontrollgruppe erbrachte Werte für IFN- γ ⁺/IL-4⁺/CD3⁺ Zellen von 0,9 \pm 0,2%, die Patienten mit stabiler Angina pectoris 1,2 \pm 0,3%, das Kollektiv mit instabiler Angina pectoris 1,1 \pm 0,3% und mit akutem Myokardinfarkt gehörten 1,6 \pm 0,6% aller Zellen dieser Subpopulation an. Auch hier zeigten sich keinerlei signifikanten Verschiebungen (ANOVA-Test: p=0,59) in Abhängigkeit vom klinischen Stadium der koronaren Herzerkrankung.

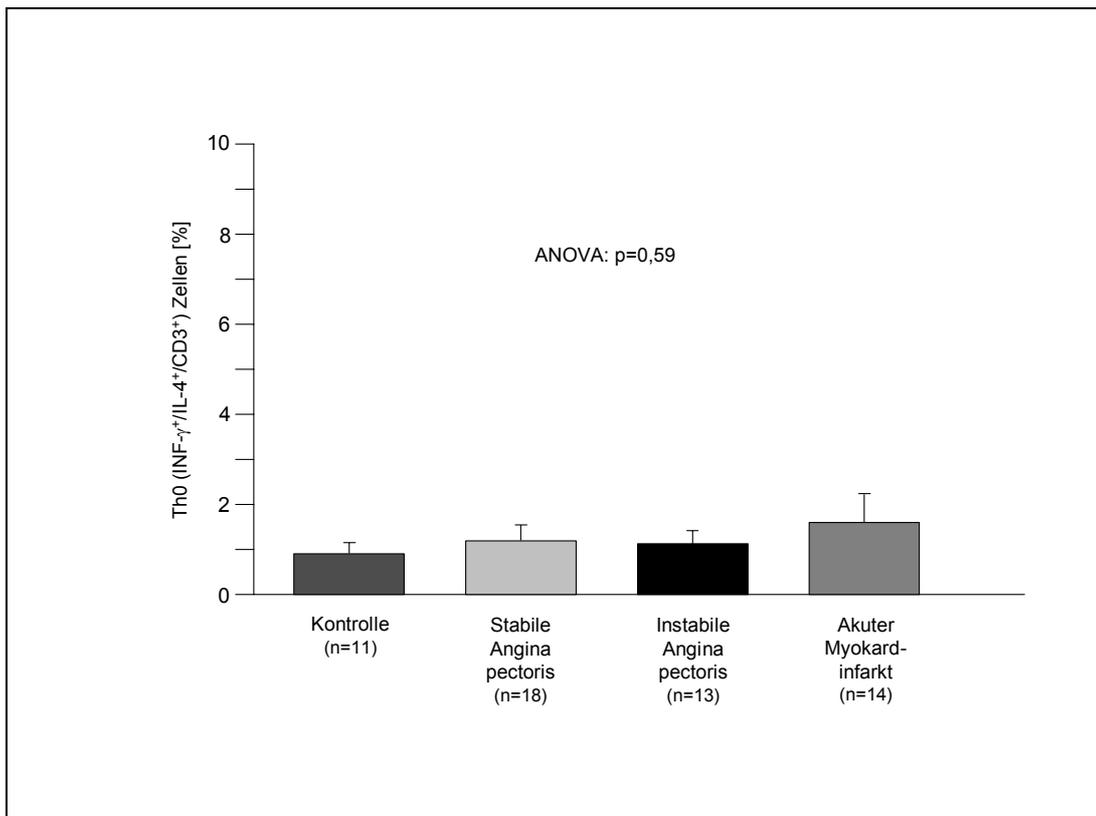


Abbildung 17
Vergleich der Aktivierung von Th0-Zellen
(IFN- γ^+ /IL-4 $^+$ /CD3 $^+$ Zellen)

4.3.3 Vergleich der Th1-Aktivierung mit Serummarkern der Myokardschädigung

Die unter 4.3.1 beschriebene Th1-Aktivierung wurde nun mit den Werten für das Troponin I (Normwert: <0,1 ng/ml) und für die Creatinkinase (Normwerte: m:<180 U/l, w:<155 U/l) als Marker für die Myokardschädigung verglichen.

Im Kontrollkollektiv stellte man für alle drei Marker Mittelwerte auf niedrigem Niveau fest. Die Creatinkinase lag mit $30,5 \pm 4,9$ U/l ebenso wie das Troponin I mit $0,0 \pm 0,0$ ng/ml im Normbereich. Die Th1-Aktivierung, ausgedrückt durch den Anteil der IFN- γ^+ Zellen unter den T-Zellen, lag mit $7,6 \pm 1,4\%$ ebenfalls auf niedrigem Niveau.

Bei den Patienten mit einer stabilen Angina pectoris waren die Mittelwerte für die Creatinkinase mit $33,0 \pm 4,8$ U/l und für das Troponin I mit $0,0 \pm 0,0$ ng/ml ebenfalls im Normbereich. Für Th1-Zellen lassen sich bereits im Vergleich mit der Kontrollgruppe erhöhte Werte zeigen. Der Anteil lag bei $14,5 \pm 1,5\%$ ($p < 0,008$ versus Kontrolle).

Auch im Kollektiv der Patienten mit instabiler Angina pectoris blieben die Werte für die Creatinkinase mit $31,1 \pm 4,1$ U/l im Normbereich. Für das Troponin I fand man mit $36,9 \pm 6,5$ ng/ml signifikant erhöhte Werte ($p < 0,001$ versus stabiler Angina pectoris). Die Th1-Expansion erreicht in diesem Patientenkollektiv mit einem Anteil von $34,8 \pm 2,6\%$ ihr Maximum ($p < 0,0001$ versus stabiler Angina pectoris).

Bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt erreichen die Mittelwerte für die Creatinkinase mit $296,2 \pm 70,6$ U/l ($p < 0,0001$ versus instabiler Angina pectoris) und für das Troponin I mit $86,8 \pm 14,8$ ng/ml ($p < 0,001$ versus instabiler Angina pectoris) ihr höchstes Niveau. Die Th1-Expansion hingegen liegt mit einem Anteil von $6,6 \pm 1,3\%$ im Vergleich mit der Gruppe der instabilen Angina pectoris deutlich niedriger ($p < 0,0001$ versus instabiler Angina pectoris).

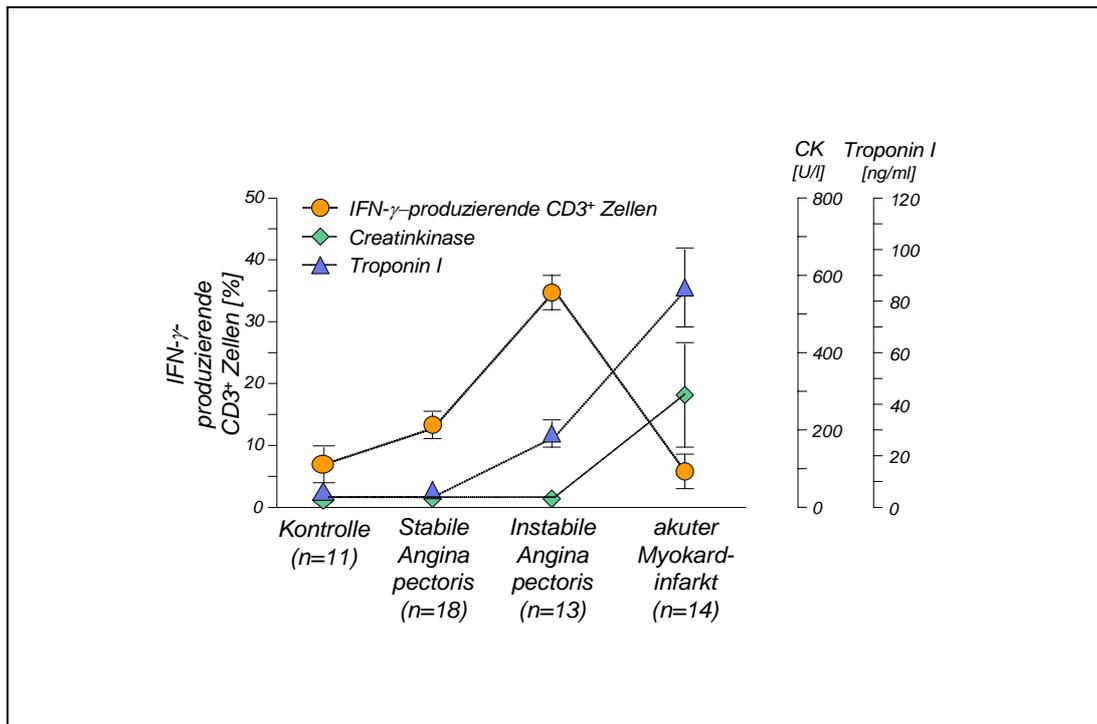


Abbildung 18
Vergleich der Th1-Aktivierung mit Serummarkern der Myokardschädigung

Der Vergleich der Th1-Aktivierung mit Markern der Myokardschädigung legt nahe, dass die Th1-Aktivierung der Myokardschädigung vorausgeht.

4.4 Serum-Konzentrationen von MMP-9 und TIMP-1 im Vergleich

Abschließend wurden noch die Serum-Konzentrationen von MMP-9 und dessen Inhibitor TIMP-1 gemessen. Die Messungen ergaben im ELISA folgende Ergebnisse: Im Vergleich zur stabilen Angina pectoris zeigten Patienten mit instabiler Angina pectoris eine signifikant höhere Freisetzung von MMP-9 ($2,05 \pm 0,94$ ng/ml versus $3,32 \pm 1,48$ ng/ml; $p < 0,05$) bei unveränderten TIMP-1 Konzentrationen ($1,34 \pm 0,38$ ng/ml versus $1,26 \pm 0,42$ ng/ml; nicht signifikant). Im Vergleich zu dieser instabilen Angina pectoris Gruppe war bei Patienten

mit akutem Myokardinfarkt bei unvermindert erhöhten MMP-9 Konzentrationen ($3,23 \pm 1,09$ ng/ml; nicht signifikant) eine signifikant reduzierte Freisetzung von TIMP-1 zu beobachten ($0,67 \pm 0,23$ ng/ml; $p < 0,005$). Für das Kontrollkollektiv ergab sich für MMP-9 ein Wert von $2,87 \pm 0,81$ ng/ml und für TIMP-1 $0,81 \pm 0,38$ ng/ml.

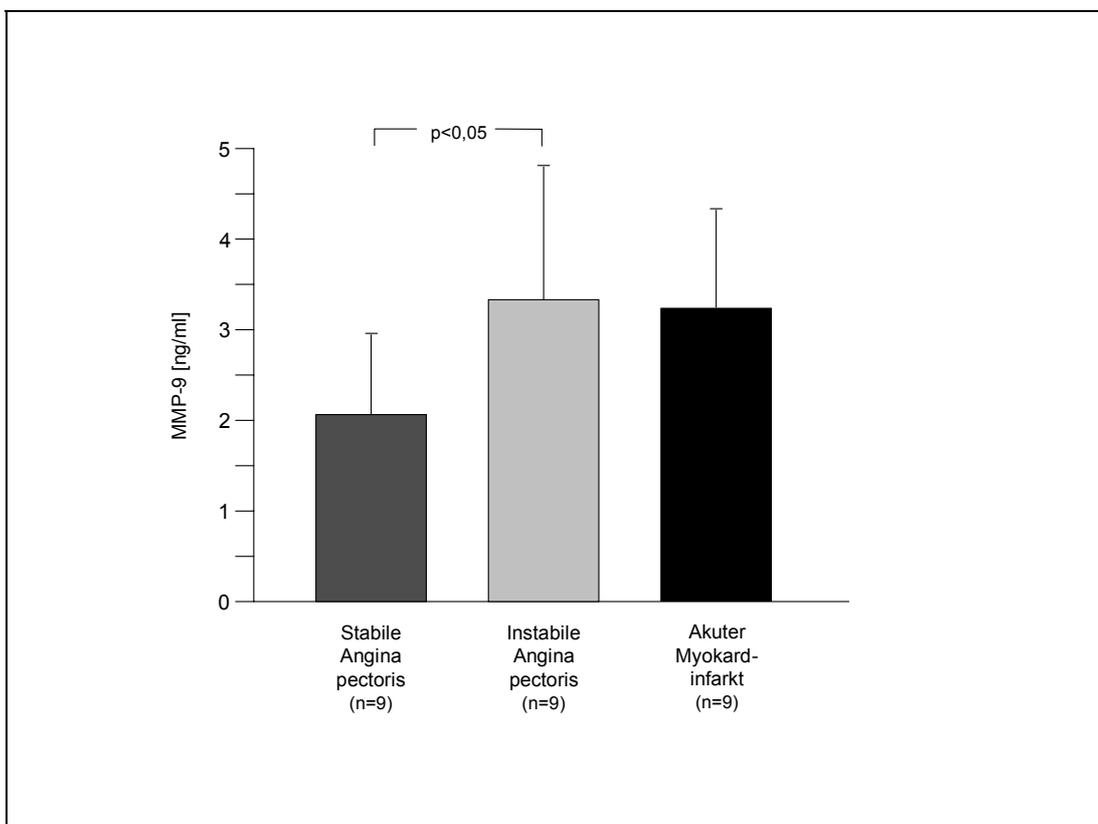


Abbildung 19
Vergleich der Serum-Konzentrationen von MMP-9

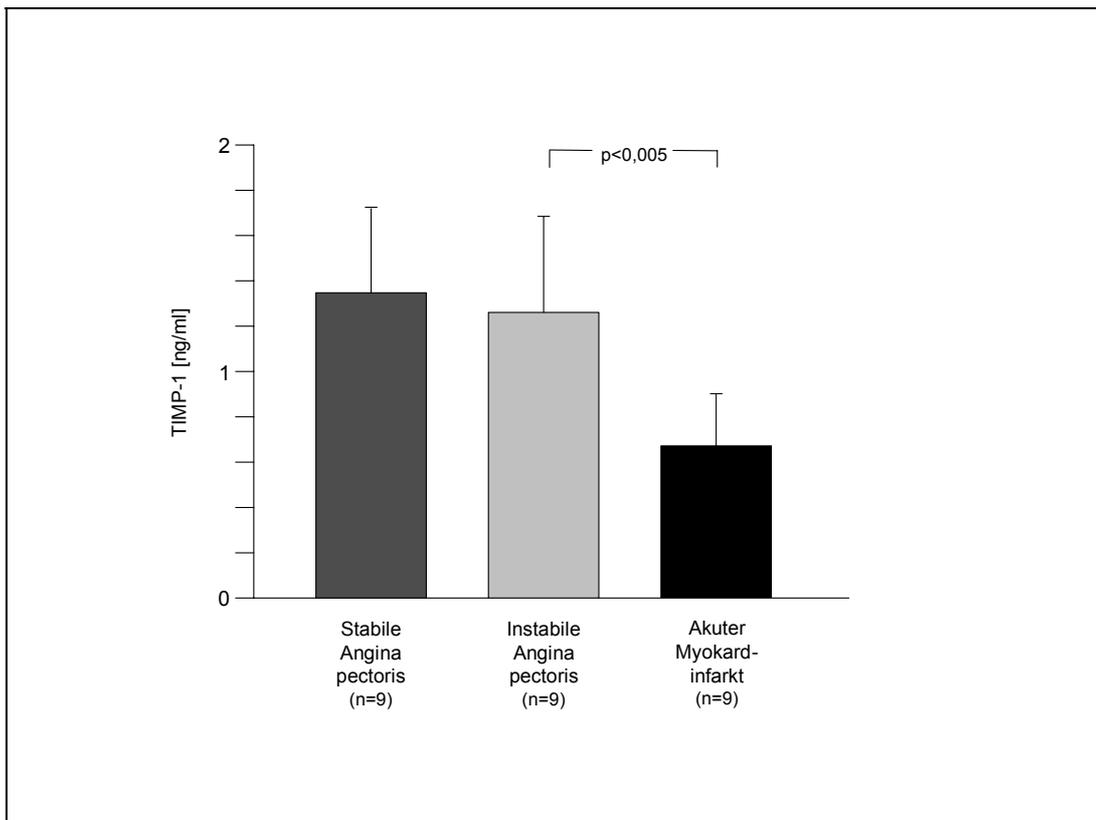


Abbildung 20
Vergleich der Serum-Konzentrationen von TIMP-1

Da die Sekretion von MMP-9 und TIMP-1 als dessen Inhibitor in engem Zusammenhang miteinander stehen, wurde aus beiden der Quotient berechnet. Mit dieser MMP-9/TIMP-1-Ratio wird der Zusammenhang mit der Progression der koronaren Herzkrankheit deutlicher erkennbar. Bei den Patienten mit stabiler Angina pectoris ergab sich eine MMP-9/TIMP-1-Ratio von $1,59 \pm 0,85$, bei Patienten mit instabiler Angina pectoris steigt dieser Wert auf $2,72 \pm 1,04$ ($p < 0,05$ versus stabile Angina pectoris) und erreicht sein höchstes Niveau mit $4,98 \pm 1,49$ bei den Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt ($p < 0,005$ versus instabile Angina pectoris).

Die Bedeutung von T-Helfer-Zellen bei der Progression
der koronaren Herzkrankheit

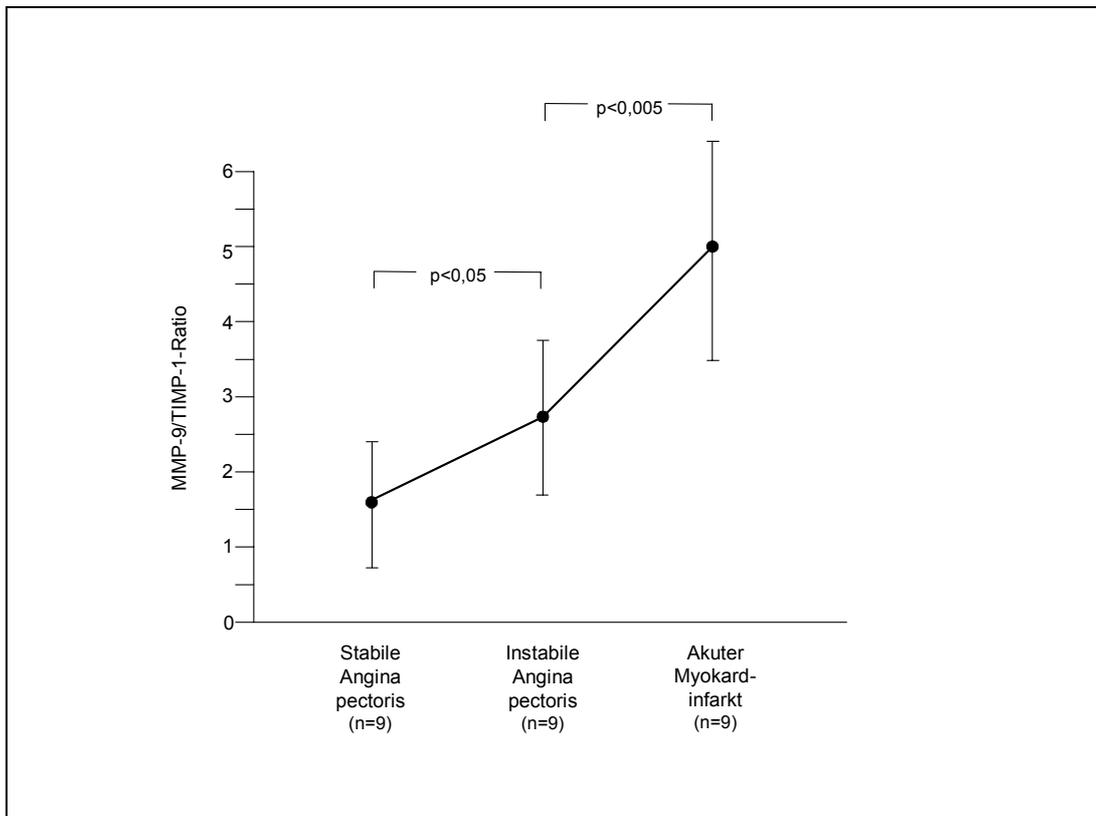


Abbildung 21
Vergleich der MMP-9/TIMP-1-Ratio

Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Anstieg von Th1-Markern und die Aktivierung des MMP-Systems miteinander korrelieren.

5. Diskussion

Mit unseren vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die akuten Stadien in der Progression der koronaren Herzkrankheit mit einer Aktivierung von Th1-Zellen einhergehen. Eine Aktivierung von Th2- oder Th0-Zellen bleibt aus. Dies konnte sowohl auf der mRNA-Ebene mit Hilfe der RT-PCR als auch auf der Proteinebene mit Hilfe der Durchflusszytometrie dargelegt werden. Beim Vergleich der Aktivierung von Th1-Zellen mit der Serumkonzentration der Myokardläsionsmarker stellte sich heraus, dass diese einem Anstieg der Myokardläsionsmarker vorausgeht. Außerdem konnte durch Bestimmung der Serumkonzentrationen von einer Matrix-Metalloproteinase und einem ihrer Inhibitoren die Korrelation der Aktivierung der Th1-Zellen mit einer Aktivierung des MMP-Systems gezeigt werden.

Bereits vor einigen Jahren wurde entdeckt, dass arteriosklerotische Plaques eine signifikante Menge an T-Lymphozyten enthalten (Jonasson et al. 1986; Emeson et al. 1988). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass sich ein gewisser Anteil dieser T-Lymphozyten im aktivierten Zustand befindet. Diese Aktivierung wurde an der Expression von HLA-DR und VLA-1 festgemacht. Diese Marker werden von T-Zellen nur in aktiviertem Zustand synthetisiert (Hansson et al. 1989). In späteren Studien wurde die Arteriosklerose in ihrem klinischen Verlauf untersucht, indem die Aktivierung der T-Lymphozyten in den unterschiedlichen Stadien der koronaren Herzkrankheit bis hin zum akuten Myokardinfarkt mit Hilfe der Durchflusszytometrie und ELISA gemessen wurde. Dabei fand man heraus, dass bei der instabilen Angina pectoris signifikant mehr Aktivierungsmarker von T-Lymphozyten (HLA-DR und IL-2R bzw. CD25) exprimiert werden als in weniger akuten Stadien (Neri Serneri et al. 1997; van der Wal et al. 1998; Caligiuri et al. 1998).

In diversen Studien wurde versucht, die aktivierten T-Lymphozyten weiter zu spezifizieren. Bei ApoE-knockout Mäusen, einem Tiermodell für die Arteriosklerose, wurde die Anzahl von CD4⁺ mit CD8⁺ T-Lymphozyten miteinander

verglichen. In den arteriosklerotischen Läsionen der Mäuse dominierten $CD4^+$ Zellen, wohingegen $CD8^+$ Zellen nur spärlich vorhanden waren (Zhou et al. 1996). Bei einem methodisch gleichen Tiermodell konnte der Zusammenhang der Progression der Arteriosklerose mit $IFN-\gamma$, einem Sekretionsprodukt von aktivierten T-Lymphozyten, gezeigt werden (Gupta et al. 1997). Beim Vergleich der verschiedenen klinischen Stadien der koronaren Herzkrankheit wurde bei den Patienten mit instabiler Angina pectoris im Vergleich zu solchen mit stabiler Angina pectoris eine erhöhte $IFN-\gamma$ -Produktion (Liuzzo et al. 1999) und auch eine erhöhte IL-2-Produktion nachgewiesen (Caligiuri et al. 1998).

Unsere Arbeitsgruppe belegte erstmals die Rolle von Th1-Zellen, einer Subpopulation von $CD4^+$ Zellen (T-Helfer-Zellen). Bei einer Sonderform der Arteriosklerose, der Transplantatvaskulopathie bei herztransplantierten Mäusen, wurde die Beteiligung von STAT4, einem typischen Transkriptionsfaktor von Th1-Zellen, entdeckt (Koglin et al. 2000). Zudem konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass bei Patienten nach Herztransplantation eine periphere Expansion von zirkulierenden Th1-Zellen einen prädiktiven Wert für eine koronare endotheliale Dysfunktion, eine Sonderform der Arteriosklerose, besitzt (Koglin et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei dem Vergleich der einzelnen Patientenkollektive mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine gesteigerte Expression von $IFN-\gamma$ im Stadium der instabilen Angina pectoris auf Proteinebene nachgewiesen. Mit der RT-PCR konnten auch auf der mRNA-Ebene erhöhte Level von $IFN-\gamma$ und zusätzlich von IL-2 nachgewiesen werden. Beide sind Effektorzytokine, deren Expression ein Muster ergibt, welches für eine Th1-Antwort typisch ist. Es wurden ebenfalls erhöhte Level von STAT4, einem charakteristischen Transkriptionsfaktor von Th1-Zellen, bei den Patienten mit instabiler Angina pectoris gefunden. Somit konnte mit dieser Arbeit die Beteiligung aktivierter $CD4^+$ T-Lymphozyten bei der Progression der koronaren Herzkrankheit weiter spezifiziert und als Th1-Antwort klassifiziert werden, in-

dem das für Th1-Zellen typische Zytokinmuster zusammen mit dem charakteristischen Transkriptionsfaktor bei diesen Patienten nachgewiesen wurde.

Neben Th1-typischen Markern wurden auch die für andere Subpopulationen der T-Helfer-Zellen charakteristischen Zytokine untersucht. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden IL-4 auf Proteinebene und mit der RT-PCR IL-4 und zusätzlich IL-10 als zwei typische Marker für eine Th2-Antwort untersucht. Bei diesen Effektorzytokinen zeigten sich zwischen den verschiedenen Stadien keine signifikanten Unterschiede. Im oben beschriebenen Modell der Transplantatvaskulopathie bei Mäusen wurde für den Th2-typischen Transkriptionsfaktor STAT6 keine gesteigerte Expression beschrieben (Koglin et al. 2000). Auch in dieser Arbeit konnten für STAT6 zwischen den einzelnen Patientenkollektiven keine signifikant unterschiedlichen Level gezeigt werden. Eine Th2-Antwort scheint somit bei der Progression der koronaren Herzkrankheit keine Rolle zu spielen. Genauso scheint die direkte Beteiligung von Th0-Lymphozyten, für die die Expression sowohl von Th1- als auch von Th2-typischen Zytokinen charakteristisch ist, bei diesem Prozess unwahrscheinlich zu sein.

In der Durchflusszytometrie konnte für Th1-Zellen eine allmählich gesteigerte Expansion nachgewiesen werden, die mit niedrigen Werten in der Kontrollgruppe beginnt und bereits bei Patienten mit stabiler Angina pectoris signifikant gesteigert ist. Die Expansion dieser Zellen bzw. die Zytokinexpression erreicht die höchsten Werte bei Patienten mit einer instabilen Angina pectoris. Die Korrelation dieser Werte mit der Progression der koronaren Herzkrankheit bringt die Frage nach „cause or consequence“ mit sich: Ist die Aktivierung der Th1-Antwort die Ursache einer Progression der koronaren Herzkrankheit bis hin zum Myokardinfarkt oder ist sie vielmehr als eine immunologische Folge dieses Prozesses zu sehen?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden in den einzelnen Patientenkollektiven im Serum zusätzlich typische Marker der myokardialen Parenchymschädi-

gung, nämlich die Creatinkinase und das Troponin I bestimmt. Die in der Durchflusszytometrie gemessene IFN- γ -Expression wurde mit diesen Markern verglichen. Es zeigte sich, dass das Maximum der IFN- γ -Expression bereits im Stadium der instabilen Angina pectoris erreicht wird. Bereits bei den Patienten mit akutem Myokardinfarkt werden wieder Werte gemessen, die mit der Kontrollgruppe vergleichbar sind, das heißt die Aktivierung der Th1-Zellen ist in diesem Stadium bereits beendet. Die Myokardläsionsmarker erreichen ihr Maximum hingegen erst im Stadium des akuten Myokardinfarkts. Somit zeigt sich, dass die IFN- γ -Expression der Th1-Zellen der Schädigung am Myokard vorausgeht, und dass die Th1-Antwort nicht aktiviert bleibt, sondern transient ist.

Analog zu den vorliegenden Ergebnissen wurde bei Monozyten ebenfalls eine transiente Aktivierung nachgewiesen. Eine erhöhte Expression des tissue factor, als Maß der Aktivierung, wurde bei Patienten mit instabiler Angina pectoris gemessen, welche beim manifesten Infarkt wieder deutlich zurückging (Jude et al. 1994).

Diese vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass die Effektorfunktionen aktivierter Th1-Lymphozyten als Ursache an der Entstehung akuter Koronarsyn-drome beteiligt sind. Die Effektorfunktionen dieser Lymphozyten sind Zytokin-vermittelt und stehen als Teil innerhalb einer komplexen Immunantwort.

Die frühe und fortgesetzte Aktivierung der Th1-Zellen, als Bestandteil einer zellulären Immunantwort, bei stabiler Angina pectoris sowie die rapide Rückbildung bei den Patienten mit akutem Myokardinfarkt legen nahe, dass die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren als Ursache einer zunehmenden Plaqueinstabilität und die Aktivierung von Th1-Zellen nicht als Folge der Myokardschädigung zu verstehen sind.

Als Limitation dieser Studien bleibt anzumerken, dass nur einzelne Patientenkollektive unterschieden werden. Es werden somit Patienten mit einem

völlig verschiedenen Krankheitshintergrund verglichen. Genetische Dispositionen oder Umweltfaktoren, die durchaus Einfluss auf das Geschehen nehmen können, werden auf diese Weise nicht berücksichtigt. Der Beweis, den ein einzelner Patient im Verlauf liefern würde, bleibt letztlich aus. Einzelne Patienten von Krankheitsbeginn an über eine Angina pectoris bis hin zum Infarkt zu beobachten, ist jedoch methodisch kaum durchführbar und auch aus ethischen Gründen nicht realisierbar.

Als weiterer Nachteil ist die Verwendung von Aortenwurzelblut zu nennen. Somit werden die Lymphozyten nicht direkt am Ort der arteriosklerotischen Läsion erfasst. Andere Prozesse, bei denen eine Aktivierung von T-Helfer-Zellen eine Rolle spielt, können durchaus die Ergebnisse beeinflussen. Ob diese Aktivierung als lokaler oder systemischer Vorgang zu sehen ist, kann so letztlich nicht geklärt werden. Die Bestimmung der T-Lymphozyten direkt in Nähe der arteriosklerotischen Läsion wäre methodisch zu aufwendig, da neben Blutentnahmen an unterschiedlichen Stellen, die zum Teil technisch nicht fassbar sind, deren Ergebnis auch durch pathologische Präparate bestätigt werden müsste.

Durch diese Limitierungen können die Ergebnisse zwar keine Beweise liefern, bieten aber trotzdem wichtige Hinweise und Belege für die Beteiligung der Aktivierung einer Th1-Antwort und wie diese innerhalb der Progression der koronaren Herzkrankheit zu verstehen ist.

So bieten diese Ergebnisse für die Zukunft sowohl diagnostische als auch therapeutische Perspektiven:

Auf immunologischer Ebene konnte bereits für den allgemeinen Entzündungsmarker CRP ein diagnostischer und prognostischer Wert beschrieben werden. Die CRP-Konzentrationen im Serum zeigen eindeutige Relationen mit der Progression der Arteriosklerose (Garcia-Moll et al. 2000; Liuzzo et al. 1994; Morrow et al. 1998). Das Monitoring der Aktivierung von Th1-Zellen könnte ähnlich der CRP-Konzentration als früher Marker eines beginnenden

akuten Koronarsyndroms eingesetzt werden. Eine frühe Festlegung der therapeutischen Strategie könnte so möglich werden. Dafür müssen allerdings die prognostische Bedeutung dieses Markers und die klinische Konsequenz durch prospektive Studien mit unterschiedlich modifizierten Therapiemodellen, die die Diagnostik der Th1-Aktivierung bei verschiedenen Patientenkollektiven einbeziehen, untersucht werden. Außerdem bedarf es noch der Untersuchung von Sensitivität und Spezifität dieses Markers.

Neben der diagnostischen und prognostischen Bedeutung der Th1-Aktivierung könnten Th1-Zellen auch direkt das Ziel des therapeutischen Einflusses sein. Unsere bisherigen medikamentös therapeutischen Bemühungen zielten auf Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Thrombozyten, deren Beteiligung über viele Jahre hinweg Hauptbestandteil der Forschung zur Entstehung arteriosklerotischer Läsionen war. Eines dieser Ziele war die Thrombozytenaggregationshemmung. Durch die Hemmung der Cyclooxygenase mit Stoffen wie Acetylsalicylsäure kommt es in Thrombozyten zu einem Ausfall der Thromboxan A₂-Bildung, welches die Aggregation fördert. Mit GIIb/IIIa-Blockern wie Ticlopidin wird die Kontaktaufnahme zwischen Fibrinogen und Glykoprotein-Molekülen, die auf der Oberfläche der Thrombozyten lokalisiert sind, verhindert und somit eine Vernetzung der Thrombozyten über Fibrinogen-Moleküle unmöglich gemacht. Ähnlich wirken auch Fab-Antikörperfragmente (Abciximab), die gegen das Glykoprotein IIb/IIIa gerichtet sind. Die Proliferation glatter Muskelzellen wird mit Statinen gehemmt (Simvastatin, Atorvastatin). Dies geschieht durch Eingriff in die Cholesterinsynthese. Die LDL-Konzentrationen werden gesenkt, indem das Enzym HMG-CoA-Reduktase, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, gehemmt wird. ACE-Hemmstoffe wie Captopril oder Enalapril unterdrücken die Bildung von Angiotensin II und die spezifischen AT₁-Rezeptoren-Blocker (Losartan) hemmen dessen Wirkung. Angiotensin II, das Hauptprodukt im Renin-Angiotensin-System, ist ein potenter Vasokonstriktor. Neben der Entstehung des Hypertonus, stimuliert es das Wachstum der glatten Gefäßmuskulatur und steigert deren Lipooxygenase-Aktivität. Diese Mechanismen sollen mit

Hilfe der ACE-Hemmer verhindert und somit soll auch die Endothelfunktion stabilisiert werden. (Freek 1999; Badimon et al. 2001; Cruz-Fernandez 2001)

In den letzten Jahren versucht man immer mehr therapeutischen Einfluss auf die immunologische Seite der Erkrankung zu nehmen. Es bestehen z.B. Überlegungen, durch Unterbrechung des CD40/CD40L-Systems einen positiven Effekt auf die Plaquestabilität auszuüben (Schönbeck et al. 2000). Die vorliegenden Ergebnisse könnten ebenfalls Anlass zu therapeutischen Überlegungen sein. Therapeutisch könnte man spezifisch die Th1-Zellen angehen, indem man z.B. die systemische oder lokale T-Zell-Aktivierung oder die Expression pathogenetisch bedeutsamer Zytokine blockiert, was wiederum zur therapeutischen Plaquestabilisierung beitragen könnte. Es bleibt zu hoffen, dass dadurch die Prognose von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen entscheidend beeinflusst werden kann. Russell Ross drückt dies so aus: "If we can selectively modify the harmful components of inflammation in the arteries and leave the protective aspects intact, we may create new avenues for the diagnosis and management of disease in ... patients with cardiovascular disease."

Als offene Frage dieser Ergebnisse bleibt die Stellung der Th1-Aktivierung in der gesamten, komplexen Immunantwort bei der Arteriosklerose. Die Aktivierung einer T-Zelle erfolgt über Antigen-präsentierende Zellen, zusammen mit costimulatorischen Molekülen und/oder Zytokinen. Dass es sich auch bei der Atherogenese um ein Antigen handelt, darauf weisen einige Studien hin. In arteriosklerotischen Plaques wurden für die Antigen-vermittelte T-Zell-Aktivierung typische costimulatorische Moleküle gefunden (de Boer et al. 1997). Weiterhin deutete eine nachgewiesene Monoklonalität im T-Zell-Rezeptor auf ursächliche Antigene hin (Liuzzo et al. 2000; Caligiuri et al. 2000). Dabei ist die Frage nach der Art des Antigens besonders interessant. Hinweise gibt es bereits einige: Wichtig ist wohl das in den arteriosklerotischen Läsionen und auch in den frühen fatty streaks vorkommende modifizierte bzw. oxidierte LDL (Ylä-Herttuala et al. 1989; Carew et al. 1987;

Stemme et al. 1995). Als Fremdartigen waren einige Mikroorganismen im Gespräch, darunter Chlamydia pneumoniae und das Herpesvirus (Libby et al. 1997; Hendrix et al. 1990; Jackson et al. 1997). In den bisherigen Studien dazu konnten diese Hypothesen allerdings bis jetzt nicht rückhaltig bestätigt werden. Nicht nur Fremdartigene sondern auch autoimmunologische Prozesse scheinen eine Rolle zu spielen. Als mögliches Antigen ist hierbei das Hitzeschock-Protein 60 im Gespräch (Wick et al. 1997).

Eine weitere essentielle Frage stellt die Folge der T-Zell-Aktivierung dar, d.h., durch welche Mechanismen triggern zelluläre Th1-Immunmechanismen die zunehmende Plaquestabilität? Zum einen könnte ein Zytokin-vermittelter Einfluss auf Makrophagen ein Rolle spielen. In einer Studie gibt es dafür bereits einen Hinweis. Es konnte gezeigt werden, dass Monozyten durch IFN- γ bei Patienten mit instabiler Angina pectoris, wenigstens zum Teil, aktiviert werden (Liuzzo et al. 2001). Zum anderen ist ein direkter Einfluss der Zytokine der Th1-Zellen auf die Plaquestabilität denkbar, wofür es allerdings noch keine Belege gibt und es noch intensiven Nachforschungen bedarf.

Die Zytokin-vermittelte Aktivierung von Makrophagen könnte ein Weg sein, diese zu stimulieren, bestimmte Proteine und Enzyme zu produzieren und zu sezernieren. Der Einfluss auf dem von Makrophagen sezernierten tissue factor könnte hier eine Rolle spielen. Der tissue factor beeinflusst unter anderem die Thrombogenizität der arteriosklerotischen Läsion (Fernandez-Ortiz et al. 1994; Banner et al. 1996; Toschi et al. 1997; Badimon et al. 1999). Eine Beteiligung von den sogenannten Matrix-Metalloproteinasen - proteolytische Enzyme, welche ebenfalls von Makrophagen sezerniert werden können - bei dem akuten Koronarsyndrom konnte in einigen Studien gezeigt werden (Moreno et al. 1994; Galis et al. 1994; Libby 1995; Brown et al. 1995; Inokubo et al. 2001; Uzui et al. 2002; Faia et al. 2002; Galis et al. 2002; Ikeda et al. 2003). Ein Anstieg der Matrix-Metalloproteinasen soll insbesondere für die Instabilität der Plaque und der daraus resultierenden Ruptur verantwortlich sein. In zahlreichen Studien wurde nach Faktoren gesucht, die Einfluss auf

die Regulation des MMP-Systems nehmen. So scheint das CD40/CD40L-System dabei eine Rolle zu spielen. Der Oberflächenmarker CD40 auf T-Lymphozyten interagiert mit seinem Liganden CD40L auf glatten Muskelzellen und scheint so diese zur MMP-Expression anzuregen (Schonbeck et al. 1997). In weiteren Studien konnte eine Korrelation von Zytokinen und anderen proinflammatorischen Mediatoren mit einem Anstieg der Matrix-Metalloproteinasen und einem Abfall ihrer Inhibitoren gezeigt werden. So wurde eine gesteigerte Produktion von MMPs durch den Einfluss von Zytokinen wie IL-1 und TNF- α beobachtet (Galis et al. 1994, 1995; Rajavashisth et al. 1999). Ebenso zeigte sich durch den Immunmodulator IL-8, durch oxidiertes LDL, welches bekanntermaßen auf Gen-Expression Einfluss nehmen kann, und durch andere Mediatoren eine gesteigerte MMP-Expression und eine inhibierte TIMP-Expression durch Makrophagen oder glatte Muskelzellen (Johnson et al. 1998; Kol et al. 1998; Moreau et al. 1999; Rajavashisth et al. 1999; Xu et al. 1999).

Mit unseren Ergebnissen konnten wir zusätzlich eine Korrelation von Th1-Aktivierung mit einer Beteiligung des MMP-Systems bei der Progression der koronaren Herzkrankheit zeigen. Ein Anstieg von MMP-9 bei den Patienten mit instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt steht dem Abfall des Inhibitors TIMP-1 bei den Patienten mit akutem Myokardinfarkt gegenüber. Ein Verhältnis der beiden Parameter zueinander zeigt einen zunehmenden Anstieg zugunsten des proteolytischen Enzyms MMP-9. Die Korrelation mit der zunehmenden Aktivierung von Th1-Zellen spricht für dessen Einfluss auf das fein abgestimmte und regulierte System von Aktivatoren und Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen. Der direkte Nachweis der Kausalität zwischen T-Zell-Aktivierung und MMP-Produktion steht allerdings noch aus.

Auch die Makrophagen bzw. ihre Sekretionsprodukte wie die Matrix-Metalloproteinasen könnten in Zukunft ebenfalls das Ziel für die Forschung nach neuen therapeutischen Möglichkeiten in der Behandlung der koronaren

Herzkrankheit sein. Der Eingriff in den verschiedenen Ebenen der immunologischen Komponente bei der Progression der Arteriosklerose lässt auf eine deutliche Verbesserung der Prognose dieser Patienten hoffen.

6. Zusammenfassung

Die Progression der Arteriosklerose von stabilen Formen zur instabilen Form, gipfelnd im akuten Koronarsyndrom und in myokardialen Läsionen, wurde mit verschiedenen immunologischen Prozessen in Verbindung gebracht. Sowohl die Aktivierung von Immunzellen als auch die Hochregulation von Akute-Phase-Proteinen und Zytokinen konnten im Zusammenhang mit zunehmender Instabilität der Angina pectoris gezeigt werden. Im Speziellen wies man aktivierte zirkulierende T-Lymphozyten bei Patienten mit instabiler Angina pectoris nach und vermutete darin eine essentielle pathogenetische Rolle.

Eine genaue Spezifizierung der aktivierten T-Lymphozyten blieb bisher genauso aus wie der zeitliche Verlauf der T-Zell-Aktivierung. Außerdem blieb bisher offen, ob die Aktivierung der T-Zellen die Ursache oder die Folge von arteriosklerotischen Prozessen darstellt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass aktivierte Th1-Zellen, eine Subpopulation der T-Helfer-Zellen, eine essentielle Rolle bei der Progression von stabilen Formen der Arteriosklerose zu instabilen Koronarsyndromen spielen. Dies wird durch eine gesteigerte Expression der Th1-typischen Zytokine INF- γ und IL-2 sowie des Transkriptionsfaktors STAT4 deutlich.

Die anderen Subpopulationen der T-Helfer-Zellen – Th0- und Th2-Zellen – sind bei der Progression der koronaren Herzkrankheit nicht beteiligt.

Die transiente Th1-Expansion genauso wie die zeitliche Beziehung zu Markern myokardialer Schädigung zeigen deutlich, dass die Aktivierung von zellulären Immunantworten und die Hochregulation von Immunmediatoren wie INF- γ mitverantwortlich für die Plaqueinstabilität sind und nicht erst als Folge von Myokardschädigungen auftreten.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Progression der koronaren Herzkrankheit mit einer Aktivierung des Systems der Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren einhergeht. Diese Aktivierung korreliert mit der zunehmenden Expansion der Th1-Zellen und stellt ein mögliches Ziel für die Effektorfunktionen von Th1-Zytokinen dar.

Durch diese Arbeit konnten einige offene Fragen im Zusammenhang mit den immunpathologischen Prozessen bei der Progression der koronaren Herzkrankheit geklärt werden. Sie bieten neue Angriffspunkte für diagnostische und prognostische Überlegungen und lassen als mögliches Ziel in Zukunft auf neue therapeutische Möglichkeiten hoffen.

7. Literaturverzeichnis

- Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383 (6603): 787-93.
- Annunziato F., Galli G., Cosmi L., et al. (1998). Molecules associated with human Th1 or Th2 cells. *European Cytokine Network*. 9 (3 Suppl): 12-6.
- Armant M., Armitage R., Boiani N., et al. (1996). Functional CD40 ligand expression on T lymphocytes in the absence of T cell receptor engagement: involvement in interleukin-2-induced interleukin-12 and interferon-gamma production. *European Journal of Immunology*. 26 (7): 1430-4.
- Badimon J.J., Lettino M., Toschi V., et al. (1999). Local inhibition of tissue factor reduces thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques. Effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation*. 99 (14): 1780-7.
- Badimon L., Vilahur G., Sanchez S., et al. (2001). Atheromatous plaque formation and thrombogenesis: formation, risk factors and therapeutic approaches. *European Heart Journal Supplements*. 3 (Suppl I): I16-I22.
- Baggiolini M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 392 (6676): 565-8.
- Banner D.W., D'Arcy A., Chene C., et al. (1996). The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature*. 380 (6569): 41-6.
- Barbulescu K., Becker C., Schlaak J.F., et al. (1998). IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human INF-gamma pro-

moter in primary CD4+ T lymphocytes. *Journal of Immunology*. 160 (8): 3642-7.

Bentzon J.F., Falk E. (2001). Coronary plaques calling for action – why, where and how many? *European Heart Journal Supplements*. 3 (Suppl I): 13-19.

Biasucci L.M., Colizzi C., Rizzello V., et al. (1999). Role of inflammation in the pathogenesis of unstable coronary artery diseases. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 59 Suppl 230: 12-22.

Biasucci L.M., Liuzzo G., Angiolillo D.J., et al. (2000). Inflammation and acute coronary syndromes. *Herz*. 25 (2): 108-12.

Biasucci L.M., Vitelli A., Liuzzo G., et al. (1996). Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation*. 94 (5): 874-7.

Birkedal-Hansen H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology*. 7 (5): 728-35.

Birkedal-Hansen H., Moore W., Bodden M.K., et al. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 4 (2): 197-250.

Bombeli T., Schwartz B.R., Harlan J.M. (1998). Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha v beta 3 integrin, and GPIIb/IIIa. *Journal of Experimental Medicine*. 187 (3): 329-39.

Bonecchi R., Bianchi G., Bordignon P.P., et al. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T

helper cells (Th1s) and Th2s. *Journal of Experimental Medicine*. 187 (1): 129-34.

Braunwald E. (1997). Shattuck lecture – cardiovascular medicine at the turn of the millenium: triumphs, concerns, and opportunities. *New England Journal of Medicine*. 337 (19): 1360-9.

Braunwald E. (1989). Unstable Angina. A Classification. *Circulation*. 80 (2): 410-4.

Breslow J.L. (1997). Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. *Nature Medicine*. 3 (6): 600-1.

Brown D.L., Hibbs M.S., Kearney M., et al. (1995). Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation*. 91 (8): 2125-31.

Caligiuri G., Liuzzo G., Biasucci L.M., et al. (1998). Immune system activation follows inflammation in unstable angina: pathogenetic implications. *Journal of the American College of Cardiology*. 32 (5): 1295-304.

Caligiuri G., Paulsson G., Nicoletti A., et al. (2000). Evidence for antigen-driven T-cell response in unstable angina. *Circulation*. 102 (10): 1114-9.

Carew T.E., Schwenke D.C., Steinberg D. (1987). Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84 (21): 7725-9.

- Collins R.G., Velji R., Guevara N.V., et al. (2000). P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*. 191 (1): 189-94.
- Constant S.L., Bottomly K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annual Review of Immunology*. 15: 297-322.
- Cruz-Fernandez J.M. (2001). Antiplatelet drugs in the treatment of acute coronary syndromes: Focus on cyclooxygenase inhibitors. *European Heart Journal Supplements*. 3 (Suppl I): I23-I30.
- Danesh J., Whincup P., Walker M., et al (2000). Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *British Medical Journal*. 321 (7255):199-204.
- Davies M.J. (1990). A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation*. 82 (3 Suppl): II 38-46.
- De Boer O.J., Hirsch F., van der Wal A.C., et al. (1997). Costimulatory molecules in human atherosclerotic plaques: an indication of antigen specific T lymphocyte activation. *Atherosclerosis*. 133 (2): 227-34.
- Dollery C.M., McEwan J.R., Henney A.M. (1995). Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circulation Research*. 77 (5): 863-8.
- Dong Z.M., Chapman S.M., Brown A.A, et al. (1998). The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 102 (1): 145-52.

- Emeson E.E., Robertson A.L.Jr. (1988). T lymphocytes in aortic and coronary intimas. Their potential role in atherogenesis. *American Journal of Pathology*. 130 (2): 369-76.
- Faia K.L., Davis W.P., Marone A.J., et al. (2002). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in hamster aortic atherosclerosis: correlation with in-situ zymography. *Atherosclerosis*. 160 (2): 325-37.
- Falk E., Shah P.K., Fuster V. (1995). Coronary plaque disruption. *Circulation*. 92 (3): 657-71.
- Febbraio M., Podrez E.A., Smith J.D., et al. (2000). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 105 (8): 1049-56.
- Fernandez-Ortiz A., Badimon J.J., Falk E., et al. (1994). Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *Journal of the American College of Cardiology*. 23 (7): 1562-9.
- Ferreiros E.R., Boissonnet C.P., Pizarro R., et al. (1999). Independent prognostic value of elevated C-reactive protein in unstable angina. *Circulation*. 100 (19): 1958-63.
- Freek W.A. Verheugt. (1999). Acute coronary syndromes: drug treatments. *Lancet*. 353 (Suppl 2): SII 20-23.
- Fuster V. (1994). Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation*. 90 (4): 2126-46.

- Fuster V., Fayad Z.H., Badimon J.J., (1999). Acute coronary syndromes: biology. *Lancet*. 353 (Suppl 2): SII 5-9.
- Galis Z.S., Khatri J.J. (2002). Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circulation Research*. 90 (3): 251-62.
- Galis Z.S., Muszynski M., Sukhova G.K., et al. (1995). Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 748:501-7.
- Galis Z.S., Muszynski M., Sukhova G.K., et al. (1994). Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circulation Research*. 75 (1):181-9.
- Galis Z.S., Sukhova G.K., Lark M.W., et al. (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation*. 94 (6): 2493-503.
- Garcia-Moll X., Zouridakis E., Cole D., et al. (2000). C-reactive protein in patients with chronic stable angina: differences in baseline serum concentration between women and men. *European Heart Journal*. 21 (19): 1598-606.
- Glimcher L.H., Singh H. (1999). Transcription factors in lymphocyte development – T and B cells get together. *Cell*. 96 (1): 13-23.
- Gupta S., Fredericks S., Schwartzman R.A., et al. (1997). Serum neopterin in acute coronary syndromes. *Lancet*. 349 (9060): 1252-3.

Gupta S., Pablo A.M., Jiang X., et al. (1997). IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *Journal of Clinical Investigation*. 99 (11): 2752-61.

Hansson G.K., Holm J., Jonasson L. (1989). Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *American Journal of Pathology*. 135 (1): 169-75.

Hendrix M.G., Salimans M.M., van Boven C.P., et al. (1990). High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *American Journal of Pathology*. 136 (1): 23-8.

Henney A.M., Wakeley P.R., Davies M.J., et al. (1991). Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridisation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 (18): 8154-8.

Hollenbaugh D., Mischel-Petty N., Edwards C.P., et al. (1995). Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *Journal of Experimental Medicine*. 182 (1): 33-40.

Hsieh C.S., Macatonia S.E., Tripp C.S., et al. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 260 (5107): 547-9.

Ikeda U., Shimada K. (2003). Matrix metalloproteinases and coronary artery diseases. *Clinical Cardiology*. 26 (2): 55-9.

Inokubo Y., Hanada H., Ishizaka H., et al. (2001). Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the

coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. *American Heart Journal*. 141 (2): 211-7.

Jackson L.A., Campbell L.A., Schmidt R.A., et al. (1997). Specificity of detection of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular atheroma: evaluation of the innocent bystander hypothesis. *American Journal of Pathology*. 150 (5): 1785-90.

Johnson J.L., Jackson C.L., Angelini G.D., et al. (1998). Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 18 (11): 1707-15.

Jonasson L., Holm J., Skalli O., et al. (1986). Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 6 (2): 131-8.

Jude B., Agraou B., McFadden E.P., et al. (1994). Evidence for time-dependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or in stable angina. *Circulation*. 90 (4): 1662-8.

Kai H., Ikeda H., Yasukawa H., et al. (1998). Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *Journal of the American College of Cardiology*. 32 (2): 368-72.

Kaplan M.H., Sun Y.L., Hoey T., et al. (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*. 382 (6587): 174-7.

- Kaski J.C., Zouridakis E.G. (2001). Inflammation, infection and acute coronary plaque events. *European Heart Journal Supplements*. 3 (Suppl I): 110-115.
- Kim J.I., Ho I.C., Grusby M.J., et al. (1999). The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity*. 10 (6): 745-51.
- Koglin J., Glysing-Jensen T., Gadiraju S., et al. (2000). Attenuated cardiac allograft vasculopathy in mice with targeted deletion of the transcription factor STAT4. *Circulation*. 101 (9): 1034-9.
- Koglin J., Glysing-Jensen T., Raisanen-Sokolowski A., et al. (1998). Immune sources of transforming growth factor-beta1 reduce transplant arteriosclerosis: insight derived from a knockout mouse model. *Circulation Research*. 83 (6): 652-60.
- Koglin J., Methe H., Meiser B., et al. (2001). Peripheral expansion of circulating TH1 cells predicts coronary endothelial dysfunction after cardiac transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 20 (2): 173.
- Kol A., Sukhova G.K., Lichtman A.H., et al. (1998). Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*. 98 (4): 300-7.
- Krieger N.R., Yin D.P., Fathman C.G. (1996). CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorejection. *Journal of Experimental Medicine*. 184 (5): 2013-8.

- Lee R.T., Libby P. (1997). The Unstable Atheroma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 17 (10): 1859-67.
- Lee R.T., Schoen F.J., Loree H.M., et al. (1996). Circumferential stress and matrix metalloproteinase 1 in human coronary atherosclerosis. Implications for plaque rupture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 16 (8): 1070-3.
- Lee T.S., Yen H.C., Pan C.C., et al. (1999). The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 19 (3): 734-42.
- Lenschow D.J., Walunas T.L., Bluestone J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual Review of Immunology*. 14: 233-58.
- Li Z., Li L., Zielke H.R., et al. (1996). Increased expression of 72-kD type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *American Journal of Pathology*. 148 (1): 121-8.
- Libby P. (2001). Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 104 (3): 365-72.
- Libby P. (1995). Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 91 (11): 2844-50.
- Libby P., Egan D., Skarlatos S. (1997). Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: assessment of the evidence and need for future research. *Circulation*. 96 (11): 4095-103.
- Liuzzo G., Angiolillo D.J., Buffon A., et al. (2001). Enhanced response of blood monocytes to in vitro lipopolysaccharide-challenge in patients with recurrent unstable angina. *Circulation*. 103 (18): 2236-41.

- Liuzzo G., Biasucci L.M., Gallimore J.R., et al. (1999). Enhanced inflammatory response in patients with preinfarction unstable angina. *Journal of the American College of Cardiology*. 34 (6): 1696-703.
- Liuzzo G., Biasucci L.M., Gallimore J.R., et al. (1994). The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *New England Journal of Medicine*. 331 (7): 417-24.
- Liuzzo G., Goronzy J.J., Yang H., et al. (2000). Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation*. 101 (25): 2883-8.
- Liuzzo G., Kopecky S.L., Frye R.L., et al. (1999). Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation*. 100 (21): 2135-9.
- Liuzzo G., Vallejo A.N., Kopecky S.L., et al. (2001). Molecular fingerprint of interferon-gamma signaling in unstable angina. *Circulation*. 103 (11): 1509-14.
- London C.A., Abbas A.K., Kelso A. (1998). Helper T cell subsets: Heterogeneity, functions and development. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 63 (1-2): 37-44.
- Lusis A. J., (2000). Atherosclerosis. *Nature*. 407 (6801): 233-41.
- Mach F., Schonbeck U., Sukhova G.K., et al. (1998). Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature*. 394 (6689): 200-3.
- Maggi E., Parronchi P., Manetti R., et al. (1992). Reciprocal regulatory effects of INF-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *Journal of Immunology*. 148 (7): 2142-7.

- Manetti R., Parronchi P., Giudizi M.G., et al. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12(IL-12)) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *Journal of Experimental Medicine*. 177 (4): 1199-204.
- Maseri A. (1997). Inflammation, Atherosclerosis, and Ischemic Events – Exploring the Hidden Side of the Moon. *New England Journal of Medicine*. 336 (14): 1014-16.
- Matrisian L.M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*. 14 (7): 455-63.
- Moreau M., Brocheriou I., Petit L., et al. (1999). Interleukin-8 mediates down-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque. *Circulation*. 99 (3): 420-6.
- Moreno P.R., Falk E., Palacios I.F., et al. (1994). Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*. 90 (2): 775-8.
- Morrow D.A., Rifai N., Antman E.M., et al. (1998). C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. Thrombolysis in Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 31 (7): 1460-5.
- Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., et al. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*. 136 (7): 2348-57.

- Muller W.A., Weigl S.A., Deng X., et al. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 178 (2): 449-60.
- Murphy K.M., Ouyang W., Farrar J.D., et al. (2000). Signaling and transcription in T helper development. *Annual Review of Immunology*. 18: 451-94.
- Nagata K., Tanaka K., Ogawa K., et al. (1999). Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. *Journal of Immunology*. 162 (3): 1278-86.
- Nakashima Y., Raines E.W., Plump A.S., et al. (1998). Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in ApoE-deficient mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 18 (5): 842-51.
- Napoli C., D'Armiento F.P., Mancini F.P., et al. (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *Journal of Clinical Investigation*. 100 (11): 2680-90.
- Neri Serneri G.G., Abbate R., Gori A.M., et al. (1992). Transient intermittent lymphocyte activation is responsible for the instability of angina. *Circulation*. 86 (3): 790-7.
- Neri Serneri G.G., Prisco D., Martini F. et al. (1997). Acute T-cell activation is detectable in unstable angina. *Circulation*. 95 (7): 1806-12.
- Newby A.C., Southgate K.M., Davies M. (1994). Extracellular matrix degrading metalloproteinases in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Basic Research in Cardiology*. 89 (Suppl I): 59-70.

- Nikkari S.T., O'Brien K.D., Ferguson M., et al. (1995). Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation*. 92 (6): 1393-8.
- Novick D., Kim S.H., Fantuzzi G., et al. (1999). Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity*. 10 (1): 127-36.
- Pasterkamp G., Schoneveld A.H., Hijnen D.J. et al. (2000). Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis*. 150 (2): 245-53.
- Paul W.E., Seder R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 76 (2): 241-51.
- Podrez E.A., Febbraio M., Sheibani N., et al. (2000). Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *Journal of Clinical Investigation*. 105 (8): 1095-108.
- Raisanen-Sokolowski A., Glysing-Jensen T., Koglin J., et al. (1998). Reduced transplant arteriosclerosis in murine cardiac allografts placed in interferon-gamma knockout recipients. *American Journal of Pathology*. 152 (2): 359-365.
- Raisanen-Sokolowski A., Glysing-Jensen T., Mottram P.L., et al. (1997). Sustained anti-CD4/CD8 treatment blocks inflammatory activation and intimal thickening in mouse heart allografts. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 17 (10): 2115-22.

- Rajavashisth T.B., Andalibi A., Territo M.C., et al. (1990). Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*. 344 (6263): 254-7.
- Rajavashisth T.B., Xu X.P., Jovinge S., et al. (1999). Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation*. 99 (24): 3103-9.
- Rao A., Luo C., Hogan P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual Review of Immunology*. 15: 707-47.
- Ridker P.M., Cushman M., Stampfer M.J., et al. (1997). Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *New England Journal of Medicine*. 336 (14): 973-9.
- Ridker P.M., Hennekens C.H., Buring J.E., et al. (2000). C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in woman. *New England Journal of Medicine*. 342 (12): 836-43.
- Romagnani S. (2000). T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 85 (1): 9-21.
- Romagnani S. (1999). Th1/Th2 cells. *Inflammatory Bowel Diseases*. 5 (4): 285-94.
- Romagnani S. (1994). Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annual Review of Immunology*. 12:227-57.
- Romagnani S. (1991). Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunology Today*. 12 (8): 256-7.

- Ross R. (1999). Atherosclerosis – An inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*. 340 (2): 115-26.
- Ross R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 362 (6423): 801-9.
- Ross R. (1986). The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *New England Journal of Medicine*. 314 (8): 488-500.
- Ross R., Glomset J.A. (1976). The pathogenesis of atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*. 295 (7): 369-77.
- Schonbeck U., Mach F., Sukhova G.K., et al. (1997). Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circulation Research*. 81 (3): 448-54.
- Schonbeck U., Sukhova G.K., Shimizu K., et al. (2000). Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97 (13): 7458-63.
- Schumacher M., Halwachs G., Tatzber F., et al. (1997). Increased neopterin in patients with chronic and acute coronary syndromes. *Journal of the American College of Cardiology*. 30 (3): 703-7.
- Shah P.K., Falk E., Badimon J.J., et al. (1995). Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation*. 92 (6): 1565-9.

- Shih P.T., Brennan M.L., Vora D.K., et al. (1999). Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circulation Research*. 84 (3): 345-51.
- Shimoda K., van Deursen J., Sangster M.Y., et al. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*. 380 (6575): 630-3.
- Springer T.A., Cybulsky M.I. Traffic signals on endothelium for leukocytes in health, inflammation, and atherosclerosis. In: Fuster V., Ross R., Topol E.J., eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 511-38.
- Stary H.C., Chandler A.B., Glagov S., et al. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 89 (5): 2462-78.
- Stemme S., Faber B., Holm J., et al. (1995). T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92 (9): 3893-7.
- Suzuki H., Kurihara Y., Takeya M., et al. (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*. 386 (6622): 292-6.
- Syrbe U., Siveke J., Hamann A. (1999). Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? *Springer Seminars in Immunopathology*. 21 (3): 263-85.

- Szabo S.J., Glimcher L.H., Ho I.C. (1997). Genes that regulate interleukin-4 expression in T cells. *Current Opinion Immunology*. 9 (6): 776-81.
- Tontonoz P., Nagy L., Alvarez J.G., et al. (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 93 (2): 241-52.
- Toschi V., Gallo R., Lettino M., et al. (1997). Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 95 (3): 594-9.
- Uzui H., Harpf A., Liu M., et al. (2002). Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation*. 106 (24): 3024-30.
- Van der Wal A.C., Piek J.J., de Boer O.J., et al. (1998). Recent activation of the plaque immune response in coronary lesions underlying acute coronary syndromes. *Heart*. 80 (1): 14-8.
- Virchow R. Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem. In: Virchow R., ed. *Gesammelte Abhandlungen Zur Wissenschaftlichen Medizin*. Berlin: Meldinger Sohn, 1856: 458-63.
- Wick G., Romen M., Amberger A., et al. (1997). Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue. *FASEB Journal*. 11 (13): 1199-207.
- Woessner J.F. Jr. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB Journal*. 5 (8): 2145-54.

Xu X.P., Meisel S.R., Ong J.M., et al. (1999). Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*. 99 (8): 993-8.

Yla-Herttuala S., Palinski W., Rosenfeld M.E., et al. (1989). Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *Journal of Clinical Investigation*. 84 (4): 1086-95.

Zheng W., Flavell R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 89 (4): 587-96.

Zhou X., Nicoletti A., Elhage R., et al. (2000). Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation*. 102 (24): 2919-22.

Zhou X., Stemme S., Hansson G.K. (1996). Evidence for a local immune response in atherosclerosis. CD4+ cells infiltrate lesions of apolipoprotein-E-deficient mice. *American Journal of Pathology*. 149 (2): 359-66.

Legenden

Abbildung 1 „Response to injury“ Theorie	6
Abbildung 2 Beteiligung von Immunzellen	11
Abbildung 3 Entwicklung der T-Helfer-Zellen – Aktivierung und Differenzierung	16
Abbildung 4 Th1-Effektorfunktionen	18
Abbildung 5 Th2-Effektorfunktionen	20
Abbildung 6 Regulation der T-Helfer-Subpopulationen	21
Abbildung 7 Darstellung und Auswertung der 3-Farben-Durchflusszytometrie: Links oben: Darstellung nach Größe im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht; Erfassen der Lymphozyten Links unten: Erfassen der CD3 ⁺ Zellen im CD3-Gate Rechts: Erfassen des Anteils an IL-4 ⁺ und IFN- γ ⁺ Zellen unter den CD3 ⁺ Zellen im Zytokindotplot	37
Abbildung 8 Vergleich der mRNS-Transkriptionslevel von IFN- γ	45
Abbildung 9 Vergleich der mRNS-Transkriptionslevel von IL-2	46

Abbildung 10	47
Vergleich der mRNA-Transkriptionslevel von STAT4	
Abbildung 11	48
Vergleich der mRNA-Transkriptionslevel von IL-4	
Abbildung 12	49
Vergleich der mRNA-Transkriptionslevel von IL-10	
Abbildung 13	50
Vergleich der mRNA-Transkriptionslevel von STAT6	
Abbildung 14	51
Beispiele der FACS-Analyse aus den einzelnen Kollektiven	
Abbildung 15	52
Vergleich der Aktivierung von Th1-Zellen (IFN- γ^+ /CD3 $^+$ Zellen)	
Abbildung 16	53
Vergleich der Aktivierung von Th2-Zellen (IL-4 $^+$ /CD3 $^+$ Zellen)	
Abbildung 17	54
Vergleich der Aktivierung von Th0-Zellen (IFN- γ^+ /IL-4 $^+$ /CD3 $^+$ Zellen)	
Abbildung 18	56
Vergleich der Th1-Aktivierung mit Serummarkern der Myokardschädigung	
Abbildung 19	57
Vergleich der Serum-Konzentrationen von MMP-9	
Abbildung 20	58
Vergleich der Serum-Konzentrationen von TIMP-1	

Abbildung 21	59
Vergleich der MMP-9/TIMP-1-Ratio	
Tabelle 1	22
Einige prototypische pathophysiologische Zustände, die durch eine dominierende Th1- oder Th2-Antwort charakterisiert sind (Romagnani 2000)	
Tabelle 2	43
Charakterisierung der Patientenkollektive	

Danksagungen

In der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Großhadern war ich als Doktorand in der Arbeitsgruppe „Arteriosklerose und Immunologie“ unter der Leitung von Herrn PD Dr. med. J. Koglin tätig. Als wissenschaftlicher Lehrer hat er mich an die medizinische Forschung herangeführt und mich mit dem nötigen Werkzeug zum wissenschaftlich-experimentellen Arbeiten ausgestattet. In jeder Phase der Arbeit hat er mich durch kritische Reflexion und neuen Anregungen unterstützt und begleitet und die Dissertation vorange-
trieben.

Herrn PD Dr. med. J. Koglin als meinem Doktorvater und Mentor und gleichzeitig persönlichem Freund bin ich zu großem Dank verpflichtet, denn ohne ihn wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. med. H. Methe verdanke ich die sehr gute und konstruktive Zusammenarbeit und Betreuung in der Arbeitsgruppe. Er hat in großem Maße dazu beigetragen, molekularbiologische Methoden zu verstehen und zu erlernen. Durch seine zahlreichen Hilfestellungen hat er mich bei der Fertigstellung der Arbeit unterstützt.

Frau Daniela Wiegand und Frau Cornelia Grimm gebührt mein Dank für die große Hilfsbereitschaft und Geduld bei der Durchführung der Versuche im Labor. Sie standen mir bei der Arbeit stets zur Seite und haben mir immer eine sehr nette Arbeitsatmosphäre geboten.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. G. Steinbeck als Direktor der Medizinischen Klinik I am Klinikum Großhadern, der meiner Arbeitsgruppe einen reibungslosen Ablauf ermöglicht hat.

Schließlich möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern und meinem Bruder danken. Mit viel Liebe und Geduld haben sie mich stets dabei unterstützt,

meine Ziele zu verfolgen. Ohne meine Familie wäre das Medizinstudium und diese Dissertation für mich nicht denkbar gewesen.

Lebenslauf

Name Brunner, Stefan Max

Heimatadresse Ammerseestr. 2, 95445 Bayreuth
Tel.: 0921/45485

Studienadresse Kaulbachstr. 29, 80539 München
Tel.: 089/23862655
Mobil: 0160/94967285

E-Mail-Adresse StefanBrunner@web.de

Geburtstag und -ort 25. August 1977 in Bayreuth

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand ledig

Bekenntnis röm.-katholisch

Eltern Brunner Hans, Lehrer
Brunner Maria, kaufm. Angestellte

Geschwister Brunner Markus, Dr. iur. can., kath. Priester

Schulbildung

1983 - 1987	Volksschule Meyernberg, Bayreuth
1987 - 1992	Graf-Münster-Gymnasium, Bayreuth
1992 - 1996	Gymnasium Christian-Ernestinum, Bayreuth

Studium

1997 - 2000	Medizinstudium an der Universität Leipzig
2000 - 2004	Medizinstudium an der LMU München

Abgeschlossene Prüfungen

1996	Abitur (Gymnasium Christian-Ernestinum, Bayreuth)
1999	Physikum (Universität Leipzig)
2001	1. Staatsexamen (LMU München)
2003	2. Staatsexamen (LMU München)
2004	3. Staatsexamen (LMU München)

Praktische Erfahrungen

1996 - 1997	Zivildienst in der Unfallchirurgie und in der Notaufnahme im Klinikum Bayreuth
2000	Famulatur in der Kardiologie im Deutschen Herzzentrum München
2000	Famulatur in der Allgemeinmedizinischen Praxis Dr. Steber in Mindelheim
2001	Famulatur in der Unfallchirurgie im Klinikum Bayreuth
2001	Famulatur in der Herz- und Gefäßchirurgie im Texas Heart Institute in Houston/USA
2002	Famulatur in der Gynäkologie in der Universitäts-Frauenklinik der LMU München
2002	Famulatur in der Sportorthopädie an der TU München
Praktisches Jahr:	
2003	Gastroenterologie und Rheumatologie an der New York University Medical School in New York/USA
2003	Pulmologie und Notfallmedizin an der Harvard Medical School in Boston/USA
2003	Allgemein-, Gefäß- und Unfallchirurgie im Klinikum Traunstein
2003/2004	Orthopädie im Universitätsklinikum Großhadern in München

Stipendien

2001	Reisestipendium des Deutschen Familienaustausches (dfa)
2003	Auslandsstipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD)
2001-2004	Stipendium der Hans-Rudolf-Stiftung

Publikationen

Abstracts:

Koglin J, Methe H, Brunner S, Wiegand D, von Scheidt W. Aktivierung IFN- γ Th1 Lymphozyten als früher Marker eines akuten Koronarsyndroms. Z Kardiol 2001 (Suppl 2); 90: 36

Koglin J, Methe H, Brunner S, Wiegand D, von Scheidt W. Expansion of interferon-producing Th1 lymphocytes as a mechanism of progression in acute coronary syndromes. J Am Coll Cardiol 2001; 37: 317A

Methe H, Brunner S, Koglin J. Die Bedeutung des Matrix Metalloproteinase Systems für die Progression akuter Koronarsyndrome. Z Kardiol 2002; 91 (Suppl 1): 318

Koglin J, Brunner S, Methe H. Activation of circulating IFN- γ ⁺ Th1 lymphocytes as an early marker of acute coronary syndromes. Circulation 2002; 106 (Suppl. II): 3424

Artikel:

Methe H, Brunner S, Wiegand D, Nabauer M, Koglin J, Edelman ER. T-helper-1 lymphocyte activation patterns as early bio-markers of unstable angina pectoris. *Submitted to J Am Coll Cardiol*