

# **Die Rolle von sCD40L beim akuten Koronarsyndrom**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Benedikt Molitor

aus Haltern am See

Gießen 2013

**Aus dem Zentrum für Innere Medizin**

**- Medizinische Klinik I -**

**Abteilung für Kardiologie und Angiologie**

**(Komm. Leiter: Prof. Dr. med. Chr. Hamm)**

**Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH**

**Standort Gießen**

Gutachter: Prof. Dr. M. C. Heidt

Gutachter: Prof. Dr. Chr. Hamm

Tag der Disputation: 15.05.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie und ökonomische Bedeutung	1
1.2 Atherosklerose	2
1.2.1 Überblick über Ätiologie, Pathogenese und Risikofaktoren	2
1.2.2 Stadien der Atherosklerose	4
1.3 Das akute Koronarsyndrom	6
1.4 Das CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-System	7
1.4.1 Überblick	7
1.4.2 Die Signaltransduktion des CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Systems	10
1.4.3 Zelltyp-spezifische CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Effekte	12
1.4.3.1 CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Effekt und Monozyten/Makrophagen	12
1.4.3.2 CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Effekt und Thrombozyten	13
1.4.3.3 CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Effekt und Endothelzellen	13
1.5 Problemstellung	14
<b>2 Material</b>	<b>15</b>
<b>3 Methoden</b>	<b>16</b>
3.1 Zellisolation und -kultur	16
3.1.1 HUVEC-Isolation	16
3.1.2 HUVEC-Kultivierung	16
3.1.3 Stimulationsexperimente	17
3.2 Molekularbiologische Methoden	17
3.2.1 RNA-Gewinnung und -Vermessung	17
3.2.2 cDNA-Synthese	18
3.2.3 Real-time-PCR	19
3.2.3.1 Hintergrund	19
3.2.3.2 Durchführung der real-time-PCR	21
3.2.3.3 Relative mRNA-Quantifizierung	22
3.2.4 Array-Analyse	23

3.2.5	Macro-Array	24
3.2.5.1	Radioaktive Markierung der cDNA mit [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] dATP	24
3.2.5.2	Array-Hybridisierung	24
3.2.5.3	Array-Auswertung	25
3.2.6	Micro-Array	26
3.2.7	Western Blot	26
3.2.7.1	Hintergrund	26
3.2.7.2	Durchföhrung	27
3.2.8	Quantitative Proteinbestimmung mittels ELISA	28
3.2.9	EMSA	28
3.3	Statistik	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
4.1	Ergebnisse der Macro-Array-Analyse	30
4.2	Ergebnisse der Micro-Array-Analyse	31
4.3	Ergebnisse der real-time-PCR	34
4.3.1	Validierung der Kandidatengene mittels RT-PCR nach Stimulation von HUVEC mit sCD40L	35
4.3.2	Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L föhrt zu einer erhöhten MIP-2 Genexpression	35
4.3.3	Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L föhrt zeitabhängig zu einer erhöhten MIP-2 Genexpression	36
4.3.4	Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L föhrt dosisabhängig zu einer erhöhten MIP-2 Genexpression	37
4.3.5	Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L föhrt zeitabhängig zu einer erhöhten ISGF Genexpression	38
4.3.6	Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L föhrt zeitabhängig zu einer erhöhten IL-8 Genexpression	39
4.3.7	Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L föhrt dosisabhängig zu einer erhöhten IL-8 Genexpression	40
4.3.8	Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L föhrt zeitabhängig zu einer erhöhten MCP-1 Genexpression	41
4.3.9	Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L föhrt nahezu dosisunabhängig zu einer erhöhten MCP-1 Genexpression	43
4.4	Western Blot	44
4.4.1	Aktivierung der p38-MAPK in der CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Signalkaskade nach Stimulation von HUVEC mit sCD40L	44
4.4.2	Die p38-MAPK ist in die CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-	

Signalkaskade involviert	46
4.5 EMSA	47
4.5.1 Der nukleäre Transkriptionsfaktor Kappa B (NF- $\kappa$ B) ist in die CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Signalkaskade involviert	47
4.6 ELISA	48
4.6.1 Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L führt zu einer statistisch signifikant erhöhten MIP-2-Synthese	48
4.6.2 Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L führt zu einer erhöhten IL-8-Synthese	49
4.6.3 Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L führt zu einer erhöhten IL-6-Synthese	50
4.7 Ergebnisse Klinische Proben	51
4.8 Korrelation von sCD40-Ligand-Spiegeln und MIP-2-Spiegeln bei Patienten mit einem ACS	52
<b>5 Diskussion</b>	<b>53</b>
5.1 Verstärkte Genexpression von IL-8, MCP-1, MIP-2 und ISGF nach sCD40L-Stimulation von HUVEC in der real-time-PCR sowie von ISGF und MIP-2 im Micro-Array	54
5.2 Verstärkte Genexpression von VCAM-1, ICAM-1, TRAF1/3/6 und dem tissue factor nach sCD40L-Stimulation von HUVEC im Micro-Array	55
5.3 Verstärkte Expression der Genprodukte MIP-2, IL-6 und IL-8 im ELISA	56
5.4 Die p38-MAPK und der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B sind in die CD40/sCD40L-Signalkaskade involviert	57
5.5 Korrelation von sCD40L-Spiegeln und MIP-2-Spiegeln bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom	58
5.6 sCD40L und der Vorhersagewert für kardiovaskuläre Erkrankungen	59
5.7 Methodische Überlegungen	59
5.8 Medikamentöse Therapie zur Senkung der CD40L-Spiegel	60
5.9 CD40/sCD40L als mögliches therapeutisches Target	61

<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>7 Summary</b>	<b>63</b>
<b>8 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>9 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>10 Diagrammverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>11 Tabellenverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>12 Quellenangaben in numerischer Reihenfolge</b>	<b>67</b>
<b>13 Alphabetisches Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>14 Anhang</b>	<b>86</b>
14.1 Material	86
14.1.1 Zellen	86
14.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze	86
14.1.3 Antikörper, Standards und Chemikalien	87
14.1.4 Primer und Sonden	88
14.1.5 Reagenzien und Materialien	88
14.1.6 Verwendete Lösungen und Gele	90
14.2 Geräte	94
<b>15 Kongressbeiträge</b>	<b>95</b>
<b>16 Erklärung zur Dissertation</b>	<b>96</b>
<b>17 Danksagung</b>	<b>97</b>

# 1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen auf dem Boden einer Atherosklerose sind in diesem Jahrhundert die Haupttodesursache in den Industriestaaten.

Beim akuten Koronarsyndrom wurden von anderen Arbeitsgruppen bereits erhöhte Serumspiegel von sCD40L gemessen, dem Liganden des CD40-Rezeptor/CD40-Ligand-Signaltransduktionsweges<sup>1,2,3</sup>. Wir haben diese Ergebnisse in unseren Messungen unter klinischen Bedingungen bestätigen können und zum Anlass genommen, unter in vitro-Bedingungen humane Endothelzellen aus der Vena umbilicalis (HUVEC) mit sCD40L zu stimulieren. Ziel war es, Änderungen der Genexpression sowie der Genprodukte in Endothelzellen zu erfassen.

## 1.1 Epidemiologie und ökonomische Bedeutung

Im Jahr 2010 verstarben in Deutschland 858.768 Personen. Die häufigste Todesursache der vergangenen Jahrzehnte waren Erkrankungen des Kreislaufsystems bzw. kardiovaskuläre Erkrankungen. Ihnen erlag fast jeder zweite Verstorbene (41,1 %). Zum Vergleich wurde nur bei nahezu jedem vierten Sterbefall (24,5 %) eine Neubildung als Todesursache festgestellt<sup>4</sup>. Innerhalb der Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen machten allein die chronische ischämische Herzkrankheit (20 %) und der akute Myokardinfarkt (16 %) einen Anteil von 36 % aus.

Natürlich erlangt die Atherosklerose auch erhebliche Bedeutung bezüglich ihrer nicht tödlichen Folgeerkrankungen. Im Jahr 2010 entstanden in Deutschland nach der Krankheitskostenrechnung des Statistischen Bundesamtes durch kardiovaskuläre Erkrankungen Kosten von 35,2 Mrd. Euro. Dies entsprach rund einem Siebtel oder 14 % der gesamten Krankheitskosten im Jahr 2010 in Höhe von 252,8 Mrd. Euro<sup>5</sup>.

---

<sup>1</sup> Antoniadis C., Tousoulis D., Vasiliadou C., Stefanadi E., Marinou K. and Stefanadis C., Genetic polymorphisms of platelet glycoprotein Ia and the risk for premature myocardial infarction: effects on the release of sCD40L during the acute phase of premature myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 47 (2006) pp. 1959-1966

<sup>2</sup> Ming Wang, Yan Li, Wen Li, Zun-en Xia and Qing Wu. *DNA and Cell Biology*. March 2011, 30(3): 173-178.

<sup>3</sup> Tousoulis D., Antoniadis C. and Stefanadis C., Assessing inflammatory status in cardiovascular disease. *Heart*, 93 (2007), pp. 1001-1007

<sup>4</sup> Statistisches Bundesamt Deutschland, Wiesbaden. Todesursachenstatistik 2010

<sup>5</sup> Statistisches Bundesamt Deutschland, Wiesbaden. Krankheitskostenstatistik 2010

## 1.2 Atherosklerose

Die Atherosklerose (athero = griech. „Schleim, Kleister“; skleros = griech. „hart“) ist laut WHO-Definition eine variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen („Plaques“) von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut- und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia<sup>6</sup>.

### 1.2.1 Überblick über Ätiologie, Pathogenese und Risikofaktoren

Die primäre Atherosklerose ist bislang unbekannter Ätiologie. Chronische physikalische, metabolische und entzündliche Noxen führen bei der sekundären Form der Atherosklerose zu Gefäßwandschäden und später konsekutiv zu einem sklerosierenden Gefäßwandumbau.

Das Verständnis der Pathogenese des atherosklerotischen Prozesses als eine Ablagerung von Proteinen und Lipoproteinen hat sich durch viele Studien in den letzten Jahren erweitert; heutzutage muss die Atherosklerose als ein hochkomplexer, dynamischer Prozess betrachtet werden, welcher zusätzlich wesentlich durch eine chronische inflammatorische Reaktion und eine damit verbundene fibroproliferative Antwort der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand charakterisiert ist<sup>7,8</sup> (Abb.1, Seite 3).

Als Risikofaktoren der Atherosklerose haben Nikotinabusus, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Adipositas Hyperlipoproteinämie sowie Geschlecht, Alter und genetische Prädisposition in die Standardliteratur Einzug gehalten. Eine genetische Prädisposition für die Entwicklung einer Atherosklerose führt zu einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen, vor allem schon im jungen Alter<sup>9</sup>. Auch in Zwillingsstudien konnte bestätigt werden, dass die Atherosklerose eine signifikante genetische Komponente besitzt<sup>10,11</sup>. Dabei gibt es einzelne Gene, deren Mutationen

---

<sup>6</sup> Riede U.-N. a. S. H. E., Allgemeine und spezielle Pathologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York, 93 A.D

<sup>7</sup> Maclellan W.A., Wang Y., Lusic A.J., Systems-based approaches to cardiovascular diseases, Nat. Rev. Cardiol. 2012.

<sup>8</sup> Libby P., Inflammation in atherosclerosis, Nature 420 (2002) 868-874

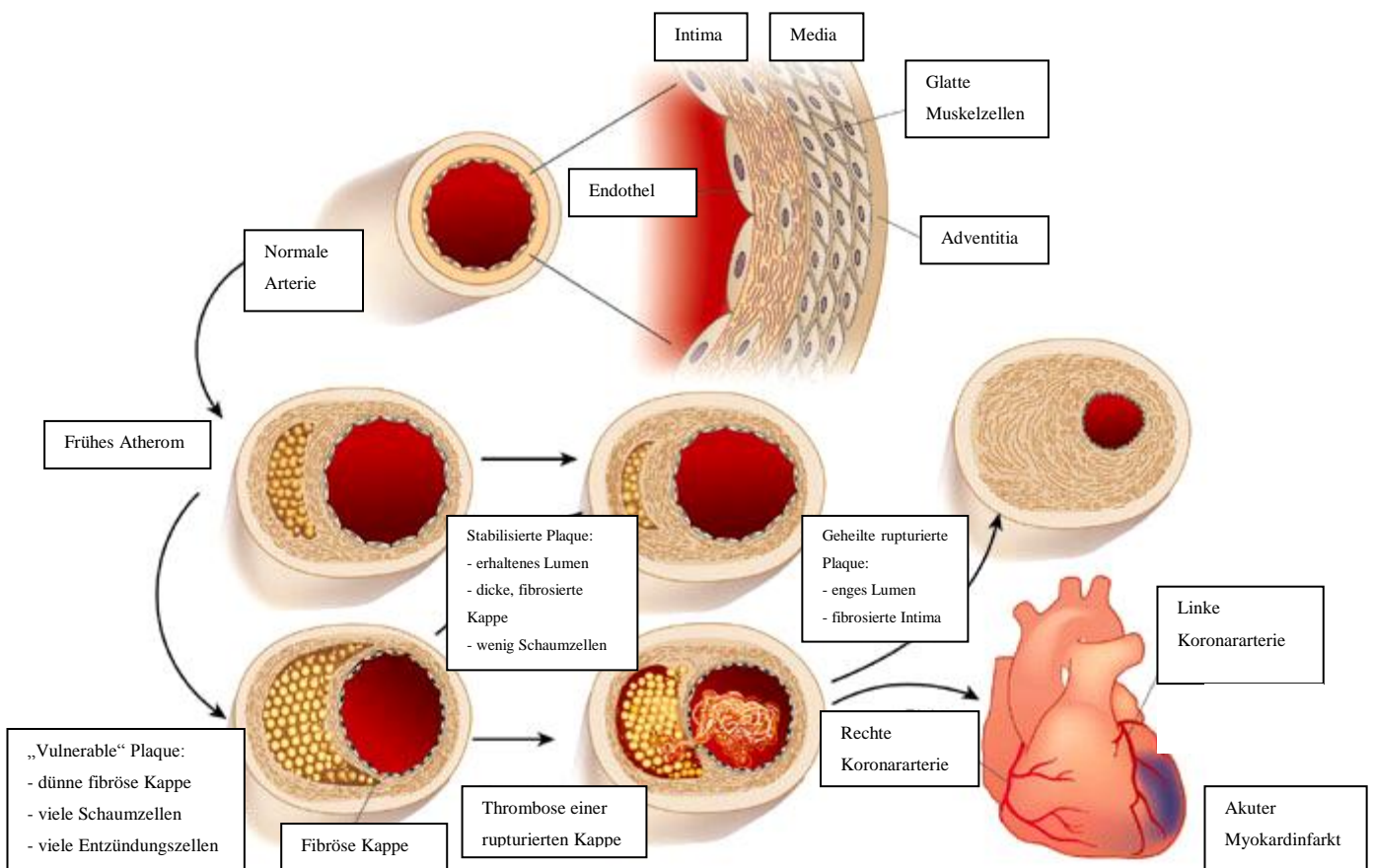
<sup>9</sup> Scheuner M. T., Genetic predisposition to coronary artery disease, Curr.Opin.Cardiol. 16 (2001) 251-260.

<sup>10</sup> Hegele R. A., Candidate genes, small effects, and the prediction of atherosclerosis, Crit Rev.Clin.Lab Sci. 34 (1997) 343-367

<sup>11</sup> Marenberg M. E., Risch N., Berkman L. F., Floderus B., Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins, N.Engl.J.Med. 330 (1994) 1041-1046



große Bedeutung für die Entwicklung einer Atherosklerose haben, wie zum Beispiel die Mutationen im Gen für den LDL-Rezeptor, die eine familiäre Hypercholesterinämie und damit eine frühzeitige Atherosklerose verursachen<sup>12</sup>. Grundsätzlich können genetische Variationen sowohl als prädiagnostisch als auch als protektiv angesehen werden<sup>13</sup>. Die Pathogenität der Risikofaktoren besteht aus einer Entzündungsreaktion mit einer konsekutiv erhöhten Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle und Produktion proinflammatorischer Zytokine<sup>1,14</sup>.



**Abbildung 1: Die Möglichkeiten eines Atheroms<sup>(\*)</sup>**

<sup>12</sup> Asahina M., Mashimo T., Takeyama M., Tozawa R., Hashimoto T., Takizawa A., Ueda M., Aoto T., Kuramoto T., Serikawa T., Hypercholesterolemia and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor mutant rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012

<sup>13</sup> Miserez A. R. and Braun J. R., Application of genetic principles to the causal assessment of atherosclerosis, *Ther.Umsch.* 52 (1995) 835-843.

<sup>14</sup> Pamukcu B., Lip G.Y., Snezhitskiy V., Shantsila E., The CD40-CD40L System in cardiovascular disease, *Ann. Med.* 2011Aug; 43(5):331-340

<sup>(\*)</sup> modifiziert nach <sup>8</sup> Libby P., Inflammation in atherosclerosis, *Nature* 420 (2002) 868-874

Abbildung 1 (Seite 3) zeigt zunächst den dreischichtigen Gefäßwandaufbau einer Koronararterie. Es ist zu erkennen, dass der innersten Schicht, der Intima, noch die mit dem Blutvolumen in direktem Kontakt stehende einlagige Endothelzellschicht aufliegt. Diese besitzt beim gesunden Erwachsenen keine adhäsiven oder thrombotischen Eigenschaften. Die Intima besteht aus einzelnen glatten Muskelzellen, eingebettet in extrazelluläre Matrix. Die Media hingegen ist durch eine deutlich dichtere Schichtung glatter Muskelzellen charakterisiert, diese liegen in einer elastin- und kollagenreichen Matrix. Die Adventitia ist eine Schicht aus Bindegewebe und verschiedenen Zellen, welche die Grenzfläche zwischen dem Gefäß und dem umliegenden Gewebe bilden. Des Weiteren sind unterschiedliche, im Wesentlichen von der Struktur der Deckplatte ("fibrous cap") abhängige Ereignisse der Atherosklerose dargestellt.

## 1.2.2 Stadien der Atherosklerose

Den Auftakt der Atherogenese stellt die durch die beschriebenen „klassischen“ Risikofaktoren ausgelöste Schädigung des Endothels dar. Sie führt zur sogenannten endothelialen Dysfunktion<sup>15,16</sup>. Die gesteigerte Permeabilität der Endothelzellen für Lipoproteine und andere zirkulierende Substanzen führt zur sukzessiven Ausbildung unterschiedlicher Adhäsionsmoleküle wie z.B. Selektinen (P-Selectin, E-Selectin), Integrinen und zellulären Adhäsionsmolekülen (CAMs, z. B. VCAM-1, ICAM-1). Die Expression von Selektinen vermittelt zunächst den temporären Kontakt ("rolling") bestimmter Blutzellen wie Monozyten und T-Lymphozyten mit dem Endothel und ebnet den Weg bis hin zur Integrin- und Adhäsionsmolekül-vermittelten festen Anheftung an die Gefäßwand<sup>17,18,8</sup>. Allerdings führen auch hämodynamische Belastungen, z.B. in Form von Scherkräften an Gefäßabzweigungen, zu einer verminderten Bildung von endothelalem Stickoxid (NO)<sup>19</sup> und tragen somit zu einem

---

<sup>15</sup> Ross R. and Glomset J. A., The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts), N.Engl.J.Med. 295 (1976) 369-377

<sup>16</sup> Ross R. and Glomset J. A., The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts), N.Engl.J.Med. 295 (1976) 420-425

<sup>17</sup> Hansson G. K., Immune mechanisms in atherosclerosis, Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 21 (2001) 1876-1890

<sup>18</sup> Glass C. K. and Witztum J. L., Atherosclerosis, The road ahead, Cell 104 (2001) 503-516

<sup>19</sup> Topper J. N., Cai J., Falb D. and Gimbrone M. A. Jr., Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93 (1996) 10417-10422

Mangel dieser gefäßerweiternden und zugleich antiinflammatorischen Substanz bei<sup>20</sup>. Zusätzlich werden durch den "laminar shear stress" vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert<sup>21</sup>.

Nach Migration der adhärenen Monozyten in die Intima differenzieren sich diese in Gewebsmakrophagen und können modifizierte Lipoproteinpartikel z. B. über die Ausbildung von Scavenger Rezeptoren oder durch Phagozytose aufnehmen<sup>22,8</sup>. Diese wegen des mikroskopischen Erscheinungsbildes zytoplasmatischer Fetttropfen so genannten Schaumzellen sind das charakteristische Merkmal der frühen atherosklerotischen Läsion ("fatty streak")<sup>21</sup>.

Die Akkumulation von Makrophagen, T-Lymphozyten und einwandernden glatten Muskelzellen in Verbindung mit Apoptose von Zellen und weiterer Lipidaufnahme führt zur Bildung eines nekrotischen Kerns in der Läsion<sup>23,24</sup>. Ein weiteres Charakteristikum dieser Phase ist die Ausbildung der fibrösen Kappe, die das zirkulierende Blut und die atherosklerotische Plaque voneinander trennt. Die Stärke und der Kollagengehalt der fibrösen Kappe korrelieren positiv mit ihrer biomechanischen Stabilität<sup>25,26</sup>. Verschiebt sich das Verhältnis zwischen Stabilisierung und Degradierung zu Gunsten der Ausdünnung der fibrösen Kappe, führt dies zu einer erhöhten Rupturgefahr mit den bekannten klinischen Folgen der Thrombusformation mit Entwicklung einer instabilen Angina pectoris oder des akuten Myokardinfarktes (Abb.1, Seite 3), zusammenfassend akutes Koronarsyndrom genannt. Wenn unter oft nur geringer Belastung die endotheliale Deckplatte einreißt und der instabile atherosklerotische Plaque aufbricht, tritt das lipidreiche und hochgradig thrombogene Material in Kontakt mit dem strömenden Blut und löst dort unmittelbar eine lokale Thrombose aus.

---

<sup>20</sup> De C. R., Libby P., Peng H. B., Thannickal V. J., Rajavashisth T. B., Gimbrone M. A. Jr., Shin W. S and Liao J. K., Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines, *J.Clin.Invest* 96 (1995) 60-68

<sup>21</sup> Nagel T., Resnick N., Atkinson W. J., Dewey C. F. and Gimbrone M. A. Jr., Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells, *J.Clin.Invest* 94 (1994) 885-891

<sup>22</sup> Hansson G. K., Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, *N.Engl.J.Med.* 352 (2005) 1685-1695

<sup>23</sup> Ross R., Atherosclerosis – an inflammatory disease, *N.Engl.J.Med.* 340 (1999) 115-126

<sup>24</sup> Eo H.S., Lee K.B., Kim A.K., Kim M.H., Kim D.H., Kim D.I., Association with inflammatory cells and apolipoproteins to the progression of atherosclerosis. *J Korean Surg Soc.* 2011 Apr;80(4):289-296

<sup>25</sup> Schwartz S. M., Virmani R. and Rosenfeld M. E., The good smooth muscle cells in atherosclerosis, *Curr.Atheroscler.Rep.* 2 (2000) 422-429.

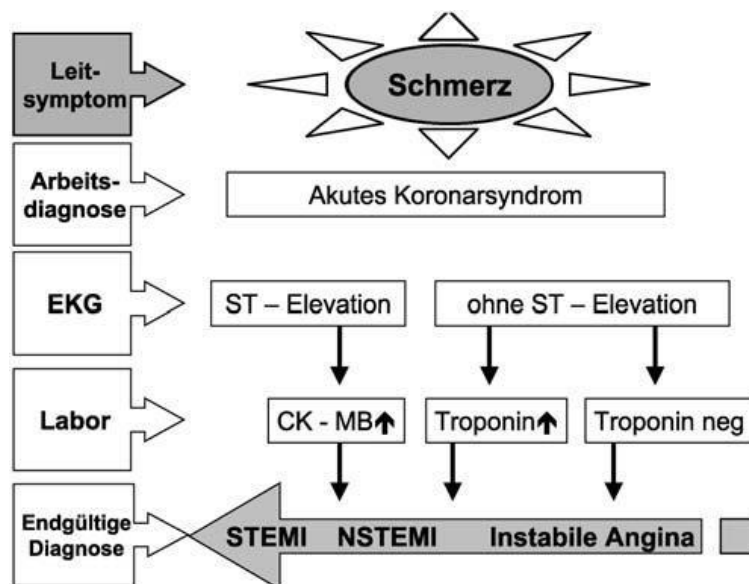
<sup>26</sup> Heeschen C., Dimmeler S., Hamm C. W., van den Brand M. J., Boersma E., Zeiher A. M. and Simoons M. L., Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes, *N.Engl.J.Med.* 348 (2003) 1104-1111.

### 1.3. Das akute Koronarsyndrom

Der Begriff „akutes Koronarsyndrom“ („Acute Coronary Syndrome“, ACS) fasst drei Krankheitsbilder zusammen:

- instabile Angina pectoris (instabile AP)
- Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt (NSTEMI) und
- ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI)

Es zeigen sich fließende Übergänge dieser drei Krankheitsbilder. Ihre gemeinsame pathophysiologische Grundlage ist die durch entzündliche Prozesse initiierte Ruptur oder Erosion einer instabilen Plaque in einem Koronargefäß, welche dann zur Aktivierung des Gerinnungssystems und zur Freisetzung vasoaktiver Substanzen führt und eine akute oder subakute Reduktion der myokardialen Sauerstoffbereitstellung nach sich zieht (Abb. 2).



**Abbildung 2: Terminologie Akutes Koronarsyndrom (nach Hamm, C.W.)<sup>27</sup>**

Die Abbildung zeigt als erstes diagnostisches Mittel das Elektrokardiogramm. Findet sich hier eine ST-Streckenhebung („ST-Elevation“), lautet die Diagnose bei erhöhten Herzenzymen ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI). Ist keine ST-Streckenhebung im EKG erkennbar, dient der Nachweis der Herzenzyme der Diagnosefindung. Entweder lautet diese dann Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt (NSTEMI) oder instabile Angina pectoris. Die europäische Gesellschaft für Kardiologie publizierte aktuell neue

<sup>27</sup> Hamm, C. W., Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS), Z Kardiol 93: 72-90 (2004)

Leitlinien zum Management eines akuten Myokardinfarktes mit einem NSTEMI<sup>28</sup> und mit einem STEMI<sup>29</sup>

## 1.4 Das CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-System

### 1.4.1 Überblick

Die ersten Publikationen über dieses Rezeptor-/Ligand-System gehen auf die frühen 80er Jahre zurück<sup>30,31</sup> und sind in einem immunhistochemischen Zusammenhang erschienen. Die Expression eines auf der Oberfläche von B-Lymphozyten entdeckten, 50 kDa schweren Moleküls variierte mit dem Aktivierungsstatus der B-Lymphozyten bzw. unter Stimulation durch einen noch unbekanntem Liganden, der die Differenzierung der Zellen induzierte. Spätere Studien zeigten die wichtige Rolle des zur Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Superfamilie gehörenden CD40-Rezeptors bei der T-Zell-abhängigen B-Zellaktivierung, -proliferation und -differenzierung<sup>32,33</sup>. Er dient damit als ein Startermolekül bei der humoralen Abwehr<sup>34,35</sup>. Der Typ-I-Transmembranrezeptor besteht aus drei Monomeren, die nach Bindung des Liganden trimerisiert werden, wodurch der intrazelluläre Signalübertragungsweg ausgelöst wird<sup>36</sup>. CD40-Ligand (manchmal als CD154, früher als gp39 oder TRAP bezeichnet) ist ein 33 kDa schweres Typ-II-Transmembranprotein, gehört zur TNF-Familie und bildet wie

<sup>28</sup> Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J.* 2011;32:2999–305

<sup>29</sup> Steg PG, James SK, Atar D, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting with ST-segment elevation *Eur Heart J.* 2012 Oct; 33(20):2569-619.

<sup>30</sup> Paulie S., Ehlin-Henriksson B., Mellstedt H., Koho H., Ben-Aissa H. and Perlmann P., A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes, *Cancer Immunol.Immunother.* 20 (1985) 23-28

<sup>31</sup> Paulie S., Koho H., Ben-Aissa H., Hansson Y., Lundblad M. L. and Perlmann P., Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. II. Identification of the cellular target structures by immunoprecipitation and SDS-PAGE analysis, *Cancer Immunol.Immunother.* 17 (1984) 173-179

<sup>32</sup> Robertson A.K., Hansson G.K.: 2006. T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2421-2432.

<sup>33</sup> Anand S. X., Viles-Gonzalez J. F., Badimon J. J., Cavusoglu E. and Marmur J. D., Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease, *Thromb.Haemost.* 90 (2003) 377-384

<sup>34</sup> Schonbeck U., Mach F., and Libby P., CD154 (CD40 ligand), *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 32 (2000) 687-693

<sup>35</sup> Stumpf C., Lehner C., Eskafi S., Raaz D., Yilmaz A., Ropers S., Schmeisser A., Ludwig J., Daniel W. G. and Garlich C. D., Enhanced levels of CD154 (CD40 ligand) on platelets in patients with chronic heart failure, *Eur.J.Heart Fail.* 5 (2003) 629-637

<sup>36</sup> Schonbeck U., Sukhova G. K., Shimizu K., Mach F. and Libby P., Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000) 7458-7463

alle Mitglieder dieser Familie Trimere aus drei identischen Untereinheiten, durch welche die Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren vermittelt wird<sup>32</sup>.

Zunächst wurde der CD40-Ligand in unabhängigen Studien nur im Zusammenhang mit der Aktivierung der CD4-positiven T-Helferzellen beschrieben<sup>37,38,39,40,41</sup>. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass sich 95 % des im Blut zirkulierenden CD40-Liganden in Thrombozyten befinden<sup>42,43</sup>. In Lymphozyten können zwei Formen vorliegen, eine zellgebundene Form (CD40L) mit einem Molekulargewicht von 39 kDa sowie verschiedene lösliche Formen (sCD40L) mit einem Molekulargewicht von 31, 18 und 14 kDa<sup>44,45,46</sup>. In weiteren Studien zeigte sich die 18 kDa schwere Form des sCD40L als die funktionale und biologisch aktive, somit weist sCD40L in diesem Falle Zytokin-Eigenschaften auf<sup>41,42,47</sup>.

Schönbeck und Libby zeigten, dass der CD40-Rezeptor und sein Ligand auf vielen, nicht nur immunkompetenten Zellen exprimiert werden<sup>48</sup>. Nachfolgend sind die unterschiedlichen Zelltypen aufgelistet.

---

<sup>37</sup> Armitage R. J., Fanslow W. C., Strockbine L., Sato T. A., Clifford K. N., Macduff B. M., Anderson D. M., Gimpel S. D., vis-Smith T., Maliszewski C. R., Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40, *Nature* 357 (1992) 80-82

<sup>38</sup> Hollenbaugh D., Grosmaire L. S., Kullas C. D., Chalupny N. J., Braesch-Andersen S., Noelle R. J., Stamenkovic I., Ledbetter J. A. and Aruffo A., The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity, *EMBO J.* 11 (1992) 4313-4321

<sup>39</sup> Lederman S., Yellin M. J., Krichevsky A., Belko J., Lee J. J. and Chess L., Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation *J.Exp.Med.* 175 (1992) 1091-1101

<sup>40</sup> Noelle R. J., Roy M., Shepherd D. M., Stamenkovic I., Ledbetter J. A. and Aruffo A., A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (1992) 6550-6554

<sup>41</sup> Graf D., Korthauer U., Mages H. W., Senger G. and Kroczeck R. A., Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells, *Eur.J.Immunol.* 22 (1992) 3191-3194

<sup>42</sup> Andre P., Nannizzi-Alaimo L., Prasad S. K. and Phillips D. R., Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease, *Circulation* 106 (2002) 896-899.

<sup>43</sup> Lievens D., von Hundelshausen P., Platelets in atherosclerosis, *Thromb Haemost.* 2011 Nov 3;106(5):827-838.

<sup>44</sup> Graf D., Muller S., Korthauer U., van K. C., Weise C. and Kroczeck R. A., A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation, *Eur.J.Immunol.* 25 (1995) 1749-1754

<sup>45</sup> Ludewig B., Henn V., Schroder J. M., Graf D. and Kroczeck R. A., Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4+ CD45RA+ T cells with dendritic cells, *Eur.J.Immunol.* 26 (1996) 3137-3143

<sup>46</sup> Wykes M., Poudrier J., Lindstedt R. and Gray D., Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells, *Eur.J.Immunol.* 28 (1998) 548-559

<sup>47</sup> Mazzei G. J., Edgerton M. D., Losberger C., Lecoanet-Henchoz S., Graber P., Durandy A., Gauchat J. F., Bernard A., Allet B. and Bonnefoy J. Y., Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active, *J.Biol.Chem.* 270 (1995) 7025-7028

<sup>48</sup> Schonbeck U. and Libby P., The CD40/CD154 receptor/ligand dyad, *Cell Mol.Life Sci.* 58 (2001) 4-43

**CD40-Rezeptor exprimierende Zelltypen:**

- B-Lymphozyten
- T-Lymphozyten
- CD34 Progenitor-Zellen
- Granulozyten (basophile und eosinophile)
- Monozyten und Makrophagen
- Dendritische (Langerhans) Zellen
- Epithelzellen
- Glatte Muskelzellen (vaskuläre und bronchiale)
- Keratinozyten
- Fibroblasten
- Thrombozyten

**CD40-Ligand exprimierende Zelltypen:**

- T-Lymphozyten
- B-Lymphozyten
- Granulozyten (basophile und eosinophile)
- Mastzellen
- Monozyten und Granulozyten
- Natürliche Killerzellen
- Dendritische (Kupffer) Zellen
- Epithelzellen
- Endothelzellen
- Glatte Muskelzellen
- Thrombozyten

### 1.4.2 Die Signaltransduktion des CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Systems

Die Bindung von CD40-Ligand an den CD40-Rezeptor aktiviert die intrazelluläre Signaltransduktion. Der CD40-Rezeptor besitzt keine eigene Kinase-Domäne, die Kopplung an intrazelluläre Signalübertragungswege erfolgt durch verschiedene TNF-R-assoziierte Faktoren (TRAF). Diese binden an den zytoplasmatischen Schwanz des CD40-Rezeptors und aktivieren anschließend verschiedene second-messenger Systeme<sup>49</sup>. Beispielhaft sei hier die p38-MAP-Kinase erwähnt (Abb. 3, S. 11).

Der p38-MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg ist ein wichtiger Teil der nachgeschalteten Proteinsignalkaskade, welche sich nach Stimulation durch zellulären Stress wie z. B. Entzündungsreaktionen im aktivierten Zustand nachweisen lässt<sup>50</sup>. Die phosphorylierte und somit aktivierte p38-MAP-Kinase wiederum führt zu einer Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren. Hier sei stellvertretend NFκB genannt.

Diese Zusammenhänge treffen gerade auch für Atherom-assoziierte Zelltypen wie Monozyten und Makrophagen zu. Insbesondere die CD40-TRAF6-Interaktion ist für die Aktivierung der proinflammatorischen Src/ERK1/2- und p38MAPK/IKK/NF-κB-Signalkaskade ausschlaggebend, wohingegen CD40-TRAF2/3/5-Interaktionen nicht für die Induktion des entzündlichen Geschehens erforderlich sind<sup>51,52,53</sup>. Allerdings scheint TRAF2 in Endothel- und glatten Muskelzellen für die Aktivierung entzündlicher Signalwege verantwortlich zu sein<sup>54</sup>.

---

<sup>49</sup> Rickert R. C., Jellusova J. and Miletic A. V. (2011), Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. *Immunological Reviews*, 244: 115-133.

<sup>50</sup> Whitmarsh A.J., A central role for p38 MAPK in the early transcriptional response to stress. *BMC Biol.* 2010;8:47

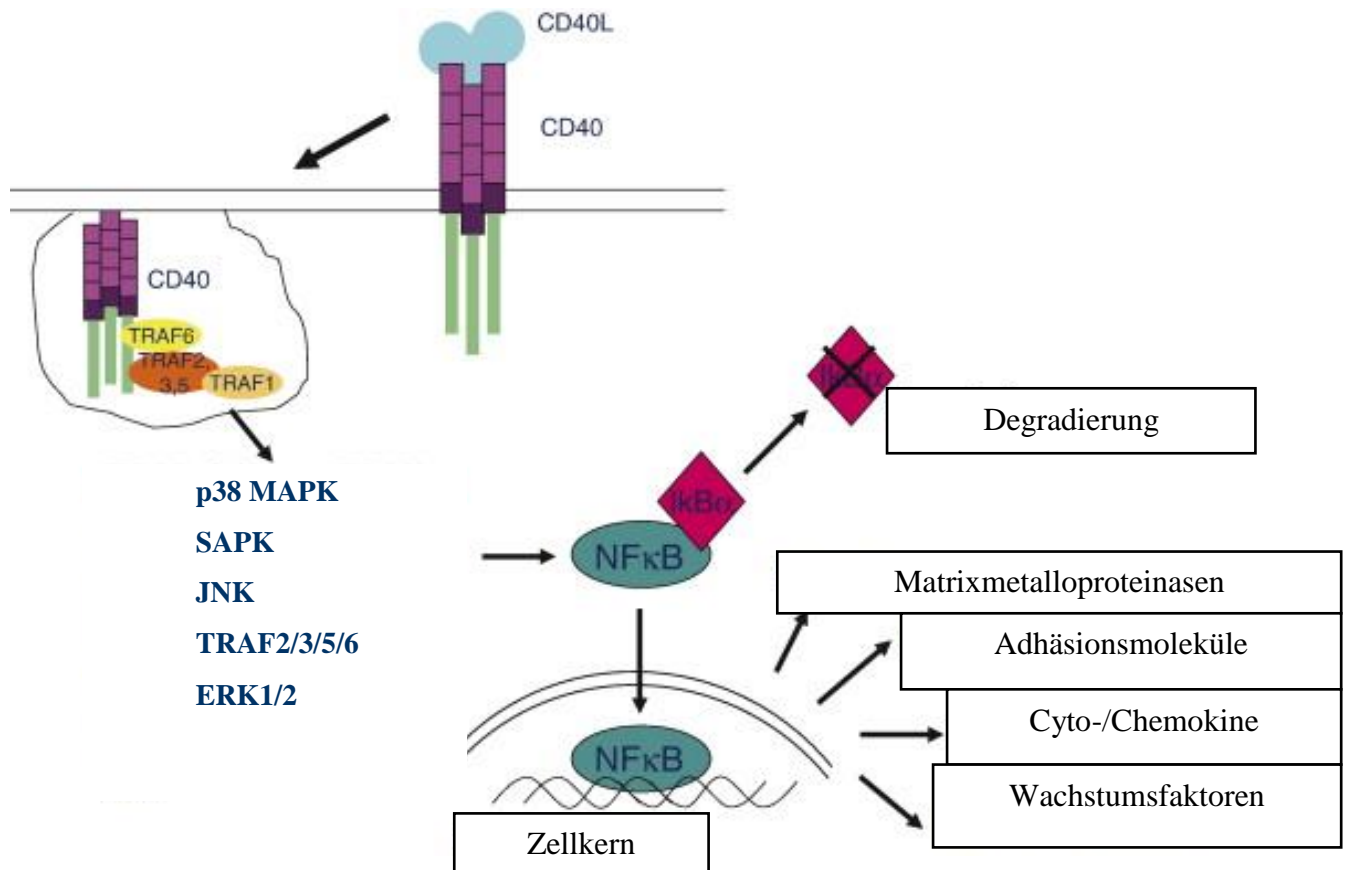
<sup>51</sup> Mukundan L., Milhorn D. M., Matta B. and Suttles J., CD40-mediated activation of vascular smooth muscle cell chemokine production through a Src-initiated, MAPK-dependent pathway, *Cell Signal.* 16 (2004) 375-384

<sup>52</sup> Mukundan L., Bishop G. A., Head K. Z., Zhang L., Wahl L. M. and Suttles J., TNF receptor-associated factor 6 is an essential mediator of CD40-activated proinflammatory pathways in monocytes and macrophages, *J.Immunol.* 174 (2005) 1081-1090

<sup>53</sup> Engel D. et al., The immunobiology of CD154-CD40-TRAF interactions in atherosclerosis. *Semin Immunol* 2009; 21: 308-312.

<sup>54</sup> Xia M., Ling W., Zhu H., Wang Q., Ma J. et al., Anthocyanin prevents CD40-activated proinflammatory signaling in endothelial cells by regulating cholesterol distribution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:519-524





**Abbildung 3: Die Signaltransduktionswege des CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Systems<sup>55</sup>**

Der aktivierte und trimerisierte CD40-Rezeptor wird internalisiert und benötigt für die Aufrechterhaltung des Signaltransduktionsflusses Adaptermoleküle, die TRAFs. Die sich an die TRAF-Bindung anschließenden Prozesse sind sowohl von der TRAF-Bindungsdomäne als auch von der aktivierten Zellart abhängig, mögliche beteiligte Signalwege und deren Mediatoren sind gezeigt. Der wichtigste CD40-medierte Transkriptionsfaktor ist der nukleäre Faktor kappa B (NFκB). Aus der Translokation des NFκB in den Zellkern resultiert die Expression unterschiedlicher, für die Initiierung anderer proinflammatorischer Signalwege wichtiger Mediatoren.

<sup>55</sup> Lutgens E., Lievens D., Beckers L., Donners M., Daemen M., CD40 and its ligand in atherosclerosis. Trends Cardiovasc Med. 2007;17:118-123 (modifiziert)

### 1.4.3 Zelltyp-spezifische CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Effekte

Grundsätzlich induziert die Aktivierung des CD40/CD40L-Signalweges Zellfunktionen, die zu Entzündungsreaktionen beitragen wie z. B. die Aktivierung der Chemokin- und Zytokinsynthese, gesteigerte Expression von Kostimulations- und Adhäsionsmoleküle und auch die Hochregulation proteolytischer Enzyme<sup>53</sup>.

Mehrere Arbeitsgruppen konnten die deutlich veränderte Plaquebiologie bei experimenteller Abwesenheit von CD40L durch die Verwendung von CD40L-Knock-out-Mäusen bzw. bei Behandlung mit CD40L-Antikörpern zeigen. Die Histopathologie atheromatöser Läsionen nach cholesterinreicher Ernährung zeigte sich phänotypisch durch einen statistisch signifikant erhöhten Kollagenanteil und einen deutlich erniedrigten Makrophagen- und T-Lymphozytenanteil: die Charakteristika einer stabilen Plaque ("high in fibrosis, low in inflammation")<sup>56,57,32</sup>.

Im Folgenden sollen die zelltypspezifischen Folgen des CD40-CD40L-Signaltransduktionsweges im Sinne der Entzündungsreaktion, aber auch bezüglich der Plaqueprogression und Destabilisierung dargestellt werden.

#### 1.4.3.1 CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Effekt und Monozyten/Makrophagen

Viele Untersuchungen beschrieben bereits die funktionalen CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Interaktionen zwischen T-Zellen und Monozyten. So führt die Aktivierung über diesen Signalweg bei Monozyten zu einer IL-12- und IL-1 $\beta$ -Sekretion, in großer Zahl in der atherosklerotischen Läsion vorhandene Zytokine<sup>58,59</sup>.

Makrophagen, die durch CD40/CD40L aktiviert wurden, sezernieren neben großen Mengen an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  auch einen der Initiatoren der extrinsischen Blutgerinnungskaskade, den Tissue factor (TF, Faktor III).

---

<sup>56</sup> Mach F., Schonbeck U., Sukhova G. K., Atkinson E. and Libby P., Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling, *Nature* 394 (1998) 200-203

<sup>57</sup> Lutgens E., Cleutjens K. B., Heeneman S., Kotliansky V. E., Burkly L. C. and Daemen M. J., Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000) 7464-7469

<sup>58</sup> Cella M., Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., Lane P., Lanzavecchia A. and Alber G., Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation, *J.Exp.Med.* 184 (1996) 747-752

<sup>59</sup> Peng X., Remacle J. E., Kasran A., Huylebroeck D. and Ceuppens J. L., IL-12 up-regulates CD40 ligand (CD154) expression on human T cells, *J.Immunol.* 160 (1998) 1166-1172

Den durch die CD40/CD40L-Signaltransduktion aktivierten Makrophagen kommt allerdings auch noch eine entscheidende Rolle in der Plaqueprogression und -destabilisierung zu. So sind diese nach Aktivierung in der Lage, Matrixmetalloproteinasen (z. B. MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9) zu synthetisieren und zu sezernieren<sup>60</sup>. Diese sind im Prozess der Degradierung der extrazellulären kollagenen Matrix und damit beim Ausdünnen der fibrösen Plaquekappe wesentlich<sup>61,62</sup>.

#### 1.4.3.2 CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Effekt und Thrombozyten

Die biologische Wirkung von Thrombozyten geht weit über die „klassische“ Funktion durch Formierung eines Thrombus im Rahmen der Blutgerinnung hinaus. Viele Untersuchungen zeigten noch andere wichtige Funktionen in der Initiation des Entzündungsprozesses durch die Ausschüttung sogenannter  $\alpha$ -Granula. Diese enthalten neben verschiedenen „clotting“-Proteinen auch Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren<sup>39,63</sup>.

Henn et al. zeigten, dass von Plättchen ausgeschüttetes sCD40L an Endothelzellen zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsrezeptoren wie E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1, Chemokinen wie MCP-1, IL-6, IL-8 und auch zu einer erhöhten Produktion von Matrixmetalloproteinasen führt<sup>64</sup>.

#### 1.4.3.3 CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Effekt und Endothelzellen

Als direkt mit dem Blut in Kontakt stehende Zellart sind Endothelzellen der Ort der ersten proatherogenen Interaktionen wie zum Beispiel der verstärkten Adhäsion der immunkompetenten Zellen mittels des CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Signalweges. Nach Aktivierung der CD40-Rezeptoren der Endothelzellen durch CD40-Ligand

<sup>60</sup> Mach F., Schonbeck U., Bonnefoy J. Y., Pober J. S. and Libby P., Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor, *Circulation* 96 (1997) 396-399

<sup>61</sup> Thim T., Hagensen M. K., Bentzon J. F. and Falk E., From vulnerable plaque to atherothrombosis, *J.Intern.Med.* 263 (2008) 506-516

<sup>62</sup> Fernández Bello I., Alvarez M.T., López-Longo F.J., Arias-Salgado E.G., Martín M., Jiménez-Yuste V., Rodríguez de la Rúa A., Butta N.V., Platelet soluble CD40L and matrix metalloproteinase 9 activity are proinflammatory mediators in Behcet disease patients, *Thromb Haemost.* 2012 Jan 3;107(1):88-98

<sup>63</sup> Refaai M., Phipps R., Spinelli S., Blumberg N (2011), Platelet transfusions – impact on hemostasis, thrombosis, inflammation, and clinical outcomes. *Thromb Res* 127: 287-291

<sup>64</sup> Henn V., Slupsky J. R., Grafe M., Anagnostopoulos I., Forster R., Muller-Berghaus G. and Kroczyk R. A., CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells, *Nature* 391 (1998) 591-594

exprimieren diese verstärkt verschiedene Zelladhäsionsmoleküle wie VCAM-1, ICAM-1 oder E-selectin und auch Chemokine wie IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 oder TNF- $\alpha$ . Neuere Untersuchungen zeigten, dass auch eine verstärkte Bereitstellung von "reactive oxygen species" (ROS), welche eine lokale Reduktion des Gehaltes an Stickstoffmonoxid (NO) und damit eine endotheliale Dysfunktion nach sich ziehen, durch dieses Rezeptor/Ligand-System an Endothelzellen vermittelt wird<sup>65,66</sup>. Bavendiek et al. zeigten eine erhöhte tissue factor (TF)-Expression von Endothelzellen nach Aktivierung der CD40-Rezeptoren durch sCD40-Ligand<sup>67</sup>. Bezüglich der bereits oben erwähnten intrazellulären Adaptermoleküle im CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Signaltransduktionsweg konnte zudem auch eine erhöhte endotheliale Expression von TRAF-1, -2, -3 und -6 gezeigt werden, nicht jedoch von TRAF-5<sup>49</sup>.

## 1.5 Problemstellung

Mehrere Arbeitsgruppen konnten bisher demonstrieren, dass der CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Signaltransduktionsweg in viele weitere, über den immunologischen Zusammenhang hinausgehende zelluläre Mechanismen involviert ist.

Der soluble CD40-Ligand ist beim akuten Koronarsyndrom im Plasma erhöht. Manche Studien konnten auch einen Zusammenhang zwischen der Höhe des sCD40L-Spiegels und dem Progress des ACS feststellen<sup>68</sup>. Andere Studien konnten sogar sCD40L als unabhängigen prognostischen Marker für ein akutes Koronarsyndrom nachweisen<sup>25</sup>.

In einer aktuelleren Studie wurde sCD40L als einer von sieben Biomarkern in einem kombinierten Biomarker-Modell hinsichtlich des langfristigen kardialen Resultates nach einem akuten Koronarsyndrom ohne ST-Strecken-Hebung (NSTEMI) untersucht<sup>69</sup>.

---

<sup>65</sup> Urbich C., Dernbach E., Aicher A., Zeiher A. M., Dimmeler S., CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species, *Circulation* 106 (2002) 981-986

<sup>66</sup> Cipollone F., Chiarelli F., Davi G., Ferri C., Desideri G., Fazia M., Iezzi A., Santilli F., Pini B., Cuccurullo C., Tumini S., Del P. A., Santucci A., Cuccurullo F. and Mezzetti A., Enhanced soluble CD40 ligand contributes to endothelial cell dysfunction in vitro and monocyte activation in patients with diabetes mellitus: effect of improved metabolic control, *Diabetologia* 48 (2005) 1216-1224

<sup>67</sup> Bavendiek U., Libby P., Kilbride M., Reynolds R., Mackman N. and Schonbeck U., Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1, *J.Biol.Chem.* 277 (2002) 25032-25039

<sup>68</sup> Peng D.Q., Zhao S.P., Li Y.F., Li J. and Zhou H.N., Elevated soluble CD40 ligand is related to the endothelial adhesion molecules in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*, 319 (2002), 19-26

<sup>69</sup> Oemrawsingh RM, Lenderink T, Akkerhuis KM, Heeschen C, Baldus S, Fichtlscherer S, Hamm CW, Simoons ML, Boersma E., Multimarker risk model containing troponin-T, interleukin 10, myeloperoxidase and placental growth factor predicts long-term cardiovascular risk after non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Heart*. 2011;97:1061-1066

Ziel unserer Studie war es deshalb, die Rolle von sCD40L im akuten Koronarsyndrom zu beleuchten.

Neben der in-vivo-Analyse der Blutseren von Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom erfolgte noch in einem weiteren in-vitro-Schritt die Analyse von basalen, Zytokin-induzierten und sCD40L-induzierten Expressionsmustern in HUVEC zunächst auf transkriptionaler und dann auf translationaler Ebene.

In vorliegender Arbeit sollen folgende Aspekte erörtert werden:

- Wie ändert sich das Expressionsmuster von HUVEC nach sCD40L-Stimulation?
- Kann dieses auf mRNA- und Proteinebene nachvollzogen werden?
- Lässt sich von einem veränderten Expressionsmuster auf eine Substanz mit möglichem Biomarker-Potential schließen?

## **2 Material**

Die verwendeten Zellen, Zellkulturmedien und Zusätze, Antikörper, Standards und Chemikalien, Primer und Sonden, Reagenzien und Materialien, Geräte sowie Lösungen und Gele sind aus Übersichtgründen im Anhang, Kapitel 14, aufgeführt.

## 3 Methoden

### 3.1 Zellisolation und -kultur

#### 3.1.1 HUVEC-Isolation

Humane Endothelzellen aus der Vena umbilicalis (HUVEC) wurden nach der Methode von Jaffe et al. aus Nabelschnüren Neugeborener isoliert<sup>70</sup>.

Nach einer Lagerungszeit von maximal 48h bei 4°C in sterilen Bechern wurden diese sorgfältig inspiziert und gesäubert, danach wurde die Nabelschnurvene präpariert. Diese wurde zweimal mit HBSS gespült und anschließend mit 50ml 0,1% (vol/vol) Kollagenaselösung Typ IV infundiert. Nach einer Inkubation über 20 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-haltiger Luft wurden die Zellen durch das Ablassen der Kollagenaselösung und Spülen mit 30ml HBSS in einem Falconröhrchen gesammelt und mit 1ml bereits vorgelegtem FCS gemischt. Diese Zellsuspension wurde durch zehninütiges Zentrifugieren bei 1100 rpm pelletiert, in 12ml Kulturmedium (Basal Medium + 5% FCS + Supplement Pack) resuspendiert und in einer T-75-Kulturflasche ausgesät. Zweimal in der Woche erfolgte ein kompletter Mediumwechsel.

#### 3.1.2 HUVEC-Kultivierung

Nach 4 bis 6 Tagen bzw. bei 70 - 90% Konfluenz der Zellen wurden die Zellen passagiert. Zunächst wurde das Medium abgesaugt, anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 6ml Accutase pro 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche bei 37°C für 10 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Kultivierung in Endothelzell-Basal-Medium (Promocell, Heidelberg), 5% FCS, Supplement Pack (Promocell, Heidelberg), endotheliale Zell-Wachstum-Supplement/Heparin (ECGS/H2), humanem rekombinanten epidermale Wachstumsfaktor (hEGF) (0,05µg/ml), humanem rekombinanten Basis-Fibroblasten-Wachstumsfaktor (hbFG) (0,5 µg/ml), Hydrocortison (HC-500) (500µg/ml) und Amphotericin B (25µg/ml). Es wurden HUVEC in den Passagen 3 - 5 nach Isolation in einer Konzentration von etwa 1x10<sup>6</sup>/ml in 6-Well-Platten überführt.

---

<sup>70</sup> Jaffe E. A., Nachman R. L., Becker C. G. and Minick C. R., Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria, J.Clin.Invest 52 (1973) 2745-2756

### 3.1.3 Stimulationsexperimente

Die Überführung in die 6-Well-Platten fand 48h vor der geplanten Stimulation statt, 24h vor der Behandlung befanden sich diese im Endothelzell-Basal-Medium ohne FCS im sogenannten Hungerzustand. Die Zellen wurden als Positivkontrolle stets mit TNF- $\alpha$  in einer Konzentration von 5ng/ml stimuliert. Zunächst führten wir Versuchsreihen mit einer Konzentration von 1, 5, 10 und 20  $\mu$ g/ml sCD40L und einer Stimulationsdauer von 3h durch, es folgten Zeitreihen mit einer Stimulationszeit von 2, 3, 4, 6 und 8h und einer Konzentration von 10 $\mu$ g/ml sCD40L. Hierbei orientierten wir uns an vorherigen Veröffentlichungen<sup>71,72</sup>. Wir entschieden uns für die Fortführung der Stimulationsexperimente mit einer Konzentration von 10 $\mu$ g/ml sCD40L bei einer Stimulationsdauer von 3h.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 RNA-Gewinnung und -Vermessung

Die RNA-Isolation wurde nach der sauren Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi<sup>73,74</sup> durchgeführt. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit 1ml RNazol lysiert, und die RNA wurde durch Zugabe von 100 $\mu$ l Chloroform extrahiert. Anschließend erfolgten die Ausfällung in Isopropanol, erneutes zweimaliges Waschen mit 70%igem Ethanol, Trocknung und Rücklösung in RNase-freiem H<sub>2</sub>O. Kontaminationen der RNA wurden durch einen DNA-Verdau entfernt. Dafür wurden 75  $\mu$ l RNA-Lösung in 5x Transkriptionspuffer mit 200U RNasin und 20 U RNase-freier Desoxyribonuklease I in einem Endvolumen von 100 $\mu$ l für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die RNA über das RNeasy RNA Kit<sup>®</sup> der Firma Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Reinheit in einem 1%igen Agarosegel (RNA Minigel). Es zeigten sich in allen Proben

<sup>71</sup> Flaxenburg J.A., Melter M., Lapchak P.H., Briscoe D.M., Pal S., The CD40-induced signaling pathway in endothelial cells resulting in the overexpression of vascular endothelial growth factor involves Ras and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol.* 2004;172:7503-7509

<sup>72</sup> Karmann K., Hughes C.C., Schechner J., Fanslow W.C. and Pober J.S., CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4342 1995

<sup>73</sup> Mullis K. B. and Faloona F. A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol.* 155 (1987) 335-350

<sup>74</sup> Chomczynski P. and Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal.Biochem.* 162 (1987) 156-159

zwei klar abgrenzbare Banden, diese entsprechen der 18 S und 28 S rRNA (ribosomale RNA).

Die spektrophotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260nm, Proteine zeigen eine maximale Absorption bei 280nm. Der Quotient der beiden Werte ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) gibt die Reinheit der RNA-Lösung und somit die Qualität der RNA-Präparation an. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 3.2.2 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase kann aus einer RNA-Matrize die dazu komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden. Diese ist zur Quantifizierung mittels PCR notwendig.

Für die cDNA-Synthese wurden 1µg der extrahierten RNA zusammen mit 1,5µl Hexanukleotiden ("random primer") für 10 min. bei 65°C inkubiert. Dann erfolgte die reverse Transkription durch Zugabe des Master-Mixes. Dieser wurde in einem getrennten Gefäß für alle Proben gemeinsam vorbereitet und war wie folgt zusammengesetzt:

- 4,9µl 5x First Strand Puffer
- 2µl DTT
- 0,5µl RNasin
- 1µl Reverse Transkriptase (MMLV)
- 1µl der jeweiligen dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Durch Zugabe von RNase-freiem Wasser wurde ein Endvolumen von 25µl erreicht, und die Ansätze durchliefen den Thermocycler bei 37°C für 60 min. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Proben mit 95°C für 10 min. erhitzt. Die neu synthetisierte cDNA wurde entweder direkt weiter verwendet oder bei -20°C eingefroren.



### 3.2.3 Real-time-PCR

#### 3.2.3.1 Hintergrund

Die Validierung der Gene, die auf dem Macro-Array als Kandidatengene per Augenmaß bestimmt wurden, erfolgte zuerst mittels real-time-PCR. Diese beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR<sup>67</sup> und ermöglicht eine Quantifizierung des Expressionsgrades auf RNA-Ebene. Sie wird schon während der Amplifikation durch Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, daher der Name "real-time".

Die real-time-PCR wurde mit dem ABI Prism<sup>®</sup> 7700 Sequenzdetektor (TaqMan, Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt und basiert auf zwei Grundlagen:

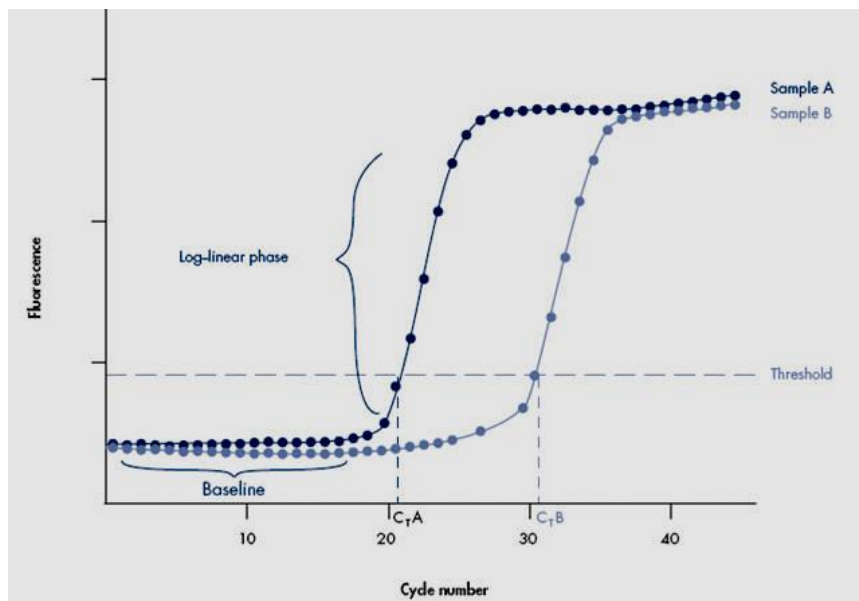
Der 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase und der Konstruktion von TaqMan<sup>®</sup>-Proben unter Ausnutzung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET).

Zu dem TaqMan<sup>®</sup> Universal Mastermix (enthält dNTPs, Enzym, Puffer und Mg<sup>++</sup>) wird neben den spezifischen Primern eine fluorogene Sonde eingesetzt. Diese TaqMan<sup>®</sup>-Sonden sind Oligonukleotide und binden komplementär zwischen dem sense und antisense Primer an der DNA-Matrize ("template"); sie sind an beiden Enden mit einem Farbstoff versehen. Einer dieser Farbstoffe, der so genannte Reporter, sendet nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge ein Fluoreszenzsignal aus. Dieses Signal wird in der intakten Probe durch den am anderen Ende der Probe gelegenen Farbstoff, den so genannten Quencher, unterdrückt. Das zu Grunde liegende Prinzip trägt die Bezeichnung Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Im Rahmen der Extensionsphase einer PCR wird die TaqMan<sup>®</sup>-Sonde durch Hydrolyse der Taq-Polymerase zerstört, und Reporter und Quencher werden räumlich soweit voneinander getrennt, dass das Fluoreszenzsignal nicht weiter durch den FRET unterdrückt werden kann. Daraus resultiert ein Anstieg des Reporterfluoreszenzsignals. Nach jedem PCR-Zyklus wird das dabei frei werdende Fluoreszenzsignal von einem optischen Detektionsmodul registriert und in einem Amplifikationsplot (siehe Abb. 4, Seite 20) dargestellt. Die Zunahme der Reporterfluoreszenz ist proportional der DNA-Templatmenge. Die Quantifizierung erfolgt anhand spezieller Software durch die Ermittlung des so genannten cycle-threshold-Wertes (CT-Wert). Dieser Wert bezeichnet genau den PCR-Zyklus, an welchem die gemessene Fluoreszenz die

Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Zu Beginn der Reaktion wird nur diese Hintergrundfluoreszenz gemessen, weil die Templatekonzentration im Reaktionsansatz noch zu gering ist. Mit steigender Zykluszahl und Erreichen des Schwellenwertes ("threshold") tritt die PCR in die exponentielle Phase über. Die eingesetzte Menge cDNA und der CT-Wert verhalten sich invers zueinander, das heißt, eine Probe mit hoher Templatemenge erreicht den Schwellenwert früher (also ist der CT-Wert niedriger) als eine Probe mit geringerer Kopienzahl.

Alternativ kann die real-time-PCR nicht mit einer Sonde, sondern mit Sybr Green<sup>®</sup> durchgeführt werden. Hierbei dient ein fluoreszierender, in die DNA interkalierender Farbstoff als Marker für die synthetisierte Menge an PCR-Produkten. Die Darstellung erfolgt auch hier mittels des beschriebenen Amplifikationsplots.

Im Vergleich mit der Messung der Fluoreszenz eines von der experimentellen Prozedur unbeeinflussten Gens kann eine relative Quantifikation durchgeführt werden. Dafür eignen sich so genannte "housekeeping"-Gene wie z. B. Porphobilinogen-Desaminase (PBGD), welches unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird und von uns als interne Referenz zur Normalisierung eingesetzt wurde.



**Abbildung 4: Typischer real-time-PCR Amplifikationsplot**

(Quelle: <http://www.qiagen.com>)

Dargestellt ist die Fluoreszenz ( $\Delta R_n$ ) bei entsprechendem Zyklus in einer repräsentativen TaqMan<sup>®</sup>-real-time-PCR. Im logarithmisch-linearen Verlauf dieser Kurve bedeutet jeder Zyklus (x) eine Verdopplung an Template (Formel:  $2^x$ ).

### 3.2.3.2 Durchführung der real-time-PCR

In einer Verdünnung von 1:8 wurden 2 µl cDNA mit 23 µl TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Mastermix oder Sybr Green<sup>®</sup> Mastermix inklusive der Primer und gegebenenfalls mit 0,25 µl Sonde gemischt und im ABI Prism<sup>®</sup> 7700 Sequenzdetektor inkubiert. Die Primersequenzen wurden zuvor mit der Primer Express<sup>®</sup> Software nach Parametern wie Größe, Schmelzpunkt, GC-Gehalt und Selbstkomplementarität ausgewählt und sind in Tabelle 4, Seiten 86 - 87, dargestellt. Zudem wurden zuvor jeweils für beide Primer unterschiedliche Konzentrationen ausgetestet, um eine bestmögliche Fluoreszenz zu erzielen. Die optimale Primerkonzentration wurde dann anhand des Amplifikationsverlaufes festgelegt und betrug jeweils 300nM.

Die Ansätze durchliefen folgendes Programm:

1. 50°C	2min.	(Uracil-N-Glykosylasen-Aktivität)	
2. 95°C	10min.	(AmpliTaq Gold Enzym Aktivierung)	
3. 95°C	15sek.	(Denaturierung)	} 45 Zyklen
4. 60°C	1min.	(Annealing und Extension)	

### 3.2.3.3 Relative mRNA-Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene mit der eines nicht regulierten "housekeeping"-Gens normalisiert<sup>75</sup>. Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der CT-Wert des Zielgenes vom CT-Wert des Referenzgenes subtrahiert:

$$\Delta CT = CT\text{-Wert Referenzgen (PBGD)} - CT\text{-Wert Zielgen}$$

Nach dieser Normierung wird vom  $\Delta CT$ -Wert der experimentell behandelten Proben der  $\Delta CT$ -Wert einer Kontrolle abgezogen. Man kommt zum so genannten  $\Delta\Delta CT$ -Berechnungsmodell:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Stimulation} - \Delta CT \text{ Kontrolle}$$

Werte größer 0 entsprechen dann einer Hochregulation unter Stimulation. Der relative Expressionsunterschied (Ratio) einer Probe zwischen der Stimulation und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der Formel:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Die Anwendung dieses Berechnungsschemas setzt sowohl die exakte Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus, als auch die gleiche Effizienz von Ziel- und Referenzgen voraus. Die Berechnung der Effizienz eines jeden Faktors erfolgt, indem man eine Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen der cDNA (1:1 bis 1:128) in logarithmischer Skalierung gegen eine Differenz der einzelnen CT-Werte ( $\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$ ) aufträgt. Die Steigung der Regressionsgeraden lag bei uns immer unter 0,1. Dies lässt auf eine nahezu gleiche Effizienz der PCR-Reaktion von Ziel- und Referenzgen schließen.

Der relative Expressionsunterschied, also der Unterschied der Transkriptmenge, ist jedoch ohne das Wissen, welches Mengenverhältnis konkret welche biologische Bedeutung hat, nicht informativer als die Aussage, dass das Zielgen stark, wenig oder

---

<sup>75</sup> Pfaffl M. W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, Nucleic Acids Res. 29 2001

nicht hoch- bzw. herunterreguliert ist. Aus diesem Grund erfolgte in dieser Arbeit die Darstellung der Ergebnisse über die Angabe der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte.

### 3.2.4 Array-Analyse

Die Array-Technologie findet Anwendung in modernen molekularbiologischen Untersuchungen, speziell bei Studien zur differentiellen Genexpression. Die parallele Analyse einer großen Menge von bekannten Genen bei nur geringen Mengen an Ausgangsmaterial in einem einzigen Experiment stellt den wesentlichen Nutzen dieser erst in den späten 90er Jahren entwickelten Technologie dar<sup>76</sup>.

Die umgeschriebene und markierte cDNA wird mit einer Gensonde hybridisiert und auf eine Matrix aufgebracht. Als Matrix dient entweder eine Nylonmembran, dann handelt es sich um einen Macro-Array, oder ein Objektträger, als Micro-Array (s. u.) bezeichnet. Auf diesen Matrizen sind cDNA-Fragmente oder synthetisch generierte Oligonukleotide als Sonden aufgetragen, welche je nach Expressionsstärke des jeweiligen Gens größere Mengen markierte cDNA binden und ein entsprechendes Signal emittieren. Durch einen Vergleich der Signalstärken der einzelnen Gene können differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Das Prinzip eines Macro-Arrays ist schematisch in Abb. 5, Seite 25, zu sehen.

Wir verwendeten in der vorliegenden Arbeit den Atlas<sup>TM</sup>Human 1.2 (Macro-)Array II (Clontech, Heidelberg). Auf dieser Nylonmembran sind neben 1176 gen-spezifischen cDNA-Fragmenten Negativ- (Plasmid- und Bakteriophagen-DNA) und Positivkontrollen ("housekeeping"-Gene) aufgebracht. Eine komplette Liste der durch diesen Array untersuchten Gene findet sich auf der Seite des Herstellers: <http://www.clontech.com/support/tools.asp>.

---

<sup>76</sup> Sherlock G. Analysis of large-scale gene expression data. *Curr. Opin. Immunol.* 2000;12(1):201–205

### 3.2.5 Macro-Array

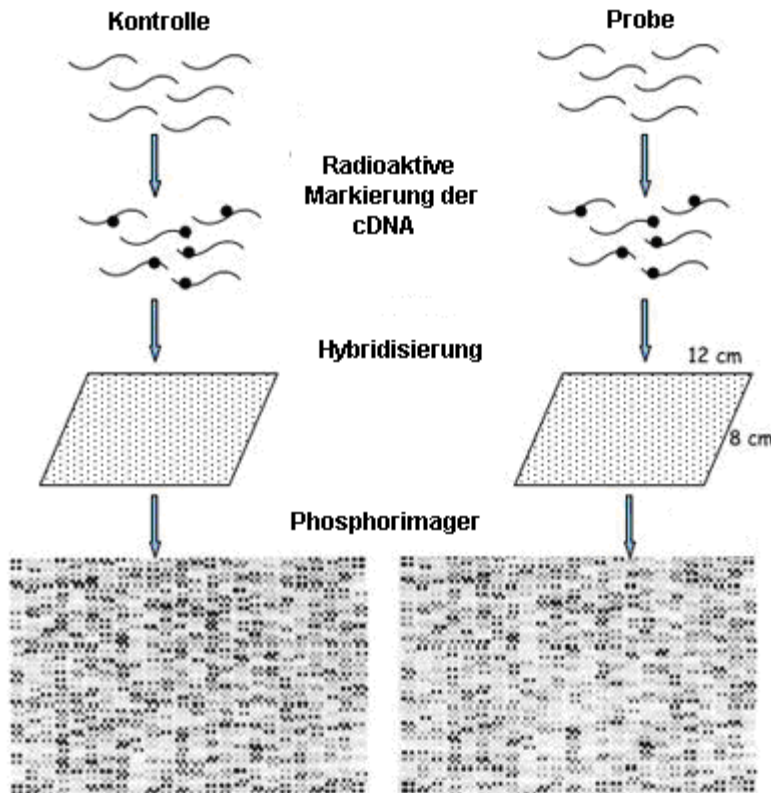
#### 3.2.5.1 Radioaktive Markierung der cDNA mit [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] dATP

Die Herstellung der markierten cDNA-Proben erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe eines spezifischen Primermixes (gemäß der Gene auf dem Array) sowie mit [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] dATP.

Es wurden 5  $\mu\text{g}$  der TNF- $\alpha$ -Kontrolle oder der sCD40L-RNA und 1  $\mu\text{l}$  spezifischer Primermix bei 70°C für 2 min. denaturiert und für weitere 2 min. auf 50°C abgekühlt. Es erfolgte nach Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer, 1  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix, 0,5  $\mu\text{l}$  DTT, 3,5  $\mu\text{l}$  [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] dATP und 1  $\mu\text{l}$  MMLV-RT die Inkubation des Ansatzes für 30 min. bei 50°C. Durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Termination-Mix wurde die reverse Transkriptase beendet. Anschließend wurde die erhaltene cDNA über die NucleoSpin Extraction Spin Columns von nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden und kleinen cDNA-Fragmenten abgetrennt. Die erfolgreiche Markierung der Proben wurde durch Messung der Radioaktivität am Szintillationsgerät bestätigt, die Sonden zeigten stets > 1 Mio counts per minute.

#### 3.2.5.2 Array-Hybridisierung

Entsprechend der Herstellerangaben führten wir zur Blockade der unspezifischen Bindungsstellen zunächst eine Inkubation mit einer Vorhybridisierungslösung durch. Dazu wurde die Nylonmembran luftblasenfrei an der Flaschenwand, die DNA-Seite lumenwärts, in eine Hybridisierungsflasche gegeben und mit 8ml auf 68°C vorgewärmter ExpressHyb-Lösung und 0,5 mg shared salmon testes DNA bei 68°C unter permanenter Rotation (5-7 rpm) für 30 min. in einem Hybridisierungsöfen inkubiert. Die markierte TNF- $\alpha$ -Kontroll- bzw. sCD40L-cDNA wurde in jeweils eine Hybridisierungsflasche zu einer Nylonmembran gegeben. Die Hybridisierung fand über Nacht mit 12-15 rpm bei 68°C statt. Zur Beseitigung ungebundener und unspezifisch hybridisierter Sonden wurden die Arrays am darauf folgenden Tag mit vorgewärmter Waschlösung 1 und 2 mehrfach gewaschen. Dann wurden die Membranen in Klarsichtfolie eingeschweißt und PhosphorImager Screens mit den Membranen für 24h exponiert. Anschließend wurden die Membranen an einem PhosphorImager eingescannt und je nach Signalstärke nochmals für etwa 3-14 Tage exponiert.



**Abbildung 5: Das Prinzip eines cDNA-Macro-Arrays<sup>77</sup>**

Nach Analyse durch einen PhosphorImager stellen sich die cDNA-Macro-Arrays als ein Punktemuster dar, wobei jeder Punkt einem Gen entspricht. Die Stärke der Schwärzung spiegelt die Höhe der Expression wider und wird anschließend durch die Software des Herstellers (Atlas Image 2.01<sup>TM</sup>, Clontech) densitometrisch erfasst und ausgewertet<sup>78</sup>.

### 3.2.5.3 Array-Auswertung

Die Auswertung der im PhosphorImager eingescannten Screens erfolgte mit Hilfe der Software Atlas Image 2.01<sup>TM</sup> (Clontech). Die Software legt passgenau ein Raster über die Nylonmembran, identifiziert die Gene und berechnet nach Subtraktion der Hintergrundsignale die differentielle Expression der insgesamt 1176 Gene.

<sup>77</sup> modifiziert nach: [https://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF2/principe\\_en.htm](https://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF2/principe_en.htm)

<sup>78</sup> Muth H., Kreis I., Zimmermann R., Tillmanns H., Hölschermann H., Differential gene expression in activated monocyte-derived macrophages following binding of factor VIIa to tissue factor. *Thromb Haemost.* 2005;94:1028-1034

### 3.2.6 Micro-Array

Die technische Weiterentwicklung der Array-Technologie und damit günstigere Verfügbarkeit eines Micro-Array führte zu der Entscheidung, diese auch in unseren Versuchen einzusetzen. Hier diente ein Objektträger als Matrix für die im Vergleich zum Macro-Array deutlich höhere Anzahl der cDNA-Fragmente. Durch Zugabe der mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Untersuchungsproben binden diese bei komplementärer Basenabfolge an die DNA. Die Position, Intensität und Wellenlänge der entstehenden Mischfarbe werden mit einer Laserkamera detektiert und liefern Informationen über Unterschiede in der Expression der Gene zwischen den beiden Proben. Wir verwendeten den GeneChip<sup>®</sup> Human Genome U133 Plus 2.0 Array der Firma Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) mit etwa 47.000 Transkripten. Die Durchführung des Micro-Arrays erfolgte als Kollaboration im Labor von Prof. W.-K. Hofmann, ehemals Charité Berlin, jetzt Universitätsklinikum Mannheim, analog vorheriger Veröffentlichungen<sup>79</sup>.

### 3.2.7 Western Blot

#### 3.2.7.1 Hintergrund

Die Western Blot-Technologie ist eine proteinbiochemische Methode zur Quantifizierung des Genproduktes, das in der Zelle von der mRNA in Proteine übersetzt wird. Dem Western Blot geht immer die Auftrennung der Proteine mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese voraus. Dabei werden die Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe, Ladung und Gestalt aufgetrennt. Beim Western Blot wird anschließend senkrecht zu diesem Polyacrylamid-Gel ein elektrisches Feld angelegt, und die Proteine werden aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran „geblottet“. Um einen spezifischen Nachweis von Antigenen möglich zu machen, müssen zunächst die freien Bindungsstellen blockiert werden. Nach einigen Waschschrinen wurde die Membran mit einer spezifischen Antikörperlösung (Primärantikörper) behandelt. Um die

---

<sup>79</sup> Haferlach T., Kohlmann A., Wieczorek L., Basso G., Kronnie G.T., Béné M.C., De Vos J., Hernández J.M., Hofmann W.K., Mills K.I. et al., Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: Report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J. Clin. Oncol.* 2010;28:2529-2537.



spezifische Bindung der Antikörper an die Epitope des Antigens nachzuweisen, wird ein Spezies-spezifischer sekundärer Antikörper verwendet, der mit HRP ("horseradish peroxidase") gekoppelt ist. HRP kann die verschiedenen Substrate umsetzen, die ein sichtbares Präzipitat um den Antigen-Antikörper-Komplex bilden<sup>80</sup>.

### 3.2.7.2 Durchführung

Die Auftrennung und Analyse von Proteinen aus Zelllysaten erfolgte durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Als mitgeführter Molekulargewichtsmarker diente ein Proteinstandard von New England Biolabs, Frankfurt/Main. Hierzu wurde ein Sammelgel (4 % Acrylamid) auf ein Trenngel (7,5%, 12% oder 15 % Acrylamid) gegossen. Für die Untersuchung der Proteine wurden Lysate auf das Gel aufgeladen, welche 50µg Proteine enthielten. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V (konstant) für 45 Minuten in einer Elektrophoresekammer mit 1x Laufpuffer + 0,1 % SDS. Zum Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurden diese nach ihrer Auftrennung mittels SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) übertragen. Der Transfer erfolgte in einer "Semi-dry"-Blotting-Apparatur bei 10 V (konstant) für 30 Minuten in Anwesenheit von Transferpuffer. Nach dem Transfer wurde die Membran für eine Stunde in speziellem Blockingpuffer zur Reduktion der unspezifischen Bindungen der Antikörper geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der Erstantikörperlösung über Nacht bei 4°C auf einer Laborwippe. Dazu wurde die Membran mit dem Primärantikörper (Phospho)-p38-MAP-Kinase in einer Verdünnung von 1:1000 in eine Folie unter Vermeidung von Lufteinschluss eingeschweißt. Die Inkubation der Membran mit einem polyklonalen Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper (IgG) erfolgte in einer Verdünnung von 1:4000 für 60 Minuten. Danach wurden die Membranen erneut gewaschen, und es wurde ECL-Lösung ("enhanced chemiluminescence") hinzugegeben. Durch die Oxidation von Luminol resultiert auf der Membran eine Lichtemission an den Stellen mit Peroxidaseaktivität. Anschließend erfolgte ein direktes Auflegen eines Röntgenfilms für 60 Sekunden und dessen Entwicklung im Curix HAT-530 U. Um eine gleichmäßige Proteinbeladung der Membranen zu überprüfen, wurde jeder Blot „gestrippt“ und mit Aktin-Antikörpern erneut geblottet. Das Ablösen der Bindungen (Stripping) erfolgte

---

<sup>80</sup> Renart J, Reiser J, Stark GR, R G. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(7):3116–3120

durch eine einstündige Waschung in Stripping-Lösung bei Raumtemperatur, einmaligem Spülen mit Waschpuffer, erneuter Blockung für eine Stunde und Inkubation mit dem Primärantikörper wie oben beschrieben.

### **3.2.8 Quantitative Proteinbestimmung mittels ELISA**

Der quantitative Nachweis von synthetisiertem IL-8, IL-6, MIP-2, TNF- $\alpha$ , VCAM und ICAM erfolgte aus Zellkulturüberständen durch einen Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Die Entwicklung erfolgte vor etwa vier Dekaden und wurde stetig verbessert<sup>81</sup>

Dieser enzymgekoppelte Immunadsorptionstest nutzt die Eigenschaft spezifischer, enzymmarkierter Antikörper, an den nachzuweisenden Stoff zu binden. Mittels Messung einer Farbreaktion kann anschließend eine quantitative Aussage über die Antigenkonzentration getroffen werden. Dabei ist zunächst in dem jeweiligen Kit ein molekularer Capture-Antikörper für das zu bestimmende Antigen in die Reaktionsfelder einer Mikrotiterplatte gebunden. Im ersten Inkubationsschritt bindet nun dieser Antikörper die gesamte Antigenmenge. Nach der Entfernung aller sonstigen Proteine durch einen Waschvorgang wurde ein weiterer enzymmarkierter Zweitantikörper hinzugegeben. Dieser Antikörper bindet an ein weiteres Epitop des Antigens, und es kommt zur Ausbildung eines Sandwichkomplexes, d. h. zu einer Einbettung des Antigens durch die beiden Antikörper von beiden Seiten. In Abhängigkeit von der im ersten Inkubationsschritt gebundenen Antigenmenge entwickelte sich eine Farbreaktion, welche über eine mitgeführte Standardreihe und einen ELISA-Reader quantifizierbar gemacht wurde.

### **3.2.9 EMSA**

Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) ist ein etabliertes molekularbiologisches Verfahren, um Genregulation beziehungsweise Protein-DNA/RNA-Interaktionen zu erfassen. Die EMSA-Methode basiert auf der Beobachtung, dass Protein-DNA/RNA-Komplexe wie zum Beispiel Transkriptions-

---

<sup>81</sup> Leng S.X., McElhaney J.E., Walston J.D., Xie D., Fedarko N.S., Kuchel G.A. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2008;63:879–88

faktoren langsamer im elektrischen Feld durch ein Polyacrylamidgel wandern als freie DNA. Wir verwendeten den EMSA zum qualitativen Nachweis der Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B an der CD40L-Signalkaskade. Die Durchführung erfolgte mit dem Lightshift<sup>®</sup> EMSA Kit der Firma Pierce, Rockford, USA, gemäß den Herstellerangaben<sup>82</sup>.

### 3.3 Statistik

Bei allen aufgeführten Einzelergebnissen wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, bei mehr als drei Versuchen ist dies bei der jeweiligen Abbildung vermerkt. Bei Western Blots sowie EMSA wurde jeweils eine repräsentative Abbildung von drei separaten Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis dargestellt. Die Messdaten wurden als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der jeweiligen Anzahl (n) von Einzelerperimenten angegeben. Das Signifikanzniveau für p wurde mit 0,05 festgesetzt. In den Abbildungen wurden Signifikanzunterschiede durch einen Stern (\*) gekennzeichnet. Bei statistischen Berechnungen wurde der Student's t-Test angewendet sowie der Spearman's Rangkorrelationskoeffizient durch das Computerprogramm StatsDirect<sup>™</sup>, StatsDirect Ltd. Company, United Kingdom, berechnet.

---

<sup>82</sup> Kerr LD. Electrophoretic mobility shift assay. *Methods Enzymol.* 1995;254:619–632. doi: 10.1016/0076-6879(95)54044

## 4 Ergebnisse

Der Macro- und Micro-Array ergab bei verschiedenen Chemo-/Zytokinen, Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktionsmolekülen und Adhäsionsmolekülen eine differentielle Regulation. Die weiterführenden molekularbiologischen Untersuchungen erfolgten mittels real-time-PCR, Western Blot, EMSA und ELISA. Wir wählten jeweils aus den verschiedenen Gruppen repräsentative Substanzen aus und analysierten diese mit unterschiedlichen Methoden.

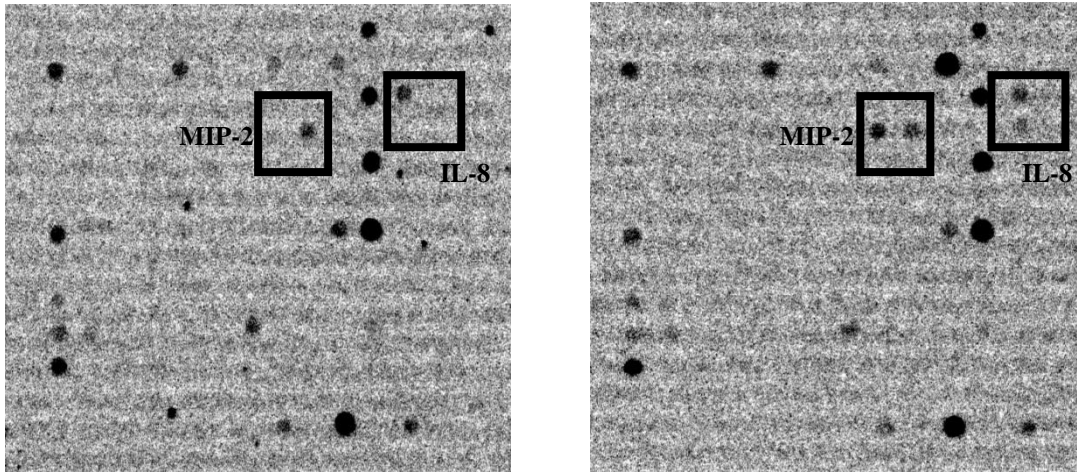
### 4.1 Ergebnisse der Macro-Array-Analyse

Wir führten zunächst eine Macro-Array-Analyse von HUVEC durch, welche mit sCD40L stimuliert wurden.

Es erfolgte ein Screening über 1176 Gene mit dem Atlas™ Human 1.2 Array (Clontech, Heidelberg). Das Expressionsprofil von unstimulierten Endothelzellen wurde mit dem Expressionsprofil von sCD40L-stimulierten Endothelzellen verglichen. Für die Expressionsanalyse wurden, den Ergebnissen der vorherigen Konzentrations- und Zeitreihen entsprechend, HUVEC für 3h mit 10µg sCD40L/ml stimuliert.

Nach Analyse durch einen PhosphorImager stellen sich die cDNA-Macro-Arrays als ein Punktemuster dar, wobei jeder Punkt einem Gen entspricht. Die Stärke der Schwärzung spiegelt die Höhe der Expression wider und wird anschließend durch die Software des Herstellers (Atlas™ Image 2.01, Clontech) densitometrisch erfasst und ausgewertet<sup>78</sup>.

Bei den cDNA-Macro-Arrays konnten mit der Herstellersoftware keine repräsentativen Expressionsunterschiede gemessen werden, obwohl es subjektiv per „eye-balling“ zu deutlichen Schwärzungsunterschieden – also Signalstärkenänderungen – gekommen war. Diese können in Abb. 6, Seite 31, gut nachvollzogen werden. Daraufhin erfolgte die Validierung der Gene mit einem Micro-Array. Es konnte somit zunächst lediglich eine Ja/Nein-Aussage getroffen werden.

**Unstimulierte Kontrolle****10µg sCD40L/ml****Abbildung 6: Unterschiedliche Genexpressionsprofile nach Stimulation**

Vergleich der Expressionsprofile von unstimulierten und mit 10µg sCD40L/ml stimulierten HUVEC. Zu sehen ist der Block F des Atlas™ Human 1.2 Array. Als Beispiel: An den markierten Positionen der Gene MIP-2 und IL-8 sieht man deutlich eine verstärkte Schwärzung, diese konnte jedoch nicht vom Programm Atlas™ Image 2.01 objektiv gemessen werden, so dass wir keine quantitativen Expressionsänderungen angeben konnten.

**4.2 Ergebnisse der Micro-Array-Analyse**

Die Möglichkeit, eine große Menge von bekannten Genen bei nur geringen Mengen an Ausgangsmaterial in einem einzigen Experiment zu untersuchen, führte zu einer raschen Verbreitung und Etablierung der Micro-Array-Technologie. Der Hintergrund und die Funktionsweise dieser noch recht jungen Technologie sind bereits im Abschnitt 3.2.6 „Micro Array“ erläutert worden.

Die relativen Änderungen des Genexpressionsprofils wurden zur Validierung mit Hilfe des Micro-Arrays untersucht. Die Analysen des Macro-Arrays erbrachten qualitativ eine ja/nein-Aussage, jedoch keine quantitative Aussage mit der Analyse-Software.

Wir verwendeten den GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array der Firma Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) mit etwa 47.000 Transkripten. Die Durchführung und Auswertung des Micro-Arrays erfolgte in Kollaboration im Labor von

Prof. W.-K. Hofmann, ehemals Charité Berlin, aktuell Universitätsklinikum Mannheim, analog vorheriger Veröffentlichungen<sup>76</sup>. Nach Normalisierung (Subtraktion des sogenannten Hintergrundrauschens) sowie unter Berücksichtigung der Stringenz der Auswertung, also der Auswahl der Gene, welche eine möglichst hohe Homologie zwischen der Probe und den Basen der Matrix aufweisen, erfolgte die Festlegung der Grenze bei „Fünffach“-differentiell reguliert.

Gen	HG U133 Plus 2	Genbank-Zugangsnummer	Lokalisation	Beschreibung	-fache Regulation
<b><u>Zytokine/Chemokine</u></b>					
CXCL2 = GRObeta = MIP-2	209774_x_at	M57731	4q21	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	>5
MIP-3α	205476_at	NM_004591	2q33-q37	Macrophage inflammatory protein 3 alpha	>5
CXCL3	207850_at	NM_002090	4q21	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	>5
CXCL10= IP-10	204533_at	NM_001565	4q21	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	>5
CX3CL1	203687_at	NM_002996	16q13	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	>5
CD69	209795_at	L07555	12p13-p12	CD69 antigen (p60, frühe T-Zell-Aktivierung-Antigen)	>5
eNOS	205581_s_at	NM_000603	7q36	Nitric oxide synthase 3	>5
<b><u>Transkriptionsfaktoren</u></b>					
STAT1	209969_s_at	BC002704	2q32.2	Signal transducer and activator of transcription 1	>5

<b>ISGF3</b>	203882_at	NM_006084	14q11.2	Interferon-stimulated transcription factor 3	>5
IFIT2	226757_at	AA131041	10q23.3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	>5
ATF2	212984_at	BE786164	2q32	Activating transcription factor 2	>5
NIBP	56829_at	H61826	8q24.3	NIK and IKK-beta binding protein	>5
IKIP	227295_at	AW182575	12q23	IKK interacting protein	>5
<b><u>Signaltransduktionsmoleküle</u></b>					
TRAF1	205599_at	NM_005658	9q33-q34	TNF receptor-associated factor 1	>5
TRAF3	208315_x_at	NM_003300	14q32.33	TNF receptor-associated factor 3	>5
TRAF6	205558_at	NM_004620	11p12	TNF receptor-associated factor 6	>5
<b>P38 MAPK</b>	208351_s_at	NM_002745	22q11.21	p 38 Mitogen-activated protein kinase	>5
MAP3K1	214786_at	AA361361	5q11.2	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	>5
RHOH12	200059_s_at	BC001360	3p21.3	Ras homolog gene family, member A	>5
CASP8	207686_s_at	NM_001228	2q33-q34	Caspase 8	>5

<b><u>Adhäsionsmoleküle</u></b>					
ICAM1	202638_s_at	NM_000201	19p13.3-p13.2	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54)	>5
VCAM1	203868_s_at	NM_001078	1p32-p31	Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106)	>5
<b><u>Gerinnungsmolekül</u></b>					
TF	204363_at	NM_001993	1p22-p21	Tissue Factor	>5

**Tabelle 1: Differentiell exprimierte Gene im Micro-Array nach sCD40L-Stimulation**

Repräsentative Auswahl differentiell exprimierter Gene in HUVEC nach sCD40L-Stimulation bezogen auf die unstimulierte Kontrolle im GeneChip® U133 Plus 2.0 Array.

### 4.3 Ergebnisse der real-time-PCR

Die Bedeutung verschiedener inflammatorischer Moleküle wie Zytokine, Adhäsivmoleküle und Transkriptionsfaktoren in der Pathogenese der Atherosklerose ist bereits ausreichend untersucht und beschrieben worden<sup>51</sup>.

Zunächst erfolgte die Analyse der Gene MIP-2 und ISGF. Bei beiden konnte die im Micro-Array gemessene gesteigerte Expression nach sCD40-Ligand-Stimulation auch in der real-time-PCR bestätigt werden. Anschließend erfolgte noch die Überprüfung zweier „klassischer“, im Kontext der Entzündungsreaktion etablierter Gene, nämlich von MCP-1 und IL-8. Beide haben besondere Bedeutung bezüglich der Rekrutierung von Monozyten. Auch hier konnten wir eine Hochregulation der Expression beider Zytokine feststellen.

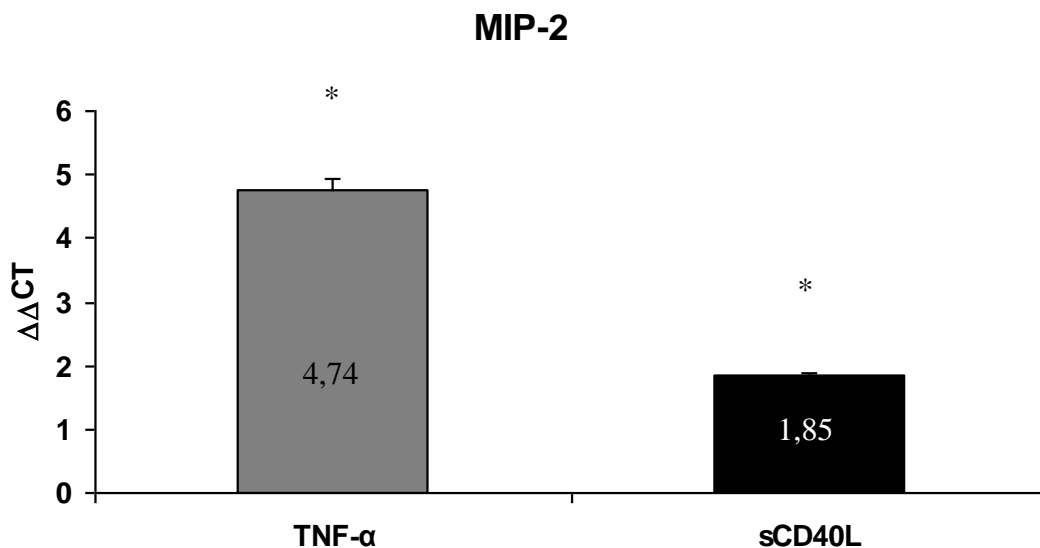


### 4.3.1 Validierung der Kandidatengene mittels real time-PCR nach Stimulation von HUVEC mit sCD40L

Als geeignete Methode zur Analyse der veränderten Genexpression in Relation zur internen Kontrolle PBGD (als Referenz-Gen) zu verschiedenen Zeitpunkten in der real time -PCR wurde die Methode nach Livak et al. gewählt<sup>83</sup>.

### 4.3.2 Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L führt zu einer erhöhten MIP-2 Genexpression

Mit Hilfe der real-time-PCR konnten im Falle von MIP-2 die Ergebnisse der Micro-Array-Analyse bestätigt werden. Die Stimulation mit 10µg/ml sCD40L bzw. mit TNF-α als Positivkontrolle führte zu einer Hochregulation der MIP-2 Genexpression nach einer Stimulationsdauer von 3h.



**Diagramm 1: Effekt von sCD40L auf die MIP-2-Genexpression in HUVEC**

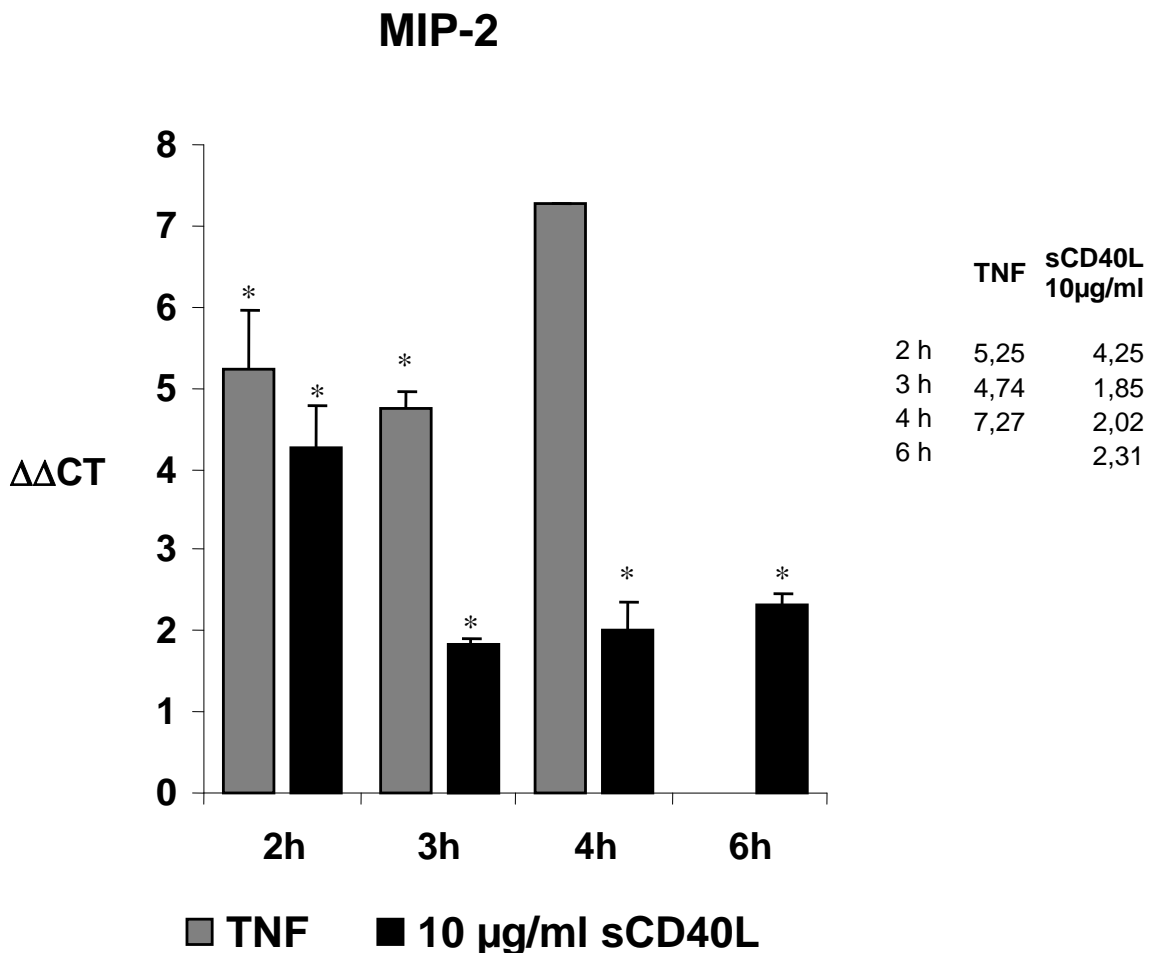
Die Stimulation mit 10µg/ml sCD40L führte zu einer deutlichen Hochregulation der MIP-2 Genexpression nach einer Stimulationszeit von 3h. Die Stimulation mit TNF- α fungiert als Positivkontrolle. Die Ergebnisse sind nach der Methode von Livak et al. berechnet und dargestellt, die ΔΔCT-Werte sind die um die Kontrollbedingung normalisierten ΔCT-Werte. Werte größer 0 entsprechen einer Hochregulation unter

<sup>83</sup> Livak K.J., Schmittgen D.T., Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Methods. 2001; 25: 402-408

Stimulation (mittlere  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte  $\pm$  SEM,  $n=3$ ,  $*p<0,05$  versus unstimulierte Kontrolle).

### 4.3.3 Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L führt zeitabhängig zu einer erhöhten MIP-2 Genexpression

Wir führten eine Zeitreihe mit sCD40L für 2h, 3h, 4h und 6h Stimulationszeit bzw. mit TNF- $\alpha$  als Positivkontrolle mit 2h, 3h und 4h Stimulationszeit durch. Die Stimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}$  sCD40L führte stets zu einer Hochregulation der MIP-2 Genexpression mit einer maximalen Stimulation nach 2h.

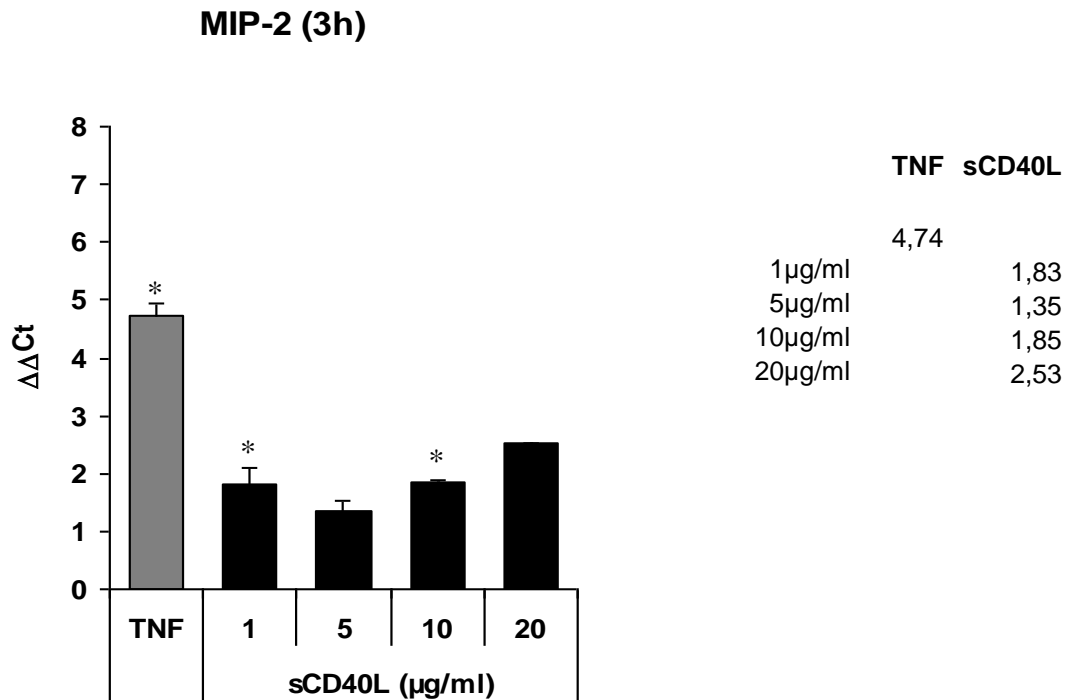


**Diagramm 2: Der Effekt von sCD40L auf die MIP-2 Genexpression in HUVEC**  
Die Stimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}$  sCD40L führte stets zu einer statistisch signifikanten Hochregulation der MIP-2 Genexpression mit einer maximalen Stimulation nach 2h.

Die Ergebnisse sind nach der Methode von Livak et al. berechnet und dargestellt, die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte sind die um die Kontrollbedingung normalisierten  $\Delta\text{CT}$ -Werte. Werte größer 0 entsprechen einer Hochregulation unter Stimulation (mittlere  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte  $\pm\text{SEM}$ ,  $n=3$ ,  $*p<0,05$  versus unstimulierte Kontrolle).

#### **4.3.4 Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L führt dosisabhängig zu einer erhöhten MIP-2 Genexpression**

Mit Hilfe der real-time-PCR konnten auch im Falle von MIP-2 die Ergebnisse der Micro-Array-Analyse bestätigt werden. Wir führten eine Konzentrationsreihe mit  $1\mu\text{g}$  sCD40L/ml,  $5\mu\text{g}$  sCD40L/ml,  $10\mu\text{g}$  sCD40L/ml und  $20\mu\text{g}$  sCD40L/ml bzw. mit  $5\text{ng}$  TNF- $\alpha$ /ml als Positivkontrolle durch. Bei einer Stimulationsdauer von 3h führte dies dosisabhängig stets zu einer deutlichen Hochregulation von MIP-2 mit einer maximalen Genexpression bei einer Konzentration von  $20\mu\text{g}$  sCD40L/ml. Die Stimulation mit  $1\mu\text{g}$  sCD40L/ml stellte sich als „Ausreißer“ dar, dennoch zeigte sich hier auch bereits eine etwa gleich starke, statistisch signifikante erhöhte MIP-2-Expression wie bei der Stimulation mit  $10\mu\text{g}$  sCD40L/ml.

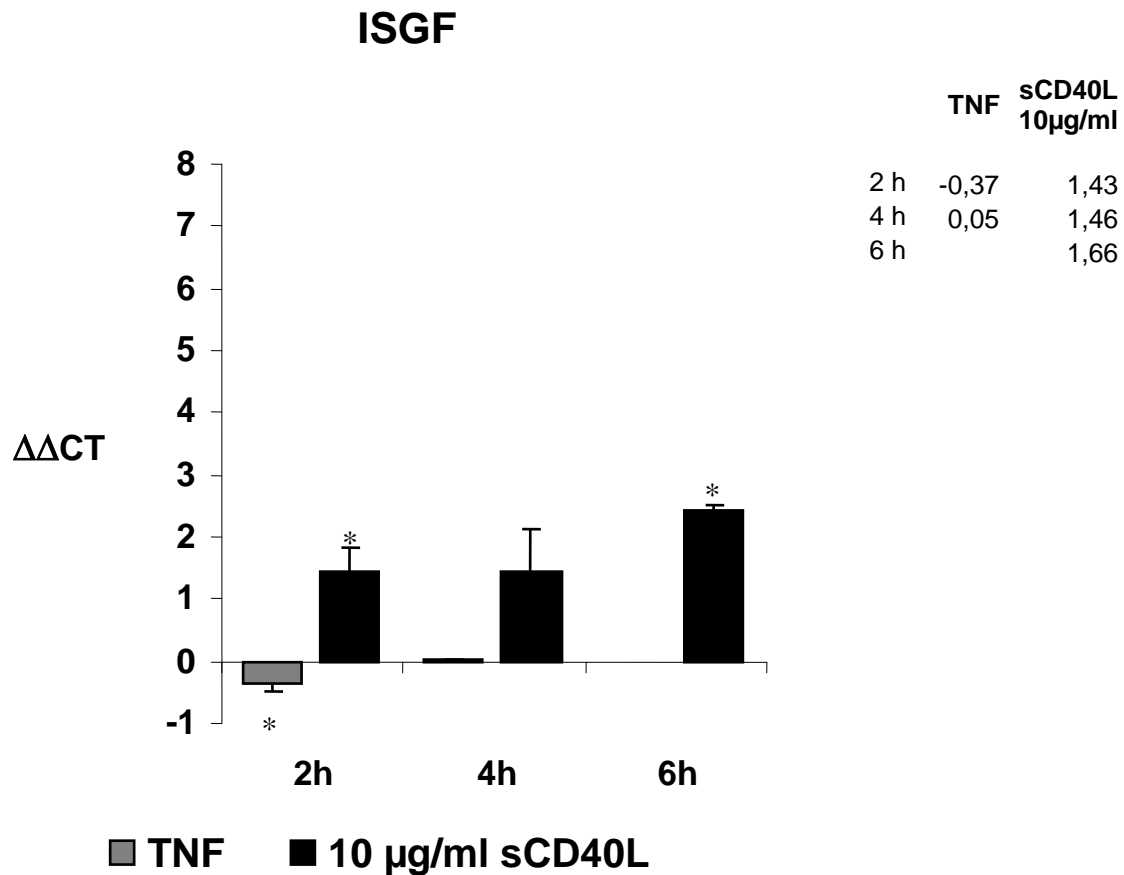


**Diagramm 3: Der Effekt von sCD40L auf die MIP-2 Genexpression in HUVEC**

Es zeigte sich bei einer Stimulationsdauer von 3h stets eine deutliche Hochregulation von MIP-2 mit einer maximalen Genexpression bei einer Konzentration von 20μg sCD40L/ml. Die Ergebnisse sind nach der Methode von Livak et al. berechnet und dargestellt, die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte sind die um die Kontrollbedingung normalisierten  $\Delta\text{Ct}$ -Werte. Werte größer 0 entsprechen einer Hochregulation unter Stimulation (mittlere  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte  $\pm\text{SEM}$ ,  $n=3$ ,  $*p<0,05$  versus unstimulierte Kontrolle).

#### **4.3.5 Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L führt zeitabhängig zu einer erhöhten ISGF Genexpression**

Wir führten eine Zeitreihe mit sCD40L für 2h, 4h und 6h Stimulationszeit bzw. mit TNF- $\alpha$  als Positivkontrolle mit 2h und 4h Stimulationszeit durch. Die Stimulation mit 10μg/ml sCD40L führte stets zu einer Hochregulation der ISGF Genexpression mit einer maximalen Stimulation nach 6h.



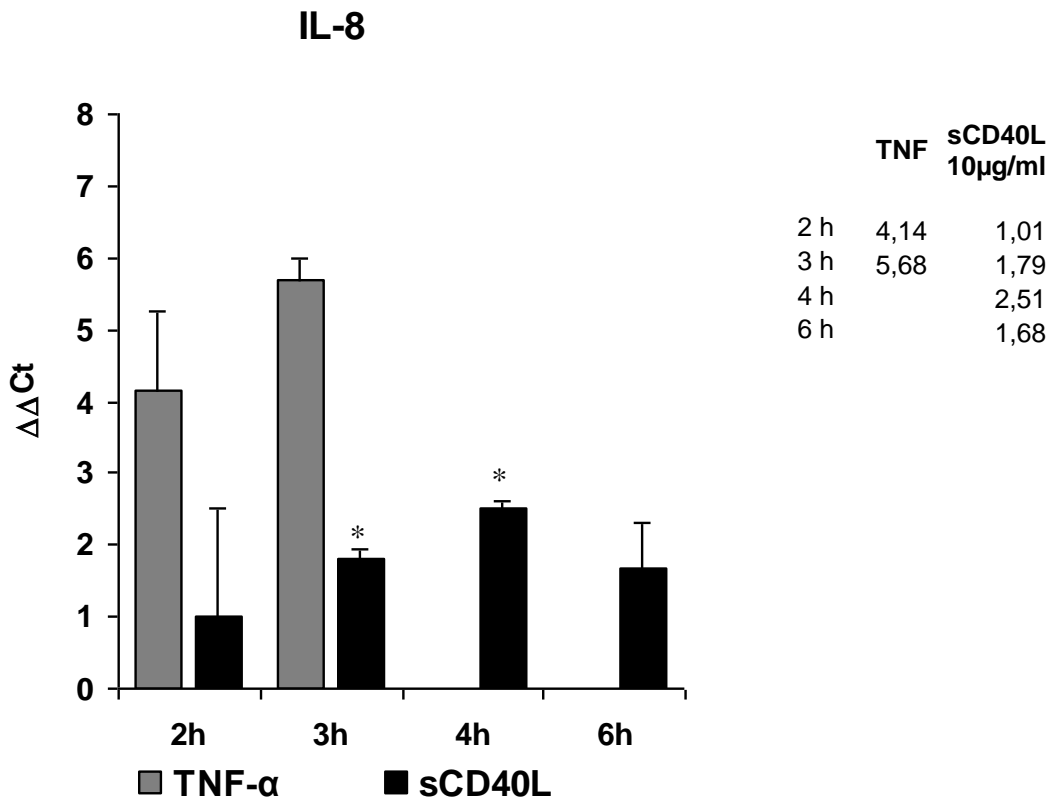
**Diagramm 4: Der Effekt von sCD40L auf die ISGF Genexpression in HUVEC**

Die Stimulation mit 10μg/ml sCD40L führte zu einer deutlichen, statistisch signifikanten Hochregulation der ISGF Genexpression mit zunehmender Stimulationsdauer. Die Ergebnisse sind nach der Methode von Livak et al. berechnet und dargestellt, die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte sind die um die Kontrollbedingung normalisierten  $\Delta\text{CT}$ -Werte. Werte größer 0 entsprechen einer Hochregulation unter Stimulation (mittlere  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte  $\pm$  SEM, n=3, \*p<0,05 versus unstimulierte Kontrolle).

#### **4.3.6 Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L führt zeitabhängig zu einer erhöhten IL-8 Genexpression**

Wir führten eine Zeitreihe mit sCD40L für 2h, 3h, 4h und 6h Stimulationszeit bzw. mit TNF- $\alpha$  als Positivkontrolle mit 2h und 3h Stimulationszeit durch. Die Stimulation mit

10 $\mu$ g/ml sCD40L führte zu einer starken Hochregulation der IL-8 Genexpression mit einer maximalen Stimulation nach 4h.



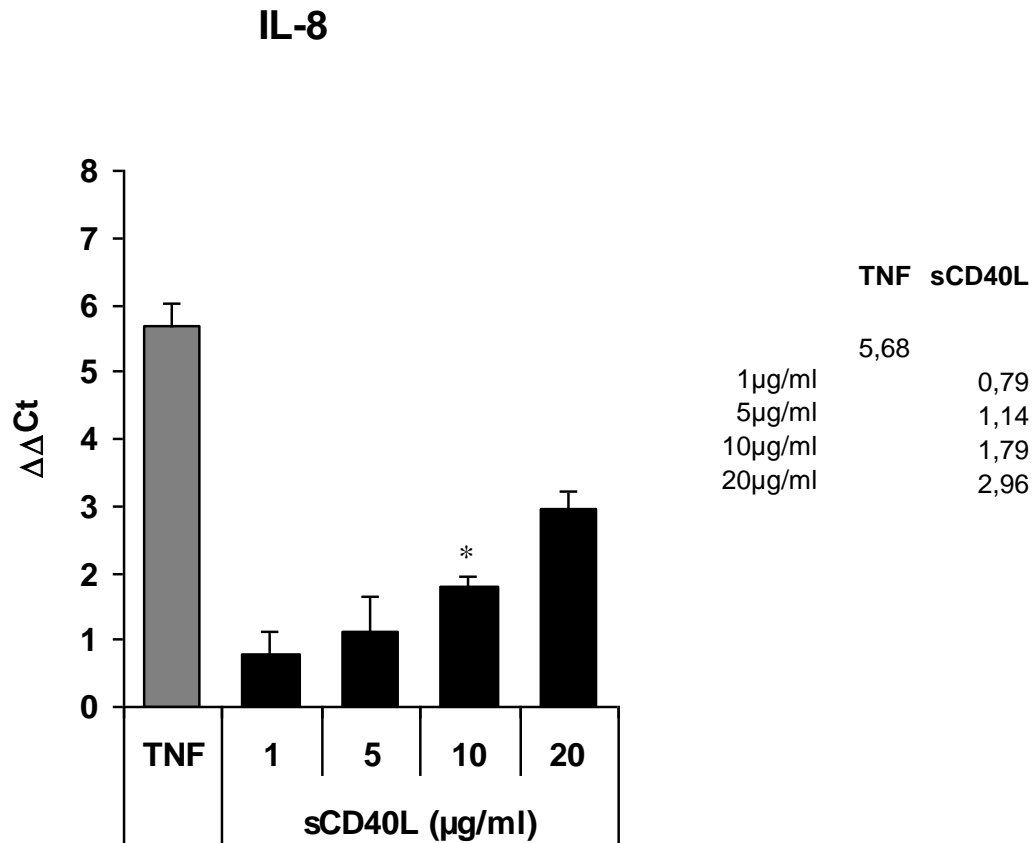
**Diagramm 5: Effekt von sCD40L auf die IL-8-Genexpression in HUVEC**

Die Konzentration der Positivkontrolle TNF- $\alpha$  betrug 5ng/ml, die des sCD40L 10 $\mu$ g/ml. Man sieht eine Hochregulation der IL-8 Expression unter steigender Stimulationsdauer mit einem Abfall der Expression nach 6h. Die Ergebnisse sind nach der Methode von Livak et al. berechnet und dargestellt, Werte größer 0 entsprechen einer Hochregulation unter Stimulation (mittlere  $\Delta\Delta$ CT-Werte  $\pm$  SEM, n=3, \*p<0,05 versus unstimulierte Kontrolle).

#### **4.3.7 Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L führt dosisabhängig zu einer erhöhten IL-8 Genexpression**

In einer Konzentrationsreihe stimulierten wir HUVEC mit 1 $\mu$ g sCD40L/ml, 5 $\mu$ g sCD40L/ml, 10 $\mu$ g sCD40L/ml und 20 $\mu$ g sCD40L/ml bzw. mit 5ng TNF- $\alpha$ /ml als

Positivkontrolle. Bei einer Stimulationsdauer von 3h führte dies zu einer kontinuierlichen Hochregulation der IL-8 Genexpression mit einer maximalen Stimulation bei einer Konzentration von 20 $\mu$ g sCD40L/ml.

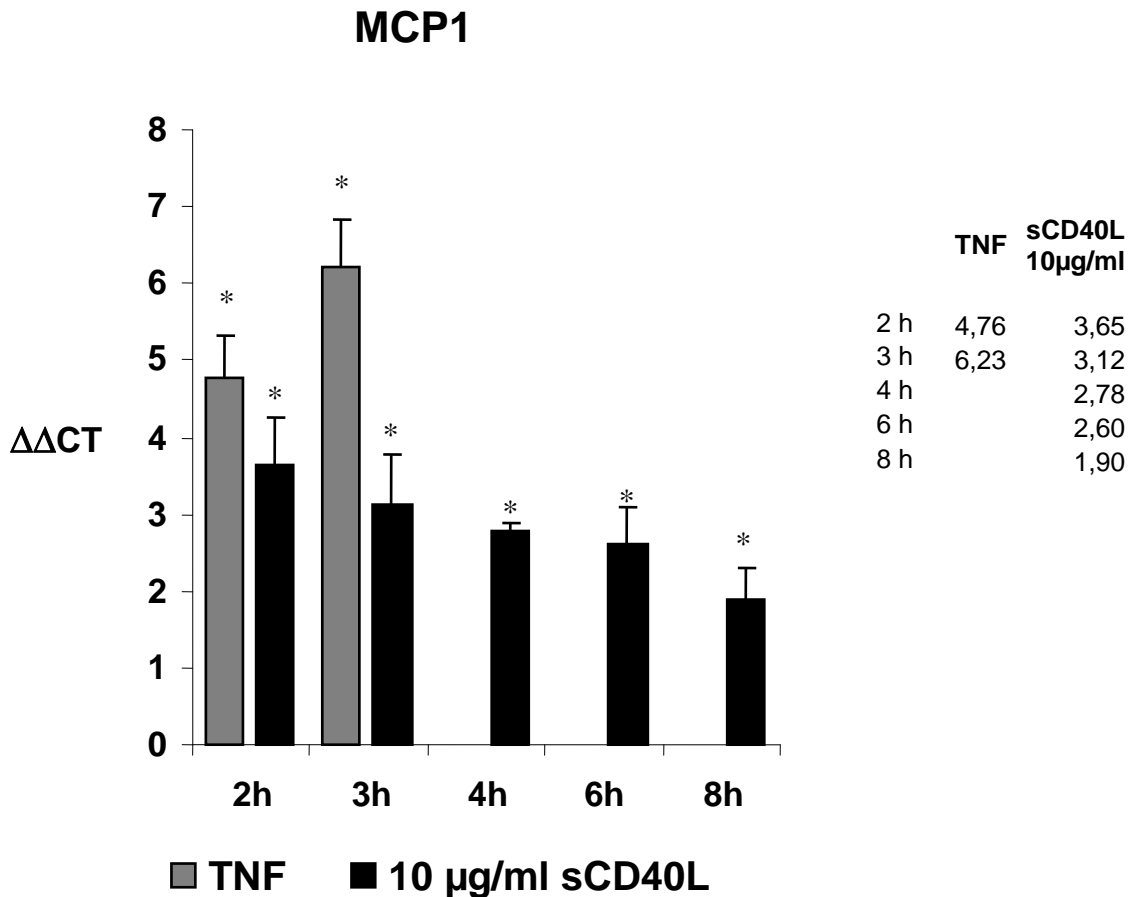


**Diagramm 6: Der Effekt von sCD40L auf die IL-8-Genexpression in HUVEC**

Es ist zu erkennen, dass bei steigender Konzentration von sCD40L höhere  $\Delta\Delta$ CT-Werte gemessen wurden, also eine eindeutige Dosis-Wirkung-Beziehung vorliegt. Die Ergebnisse sind nach der Methode von Livak et al. berechnet und dargestellt, Werte größer 0 entsprechen einer Hochregulation unter Stimulation (mittlere  $\Delta\Delta$ CT-Werte  $\pm$  SEM, n=3, \*p<0,05 versus unstimulierte Kontrolle).

#### **4.3.8 Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L führt zeitabhängig zu einer erhöhten MCP-1 Genexpression**

Wir führten eine Zeitreihe mit sCD40L für 2h, 3h, 4h, 6h und 8h Stimulationszeit bzw. mit TNF- $\alpha$  als Positivkontrolle mit 2h und 3h Stimulationszeit durch. Die Stimulation mit 10 $\mu$ g/ml sCD40L führte zu einer starken Hochregulation der MCP-1 Genexpression mit einer maximalen Stimulation nach 2h.



**Diagramm 7: Der Effekt von sCD40L auf die MCP-1 Genexpression in HUVEC**

Die Konzentration der Positivkontrolle TNF- $\alpha$  betrug 5ng/ml, die des sCD40L 10 $\mu$ g/ml. Man sieht eine Hochregulation der MCP-1 Expression mit einem Maximum nach 2h, mit zunehmender Stimulationsdauer sinkt der  $\Delta\Delta$ CT-Wert kontinuierlich. Die Ergebnisse sind nach der Methode von Livak et al. berechnet und dargestellt, die  $\Delta\Delta$ CT-Werte sind die um die Kontrollbedingung normalisierten  $\Delta$ CT-Werte. Werte größer 0 entsprechen einer Hochregulation unter Stimulation (mittlere  $\Delta\Delta$ CT-Werte  $\pm$  SEM, n=3, \*p<0,05 versus unstimulierte Kontrolle).



### 4.3.9 Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L führt nahezu dosisunabhängig zu einer erhöhten MCP-1 Genexpression

Wir führten eine Konzentrationsreihe mit 1 µg sCD40L/ml, 5 µg sCD40L/ml, 10 µg sCD40L/ml und 20 µg sCD40L/ml bzw. mit 5 ng TNF-α/ml als Positivkontrolle durch. Bei einer Stimulationsdauer von 3h führte dies stets zu einer deutlichen Hochregulation von MCP-1 mit einer maximalen Stimulation bei einer Konzentration von 20 µg sCD40L/ml.

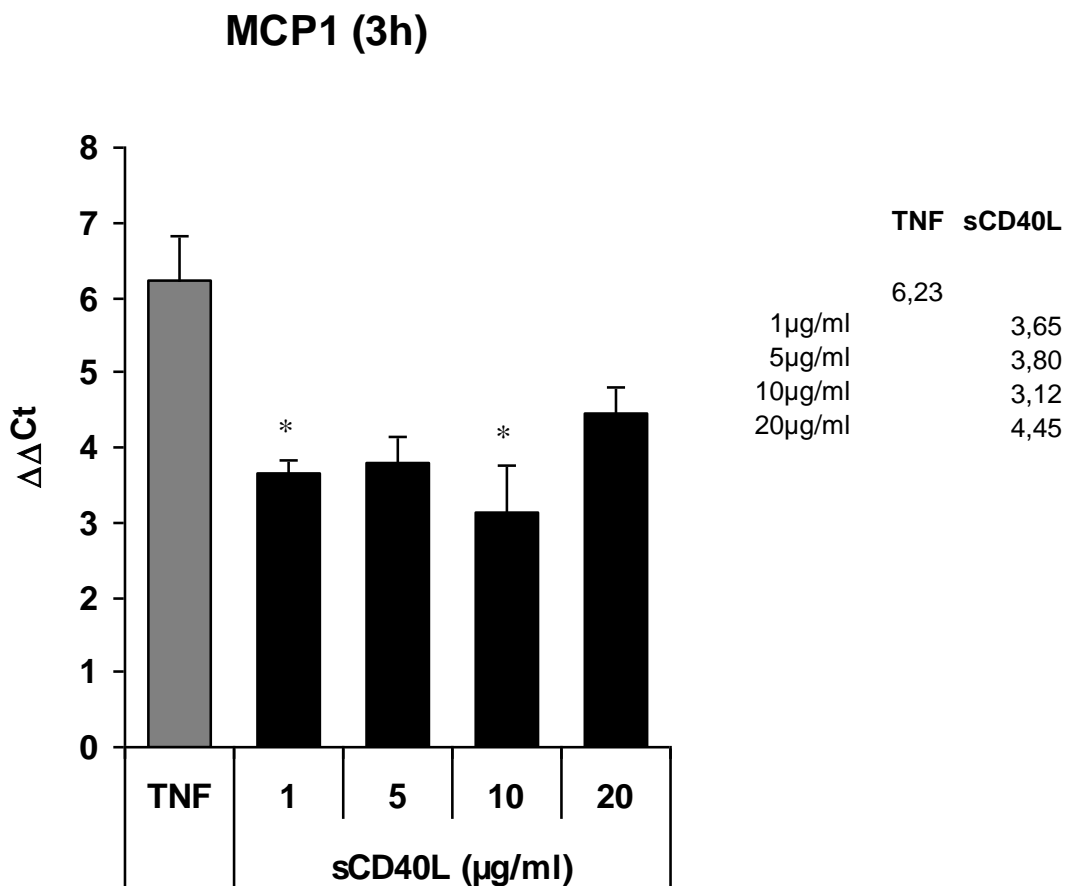


Diagramm 8: Der Effekt von sCD40L auf die MCP-1 Genexpression in HUVEC

Es ist zu erkennen, dass bei steigender Konzentration von sCD40L die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte nur geringfügig schwanken, also keine Dosis-Wirkung-Beziehung vorliegt. Die Ergebnisse sind nach der Methode von Livak et al. berechnet und dargestellt, die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte sind die um die Kontrollbedingung normalisierten  $\Delta\text{CT}$ -Werte. Werte größer 0 entsprechen einer Hochregulation unter Stimulation (mittlere  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte  $\pm$  SEM, n=3, \*p<0,05 versus unstimulierte Kontrolle).

## 4.4 Western Blot

Um die CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Signalkaskade auf unterschiedlichen Ebenen nachvollziehen zu können, wurden sowohl die Expressionsgrade der Gene als auch der Genprodukte evaluiert.

Im Micro-Array konnten wir eine hochregulierte Expression der p38-MAPK auf transkriptioneller Ebene nach sCD40-Ligand-Stimulation feststellen. Diese Aktivierung des p38-MAPK-Signaltransduktionsweges nach sCD40-Ligand-Stimulation konnten wir auch mittels Western Blot nachweisen.

Die p38-MAP-Kinase ist ein wichtiger Teil einer durch Zytokine und zellulären Stress ausgelösten Signalkaskade. Dieser zelluläre Stress kann durch unterschiedlichste Einflüsse provoziert werden, zum Beispiel als Folge eines osmotischen Schocks, nach massiver Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und Wachstumsfaktoren oder auch durch UV-Licht<sup>70,84</sup>.

### 4.4.1 Aktivierung der p38-MAPK in der CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Signalkaskade nach Stimulation von HUVEC mit sCD40L

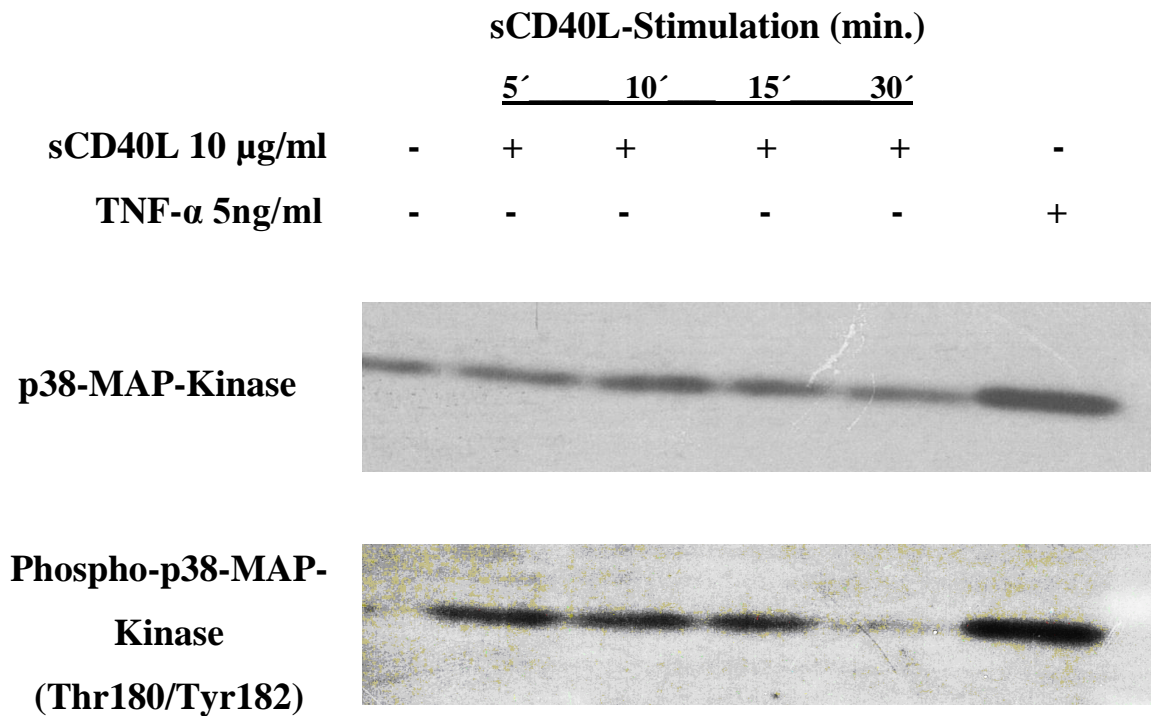
Der p38-MAP-Kinase-Antikörper erfasst endogene Level totaler p38-MAP-Kinase-Protein-Menge. Dieser Antikörper erkennt weder die strukturverwandte c-Jun N-terminale Kinase (JNK, synonym für "stress-activated phospho-kinases" (SAPK)), noch die p44/42 MAP-Kinase.

Der Phospho-p38-MAP-Kinase-(Thr180/Tyr182)-Antikörper erfasst endogene Level totaler p38-MAP-Kinase nur im phosphorylierten Zustand. Analog zum vorherigen Antikörper erkennt er weder die phosphorylierte c-Jun N-terminale Kinase (JNK, synonym SAPK), noch die phosphorylierte p44/42-MAP-Kinase.

---

<sup>84</sup> Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A et al., A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. Cell. 1994; 78:1027-1037

Daher eignet sich die Detektion dieses Proteins im inaktiven und aktiven (phosphorylierten) Zustand besonders als Maß für die Aktivierung der CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Signalkaskade unter einer Stimulation mit sCD40L.



**Abbildung 7: Die Aktivierung der p38-Map-Kinase als Effekt der sCD40L-Stimulation im Western Blot**

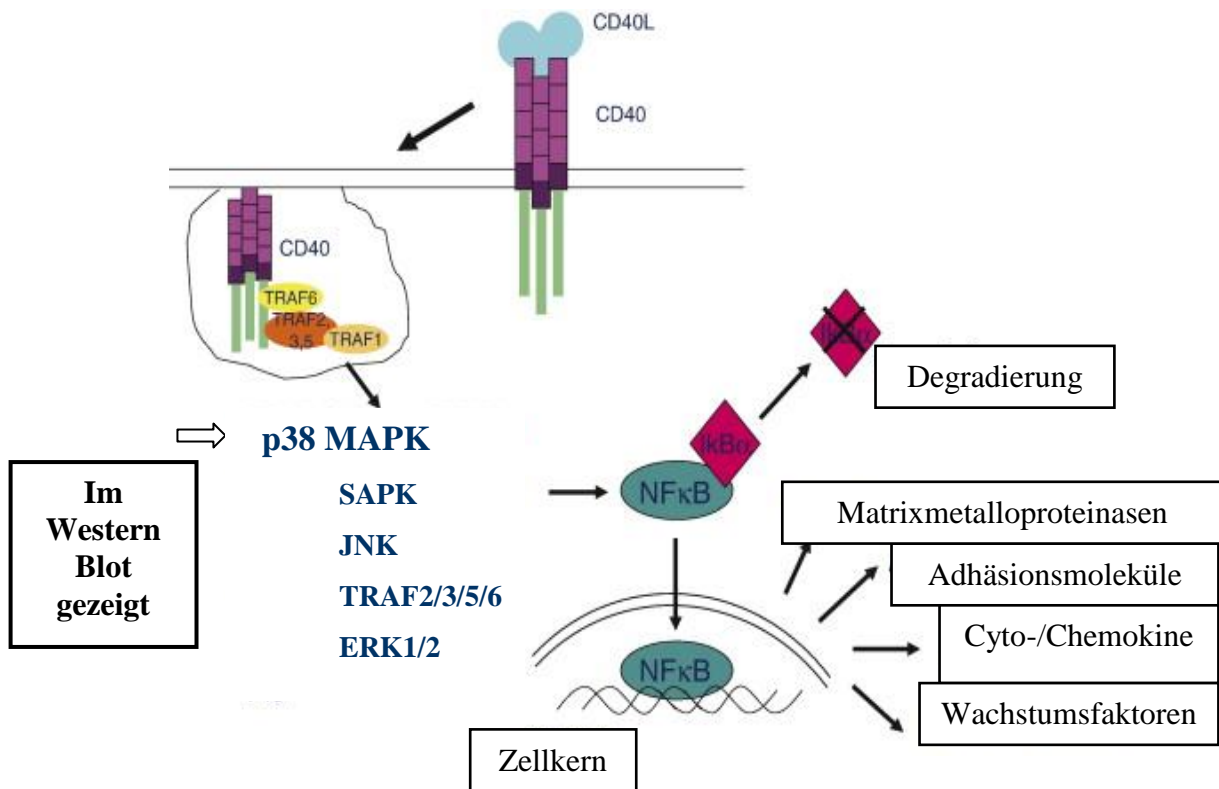
Lysate von HUVEC, inkubiert mit serumfreiem Medium (Kontrolle), TNF-α (5ng/ml) oder sCD40L (10µg/ml) für die jeweils angegebene Dauer wurden im Western Blot unter Verwendung der entsprechenden Antikörper analysiert. Der Nachweis der Involvierung der p38-MAP-Kinase in den Signaltransduktionsweg der CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Interaktion erfolgte durch die Darstellung der aktivierten Form der p38-MAP-Kinase unter Stimulation mit sCD40L. Zu erkennen ist die Änderung des Proteinbandenprofils von einer annähernd gleich stark bleibenden Schwärzung des Filmes bei Detektion der p38-MAP-Kinase hin zu einer selektiven, unter Stimulation

mit sCD40L auftretenden Schwärzung des Filmes bei Nachweis der Phospho-p38-MAP-Kinase. Auswahl repräsentativer Blots,  $n \geq 3$ .

#### **4.4.2 Die p38-MAPK ist in die CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Signalkaskade involviert**

Die p38-MAPK-Aktivierung im Rahmen der CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Signalkaskade wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen untersucht und postuliert<sup>49</sup>. So führt diese zelltypabhängig zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel NF $\kappa$ B und damit zur Regulation der Transkription einer Vielzahl von Zielgenen.

Der qualitative Nachweis der p38-MAPK-Aktivierung erfolgte mittels Darstellung der Phospho-p38-MAP-Kinase (Thr180/Tyr182) im Western Blot nach Aktivierung durch die Stimulation mit 10 $\mu$ g/ml sCD40L. Nach einer Stimulationsdauer von 5-30 Minuten zeigte sich eine Phosphorylierung der p38-MAPK.



**Abbildung 8: Die Signaltransduktionswege des CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Systems<sup>54</sup>**

Der Nachweis der Involvierung der p38-MAPK in den Signaltransduktionsweg der CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Interaktion erfolgte durch einen Western Blot.

## 4.5 EMSA

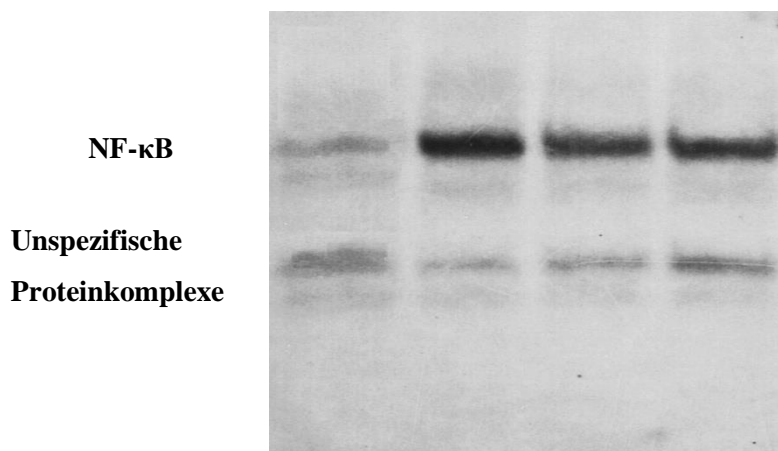
Der nukleäre Transkriptionsfaktor Kappa B spielt in der akuten Entzündungsreaktion eine zentrale Rolle. Er wirkt als regulatorischer Proteinkomplex vieler Gene, welche die Zellproliferation, -differenzierung und -aktivierung sowie die Apoptose beeinflussen. So führt zum Beispiel eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch die p38-MAPK zu einer Hochregulation der IL-8-Expression<sup>14</sup>. Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) gilt als zuverlässige Methode zum Nachweis der Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors Kappa B (NF- $\kappa$ B)<sup>85</sup>.

<sup>85</sup> Garner M.M., Revzin A., A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. Nucleic Acids Res. 1981;9:3047-3060

### 4.5.1 Der nukleäre Transkriptionsfaktor Kappa B (NF- $\kappa$ B) ist in die CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Signalkaskade involviert

Die NF- $\kappa$ B-Phosphorylierung im Rahmen der CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Signalkaskade wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen untersucht und publiziert<sup>51</sup>. So führt die Steigerung der DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zur Regulation der Transkription vieler für die Immunantwort wichtiger Genprodukte.

sCD40L	-	-	4h +	8h +	10ng/ml
TNF- $\alpha$	-	+	-	-	5ng/ml



**Abbildung 9: Der Effekt von sCD40L auf die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B**

HUVEC wurden für vier bzw. acht Stunden mit 10ng/ml sCD40L sowie 5ng/ml TNF- $\alpha$  stimuliert. Mittels EMSA wurde die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B gemessen. Es zeigte sich eine gesteigerte DNA-Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  sowie sCD40L. Auswahl repräsentativer Blots,  $n \geq 3$ .

## 4.6 ELISA

Um nachzuweisen, dass die gezeigten Genexpressionsveränderungen auch Auswirkungen auf die Proteinexpression haben, wurden die Zellkulturüberstände der Stimulationsversuche mittels ELISA auf die entsprechende Proteinkonzentration hin untersucht. Dieser enzymgekoppelte Immunadsorptionstest nutzt die Eigenschaft spezifischer enzymmarkierter Antikörper, an den nachzuweisenden Stoff zu binden und

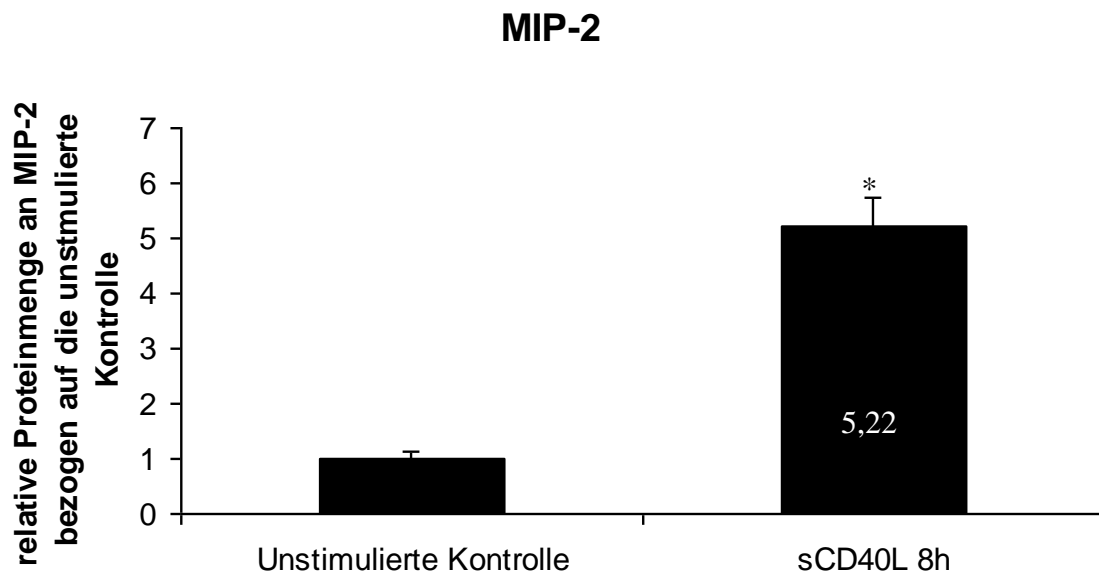
über die Messung einer Farbreaktion eine quantitative Aussage über die Antigenkonzentration treffen zu können.

Es wurden die Proteinkonzentrationen von MIP-2 sowie der Zytokine IL-6 und IL-8 gemessen. Nach der Bestätigung der erhöhten Expression von MIP-2 sowohl im Micro-Array als auch in der real time-PCR nach sCD40-Ligand-Stimulation erfolgte nun auch der Nachweis auf Proteinebene im Zellkulturüberstand.

Mit den Zytokinen IL-6 und IL-8 konnte auch die gesteigerte Synthese der Genprodukte gezeigt werden. Ihre zentrale Rolle im Rahmen der inflammatorischen Reaktion wurde hinlänglich beschrieben. Insbesondere IL-6 wird wiederum durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B verstärkt transkribiert.

#### 4.6.1 Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L führt zu einer statistisch signifikant erhöhten MIP-2-Synthese

Nach sCD40L-Stimulation zeigte sich im Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) im Falle von MIP-2 eine erhöhte Proteinexpression. Die Stimulation von HUVEC mit 10 $\mu$ g/ml sCD40L führte zu einer deutlich gesteigerten MIP-2 Synthese mit einem Maximum nach einer Stimulationszeit von 8h (Diagr. 9, Seite 49).

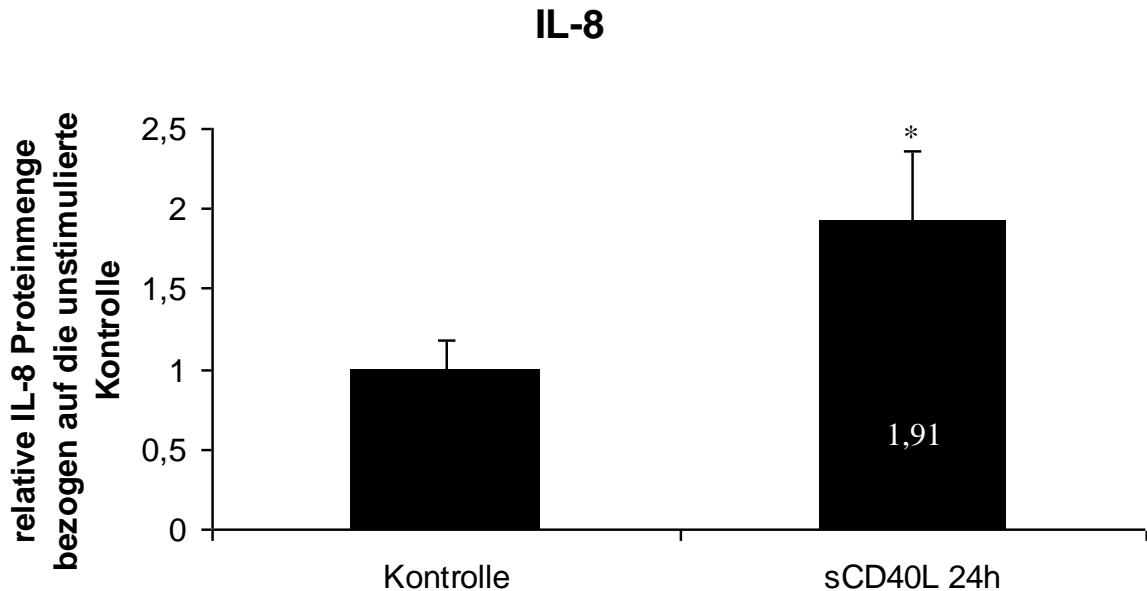


**Diagramm 9:** Effekt von sCD40L auf die MIP-2 Proteinsynthese in HUVEC im ELISA

Die Stimulation mit 10µg/ml sCD40L führte, bezogen auf unstimulierte HUVEC, zu einer etwa fünffachen MIP-2 Proteinexpression nach einer Stimulationszeit von 8h. (Mittelwerte  $\pm$ SEM, n=3, \*p<0,05 versus unstimulierte Kontrolle).

#### 4.6.2 Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L führt zu einer erhöhten IL-8-Synthese

Mit Hilfe des Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) konnte auch im Falle von IL-8 eine erhöhte Proteinexpression gezeigt werden. Die Stimulation von HUVEC mit 10µg/ml sCD40L führte zu einer gesteigerten IL-8 Synthese mit einem Maximum nach einer Stimulationszeit von 24h (Diagr. 10, S. 50).



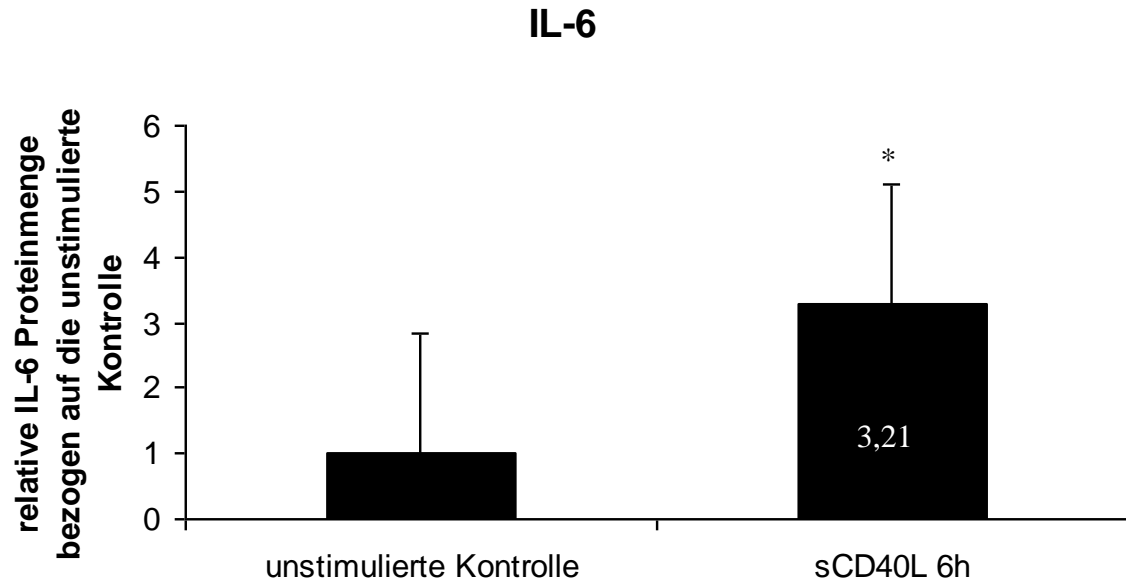
**Diagramm 10: Effekt von sCD40L auf die IL-8 Proteinsynthese in HUVEC im ELISA**

Die Stimulation mit 10µg/ml sCD40L führte, bezogen auf unstimulierte HUVEC, zu einer etwa doppelten IL-8 Proteinexpression nach einer Stimulationszeit von 24h. (Mittelwerte  $\pm$ SEM, n=3, \*p<0,05 versus unstimulierte Kontrolle).

#### 4.6.3 Die Stimulation von HUVEC mit sCD40L führt zu einer erhöhten IL-6-Synthese



Mit Hilfe des Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) konnte im Falle von IL-6 eine erhöhte Proteinexpression gezeigt werden. Die Stimulation von HUVEC mit 10µg/ml sCD40L führte zu einer gesteigerten IL-6 Synthese um den Faktor drei, bezogen auf die unstimulierte Kontrolle, mit einem statistisch signifikanten Maximum nach einer Stimulationszeit von 6h (Diagr. 11, S. 51).



**Diagramm 11: Effekt von sCD40L auf die IL-6 Proteinsynthese in HUVEC im ELISA**

Die Stimulation mit 10µg/ml sCD40L führte, bezogen auf unstimulierte HUVEC, zu einer mehr als dreifachen IL-6 Proteinexpression nach einer Stimulationszeit von 6h. (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3, \*p<0,05 versus unstimulierte Kontrolle).

## 4.7 Ergebnisse Klinische Proben

Wir untersuchten bei zehn Patienten der kardiologischen Intensivstation mit der Diagnose eines akuten Koronarsyndroms zum Zeitpunkt der Katheterintervention sowie am nächsten Tag die Blutseren auf die unter „in vitro“-Bedingungen bei Inflammation vermehrt exprimierten Parameter sCD40L und MIP-2 im ELISA.

Wir konnten in diesem selektiven Patientengut die Induktion von MIP-2 durch sCD40L bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom nachmessen und so die zuvor „in vitro“ an HUVEC gewonnenen Daten bestätigen.

Somit kann insbesondere bei MIP-2 zumindest von einem möglichen Biomarker-Potential gesprochen werden.

#### **4.8 Korrelation von sCD40-Ligand-Spiegeln und MIP-2-Spiegeln bei Patienten mit einem ACS**

Der Korrelationskoeffizient ( $r$ ) ist ein Maß für den Grad des (linearen) Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen. Er kann zwischen -1 und +1 liegen. Je näher er an 0 liegt, desto geringer hängen die beiden Merkmale voneinander ab.

In unserem Fall zeigte sich am Tag der Katheterintervention erwartungsgemäß keine Korrelation ( $r = 0,11$ ) zwischen endogenen MIP-2- und sCD40-Ligand-Leveln.

Am Folgetag fand sich eine deutliche Korrelation zwischen endogenen MIP-2- und sCD40-Ligand-Spiegeln. Der Korrelationskoeffizient betrug  $r = 0,88$ .

Somit ergab sich ein wichtiger Hinweis auf die Schlüsselrolle von sCD40-Ligand als Bindeglied zwischen thrombotischen Ereignissen wie einem akuten Koronarsyndrom und inflammatorischen Prozessen wie der Atherosklerose.

## 5 Diskussion

Studien zeigen, dass CD40-CD40L-Interaktionen mit Endothelzellen eine zentrale Rolle in der Entstehung und beim Fortschreiten vieler vaskulärer Prozesse spielen. So wird diesem Rezeptor/Ligandsystem sowohl neben der zuerst entdeckten Funktion als Startermolekül für die T-Zell-vermittelte humorale Immunität als auch in der Genese der Atherosklerose, der Blutgerinnung und der Angiogenese eine wichtige Bedeutung zugesprochen.

Im akuten Koronarsyndrom wurden von anderen Arbeitsgruppen bereits erhöhte Serumspiegel von sCD40L gemessen, dem Liganden des CD40-Rezeptor/CD40-Ligand-Signaltransduktionsweges<sup>1,2,3</sup>. Wir haben diese Ergebnisse in unseren Messungen unter klinischen Bedingungen bestätigen können und zum Anlass genommen, unter in vitro-Bedingungen humane Endothelzellen aus der Vena umbilicalis (HUVEC) mit sCD40L zu stimulieren.

Wir konnten in unseren Studien zeigen,

- **dass sich das Expressionsmuster von HUVEC nach sCD40-Ligand-Stimulation deutlich ändert.** Es werden auf der mRNA-Ebene in der real-time-PCR IL-8, MCP-1, ISGF und MIP-2 verstärkt exprimiert, ISGF und MIP-2 auch im Micro-Array.
- **dass auch auf der Proteinebene im ELISA eine verstärkte Translation in HUVEC nach sCD40-Ligand-Stimulation nachvollzogen werden kann.** Auf der Proteinebene werden MIP-2, IL-6 und IL-8 in Zellüberständen verstärkt exprimiert.
- **dass die p38-MAPK und der Transkriptionsfaktor NF-κB in die Signalkaskade involviert sind.**
- **dass MIP-2-Spiegel mit den sCD40-Ligand-Spiegeln bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom miteinander korrelieren und somit möglicherweise „Biomarker-Potential“ besitzen.**

## **5.1 Verstärkte Genexpression von IL-8, MCP-1, MIP-2 und ISGF nach sCD40L-Stimulation von HUVEC in der real-time-PCR sowie von ISGF und MIP-2 im Micro-Array**

Als starker inflammatorischer Stimulus induziert sCD40L, wie TNF- $\alpha$  und IL-1, die Sezernierung und erhöhte Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen. Hierbei werden auch Signale für die Rekrutierung und Extravasation von Leukozyten am Ort der Gefäßläsion generiert<sup>59</sup>. So konnte in der real-time-PCR eine deutlich verstärkte Expression der Chemokine/Zytokine IL-8, MCP-1 und MIP-2 sowie des Transkriptionsfaktors ISGF gezeigt werden.

Der CD40-Rezeptor ist ebenso wie CD40-Ligand in atherosklerotischen Plaques auf verschiedenen Zelltypen nachgewiesen worden. Der CD40-CD40L-Signaltransduktionsweg induziert Zellproliferation, -differenzierung und -aktivierung, er ist durch die Ausschüttung vieler Zytokine und Wachstumsfaktoren charakterisiert. Die proinflammatorischen Effekte dieser Moleküle werden noch durch die ebenfalls von der CD40-CD40L-Interaktion hervorgerufene gesteigerte Expression von Chemokinen und Adhäsions-molekülen unterstützt bzw. verstärkt. So sind Chemokine wie MCP-1/MIP-2 für die Regulierung der Leukozytenmigration in die Gefäßwand wesentlich, besitzen eine hohe chemotaktische Potenz auf Granulozyten und regulieren die Migration der Leukozyten. Sie sorgen demnach an der Gefäßwand für lokale Prozesse, die die Voraussetzung für eine Plaqueruptur schaffen: Die Degradierung der extrazellulären Matrix und Formierung eines nekrotischen Kernes. Auch der "Interferon stimulated gene factor(3)"-Komplex (ISGF) ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung immun-stimulierende Wirkung hat. Interferone werden von diversen Zelltypen als Antwort auf verschiedene Stimuli wie auch virale oder bakterielle Nukleinsäure gebildet und setzen eine Immunantwort gegen die jeweiligen Pathogene in Gang.

Neuere Studien zeigten, dass nach einer Listerieninfektion ein Zusammenspiel mit NF- $\kappa$ B als zweitem Transkriptionsfaktor stattfindet<sup>86</sup>. In wieweit diese Kooperation beider Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen nach sCD40L-Stimulation eine Rolle spielt,

---

<sup>86</sup> Farlik M., Reutterer B., Schindler C., Greten F., Vogl C. et al., Nonconventional initiation complex assembly by STAT and NF-kappaB transcription factors regulates nitric oxide synthase expression. *Immunity* 2010;33:25-34

muss in weiteren Studien untersucht werden. Wir konnten die verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors ISGF mittels der real-time-PCR und des Micro-Array messen.

## **5.2 Verstärkte Genexpression von VCAM-1, ICAM-1, TRAF1/3/6 und dem tissue factor nach sCD40L-Stimulation von HUVEC im Micro-Array**

Mit dem GeneChip<sup>®</sup> Human Genome U133 Plus 2.0 Micro-Array konnten wir auch noch weitere deutliche Änderungen der Expressionsmuster auf transkriptionaler Ebene nachweisen. So zeigten sich signifikant erhöhte Expressionen der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1, der Signaltransduktionsmoleküle TRAF1/3/6 und des Gerinnungsmoleküls tissue factor.

Die Ergebnisse der Arrayanalyse bestätigen somit die Ergebnisse aus der real-time-PCR und passen inhaltlich gut in den Kontext der proinflammatorischen Wirkung der Aktivierung der CD40-CD40L-Signalkaskade. Doch die Wirkung der CD40-CD40L-Signalkaskade geht noch über die Atheromformation und das Ausdünnen der fibrösen Deckplatte hinaus. CD40/CD40L-Interaktionen spielen auch eine wichtige Rolle in thrombotischen Ereignissen nach Plaqueruptur. Durch die gesteigerte Genexpression des tissue factors nach CD40L-Stimulation wird somit der lokale prokoagulatorische und prothrombotische Status begünstigt<sup>87</sup>. Es zeigt sich eine komplexe Vernetzung zwischen Koagulation und Gerinnung, welche sich gegenseitig fördernd beeinflussen. So ist bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom ein akutes thrombogenes Ereignis mit konsekutivem Untergang von Myokard abgelaufen. Die dann messbare erhöhte sCD40L-Ausschüttung führt anschließend zur Expression des Gerinnungsmoleküls tissue factor.

---

<sup>87</sup> Aukrust P., Damas J.K. and Solum N.O., Soluble CD40 ligand and platelets: self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation?. J Am Coll Cardiol, 43 (2004), 2326-2328

### 5.3 Verstärkte Expression der Genprodukte MIP-2, IL-6 und IL-8 im ELISA

Die Zellkulturüberstände der Stimulationsversuche wurden mit dem ELISA auf die entsprechenden Proteinkonzentrationen des Chemokines MIP-2 und der Zytokine IL-6 und IL-8 untersucht.

Analog vorheriger Veröffentlichungen konnten wir eine signifikant gesteigerte Expression der Zytokine IL-6 und IL-8 nach 6 bzw. 24 Stunden Stimulationsdauer feststellen<sup>88,89,90</sup>. Die in der real-time-PCR auf der mRNA-Ebene gezeigte verstärkte Expression von Interleukin-8 setzte sich nun auch mit verstärktem Expressionsmuster auf Proteinebene fort. Hiermit konnte also die durchgehende Proteinbiosynthese von IL-8 dargestellt werden, ausgehend von der Transkription bis zur Translation nach einem inflammatorischen Stimulus. Die Bindung von Interleukin-8 auf Granulozyten bewirkt im Wesentlichen eine Förderung der Chemotaxis und eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen; Interleukin-6 hat neben proinflammatorischen Effekten, wie zum Beispiel der verstärkten hepatischen Synthese von Akute-Phase-Proteinen, eine stimulierende Wirkung auf die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen.

Auch im Falle des Chemokins MIP-2, oft auch GRO-beta oder CXCL-2 genannt, gelang es uns, die komplette Proteinbiosynthese von der verstärkten Genexpression bis hin zum fertigen Protein mit unterschiedlichen Methoden nachzuweisen. Nach der Bestätigung auf mRNA-Ebene in der real-time-PCR und im Micro-Array konnten wir in den Zellkulturüberständen mittels ELISA ebenfalls eine Überexpression von MIP-2 mit einem statistisch signifikanten Maximum nach achtstündiger Stimulation zeigen.

Das Chemokin MIP-2 beteiligt sich nicht nur an Entzündungsreaktionen, sondern ist gerade für deren Progress entscheidend. Es besitzt eine hohe chemotaktische Potenz auf Granulozyten und reguliert das sogenannte „rolling“ der Leukozyten, deren Adhäsion und Migration.

---

<sup>88</sup> Tedgui A., Mallat Z., Cytokines in atherosclerosis pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006; 86: 515-581

<sup>89</sup> Kleemann R., et al., Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 360-376.

<sup>90</sup> Charo I.F., Ransohoff R.M., The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610-621

## **5.4 Die p38-MAPK und der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B sind in die CD40/sCD40L-Signalkaskade involviert**

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B nimmt in der akuten Entzündungsreaktion eine zentrale Rolle ein. Er wird selbst durch die p38-MAPK aktiviert und induziert neben einer Vielzahl proinflammatorischer Stimuli auch die verstärkte Expression von IL-8. Daher entschlossen wir uns zum Nachweis der p38-MAP-Kinase.

Wir konnten mit der Analyse der Zellüberstände im Western Blot durch die Darstellung der aktivierten Form der p38-MAP-Kinase unter Stimulation mit sCD40L die Involvierung in die CD40-CD40L-Signalkaskade zeigen. Dies ist im Gesamtkontext eines inflammatorischen Geschehens mit Ausschüttung multipler Zytokine und Chemokine nicht überraschend. Bereits andere Arbeitsgruppen haben diesen Zusammenhang in der CD40/sCD40L-Signalkaskade beschrieben<sup>53</sup>.

Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) gilt als zuverlässige Methode zum Nachweis der Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors Kappa B (NF- $\kappa$ B). Dieser Transkriptionsfaktor ist ein relativ großer Protein-DNA/RNA-Komplex und dadurch im elektrischen Feld gut aufzutrennen, er wandert langsamer durch das Trenngel als zum Beispiel freie DNA. Die Steigerung der DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt zur Regulation der Transkription vieler für die Immunantwort wichtiger Genprodukte, welche überwiegend als proinflammatorisch anzusehen sind. Wir konnten nach Stimulation mit sCD40L sowie TNF- $\alpha$  für vier und acht Stunden eine Phosphorylierung und somit gesteigerte Bindungsaktivität nachweisen.

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B liegt inaktiviert im Zytoplasma vor und ist deswegen sehr schnell biologisch verfügbar; jedoch ist dieser Proteinkomplex auch sehr unspezifisch, es unterliegen zahlreiche Gene seiner Kontrolle<sup>91</sup>. So führt NF- $\kappa$ B in den meisten Fällen zu einer verstärkten Expression der von ihm abhängigen Gene, seltener zu einer Repression. Die größte Zahl der Gene ist im Rahmen der Immunantwort, der Zellproliferation oder der Apoptose angesiedelt.

---

<sup>91</sup> Brivanlou A. H., Darnell J. E., Signal Transduction and the Control of Gene Expression. Science 295, 813-818, 2002

## 5.5 Korrelation von sCD40L-Spiegeln und MIP-2-Spiegeln bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom

Nach Identifikation von MIP-2 als bislang noch nicht beschriebenem, verstärkt exprimiertem Chemokin nach sCD40L-Stimulation in HUVEC, erfolgte noch die Analyse von Blutseren bei zehn Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom bezüglich der Parameter sCD40L und MIP-2 im ELISA am Tag Katheterintervention sowie am Folgetag.

In den klinischen Proben – also in vivo – zeigte sich an Tag eins nach der Katheterintervention bei zehn Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom eine deutliche Korrelation zwischen endogenen sCD40L- und MIP-2-Leveln.

Wir konnten dazu in vitro erhöhte MIP-2-Level nach sCD40L-Stimulation auf transkriptionaler sowie translationaler Ebene mit unterschiedlichen Methoden nachweisen. Sicherlich ist die Aussagekraft bei einer Stichprobengröße von  $n = 10$  sehr begrenzt, daher erscheinen weitere Studien mit einem größeren Stichprobenumfang aufgrund der Tendenz der Ergebnisse sinnvoll.

Auch andere Arbeitsgruppen haben die Rolle des CD40-CD40L-Signaltransduktionsweges bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom klinisch untersucht. Viele Studien ergaben, dass zirkulierende sCD40L-Level bei Patienten mit einem ACS im Vergleich zur gesunden Population erhöht sind, jedoch zeigten auch viele Studien dazu konträre Ergebnisse ohne Korrelation<sup>1,92,93,94,95</sup>. Auch wurden genetisch bedingte Einflüsse wie z. B. Einzelnukleotid-Polymorphismen auf unterschiedlich hohe sCD40L-Level im ACS beschrieben.<sup>96</sup>

---

<sup>92</sup> Plaikner M., Peer A., and Falkensammer et al., Lack of association of soluble CD40 ligand with the presence of acute myocardial infarction or ischemic stroke in the emergency department. *Clin Chem*, 55 (2009), pp. 175-178

<sup>93</sup> Bavendiek U., Zirlik A., LaClair S., MacFarlane L., Libby P. and Schonbeck U., Atherogenesis in mice does not require CD40 ligand from bone marrow-derived cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (2005) pp. 1244-1249

<sup>94</sup> Apple F. S., Pearce L. A., Chung A., Ler R. and Murakami M. M., Multiple biomarker use for detection of adverse events in patients presenting with symptoms suggestive of acute coronary syndrome. *Clin Chem*, 53 (2007), pp. 874-881

<sup>95</sup> Tanne D., Haim M. and Goldbourt U. et al., CD40 ligand and risk of ischemic stroke or coronary events in patients with chronic coronary heart disease. *Int J Cardiol*, 107 (2006), pp. 322-326

<sup>96</sup> Marlastig A., Lindahl B., Wallentin L. and Siegbahn A., Soluble CD40L levels are regulated by the -3459 A>G polymorphism and predict myocardial infarction and the efficacy of antithrombotic treatment in non-ST elevation acute coronary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (2006), pp. 1667-1673



## 5.6 sCD40L und der Vorhersagewert für kardiovaskuläre Erkrankungen

Viele Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen erhöhten sCD40L-Werten und einem höheren Risiko für schwere kardiovaskuläre Ereignisse<sup>97</sup>, mit dreifach höherem Risiko für einen kardiovaskulär bedingten Tod oder akuten Myokardinfarkt<sup>26</sup> oder auch für eine Re-Stenose nach koronarer Angioplastie<sup>98</sup>. Im Gegensatz dazu haben zahlreiche andere Studien keinen guten Vorhersagewert hinsichtlich ACS und erhöhten sCD40L-Leveln gezeigt<sup>99,100,101</sup>.

## 5.7 Methodische Überlegungen

Die große Anzahl an Arbeiten zu messtechnischen Überlegungen von sCD40L-Spiegeln mag ein Hinweis auf die Ursachen der widersprüchlichen Ergebnisse der klinischen Studien sein. So konnten als Einflussgrößen für Messfehler das Probenmedium (Proben aus Serum oder Plasma)<sup>102</sup>, die Dauer der Lagerung bei Raumtemperatur (Schwellenwert 3h)<sup>103</sup>, oder auch Tag-/Nacht-Schwankungen der sCD40L-Level festgestellt werden<sup>104</sup>. Stets scheint der Aktivierungsstatus der Thrombozyten maßgeblich und ihre in vitro-Aktivierung eine wesentliche Fehlerquelle zu sein.

---

<sup>97</sup> Schonbeck U., Varo N., Libby P., Buring J. and Ridker P.M., Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation*, 104 (2001), 2266-2268

<sup>98</sup> L'Allier P.L., Tardif J.C. and Gregoire J. et al., Sustained elevation of serum CD40 ligand levels one month after coronary angioplasty predicts angiographic restenosis. *Can J Cardiol*, 21 (2005), 495-500

<sup>99</sup> Olenchock B.A., Wiviott S.D. and Murphy S.A. et al., Lack of association between soluble CD40L and risk in a large cohort of patients with acute coronary syndrome in OPUS TIMI-16. *J Thromb Thrombolysis*, 26 (2008), 79-84

<sup>100</sup> Morrow D.A., Sabatine M.S. and Brennan M.L. et al., Concurrent evaluation of novel cardiac biomarkers in acute coronary syndrome: myeloperoxidase and soluble CD40 ligand and the risk of recurrent ischaemic events in TACTICS-TIMI 18. *Eur Heart J*, 29 (2008), 1096-1102

<sup>101</sup> Saxena A.R., Seely E.W., Goldfine A.B., Cardiovascular risk factors and menstrual cycle phase in premenopausal women, *J Endocrinol Invest*. 2011 Oct 3.

<sup>102</sup> Rondina M.T., Lappe J.M., Carlquist J.F. et al., Soluble CD40 ligand as a predictor of coronary artery disease and long-term clinical outcomes in stable patients undergoing coronary angiography. *Cardiology*, 109 (2007), 196-201

<sup>103</sup> Varo N., Nuzzo R., Natal C., Libby P. and Schonbeck U., Influence of pre-analytical and analytical factors on soluble CD40L measurements. *Clin Sci (Lond)*, 111 (2006), 341-347

<sup>104</sup> Dominguez-Rodriguez A., Abreu-Gonzalez P., Garcia-Gonzalez M.J. and Kaski J.C., Diurnal variation of soluble CD40 ligand in patients with acute coronary syndrome. *Thromb Res*, 121 (2007), 293-299

## 5.8 Medikamentöse Therapie zur Senkung der CD40L-Spiegel

Da sich etwa 95% des im Blut zirkulierenden CD40-Liganden in Thrombozyten befinden, rückten diese auch als möglicher Zielpunkt in den Fokus der Forschung; Ziel ist es, die Ausschüttung und damit den Plasmaspiegel von CD40-Ligand zu regulieren. Bei Thrombozytenaggregationshemmern wie Clopidogrel oder Acetylsalicylsäure konnte nahezu komplett unterdrückte CD40-Ligand-Expression auf Thrombozyten sowie Plasmaspiegel an CD40L nachgewiesen werden<sup>105,106</sup>. Die Glykoprotein 2b/3a-Rezeptorblocker wie Eptifibatide, Abciximab und Tirofiban hemmen die Plättchenaggregation sowie die CD40-Ligand-Ausschüttung *in vitro*<sup>95</sup>. Das pleiotrope Wirkspektrum der Statine betrifft neben der Senkung des Cholesterinspiegels unter anderem auch die Endothelfunktion: So konnte in klinischen Studien bei Patienten mit einer KHK eine Senkung des Plasma-CD40L-Levels gemessen werden<sup>107</sup>. Die MIRACL-Studie zeigte, dass Patienten mit einem ACS und hohen CD40L-Spiegeln in Bezug auf zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse von einem frühen Therapiebeginn mit Atorvastatin profitieren<sup>108</sup>.

Der Insulin-Sensitizer Rosiglitazon bewirkte nach zwölfwöchiger Anwendung bei Patienten mit Diabetes mellitus und KHK eine signifikante Senkung des Serum-CD40L-Levels; dieser Effekt konnte allerdings nicht bei gesunden Patienten und auch nicht nach einem nur kurzen Anwendungsintervall gezeigt werden<sup>109,110</sup>.

---

<sup>105</sup> Yip H.K., Chang L.T., Sun C.K. et al., Impact of clopidogrel on suppression of circulating levels of soluble CD40 ligand in patients with unstable angina undergoing coronary stenting. *Am J Cardiol*, 97 (2006), 192-194

<sup>106</sup> Nannizzi-Alaimo L., Alves V.L. and Phillips D.R., Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation*, 107 (2003), 1123-1128

<sup>107</sup> Li J., Zhao S.P., Peng D.Q., Xu Z.M. and Zhou H.N., Early effect of pravastatin on serum soluble CD40L, matrix metalloproteinase-9, and C-reactive protein in patients with acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 50 (2004), 1696-1699

<sup>108</sup> Schwartz G.G., Olsson A.G., Ezekowitz M.D., Ganz P., Oliver M.F. et al. (2001) Myocardial ischemia reduction with aggressive cholesterol lowering (MIRACL) study investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes. The MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA* 285: 1711-1718

<sup>109</sup> Marx N., Imhof A., Froehlich J. et al., Effect of rosiglitazone treatment on soluble CD40L in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Circulation*, 107 (2003), 1954-1957

<sup>110</sup> Hetzel P.J., Balletshofer B., Rittig K. et al., Rapid effects of rosiglitazone treatment on endothelial function and inflammatory biomarkers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (2005), 1804-1809

## 5.9 CD40/sCD40L als mögliches therapeutisches Target

Nach den ersten Berichten zum CD40/CD40L-Signaltransduktionsweg wurden die Überlegungen und Studien, CD40/CD40L als direktes therapeutisches Ziel zu sehen, zahlreicher. So konnten in Tierversuchen durch anti-CD40L-Antikörpergaben sowohl eine Größenabnahme der atherosklerotischen Läsionen als auch eine erhöhte Plaquestabilität gezeigt werden<sup>34,54,111</sup>. Allerdings zeigte sich sowohl bei CD40L  $\gamma/\gamma$ -Mäusen als auch bei Patienten, welche CD40L-Antikörper erhielten, eine erhöhte Rate an thrombembolischen Komplikationen aufgrund einer gestörten Plättchenfunktion durch CD40/CD40L-Immunkomplexe. Eine aktuelle Studie von Wolf et al. zeigte nun erstmalig einen alternativen Signaltransduktionsweg über den Mac-1-Rezeptor; hier ergab sich im Mausmodell das Ausbleiben der unerwünschten immunologischen und thrombotischen Effekte der globalen CD40L-Blockade<sup>112</sup>. Die Charakterisierung des veränderten Gen- und Proteinprofiles in Endothelzellen nach sCD40L-Stimulation trägt dazu bei, die Rolle der CD40-Rezeptor-sCD40L-Interaktionen im Gesamtbild des akuten Koronarsyndromes zu beleuchten und hilft bei der Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Ansätze.

Aus diesem Grund erscheinen weitere Studien zur Hochregulation von MIP-2 sinnvoll, um grundlegende Zusammenhänge zwischen thrombotischen Ereignissen wie dem akuten Koronarsyndrom und chronisch entzündlichen Prozessen wie der Atherosklerose sowie in Bezug auf ein mögliches Biomarker-Potential aufzuklären. Studien dazu könnten neue Ansichten zur Prävention des Progresses der Atherosklerose sowie neue therapeutische Ansätze im Hinblick auf das akute Koronarsyndrom liefern.

---

<sup>111</sup> Schonbeck U. et al., CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 2000; 156: 7-14.

<sup>112</sup> Wolf D., Hohmann J.D., Wiedemann A., Bledzka K., Blankenbach H., Marchini T., Gutte K., Zeschky K., Bassler N., Hoppe N., Rodriguez A.O., Herr N., Hilgendorf I., Stachon P., Willecke F., Dürschmied D., von zur Muhlen C., Soloviev D.A., Zhang L., Bode C., Plow E.F., Libby P., Peter K., Zirlik A., Binding of CD40L to Mac-1's I-domain involves the EQLKSKTL motif and mediates leukocyte recruitment and atherosclerosis – but does not affect immunity and thrombosis in mice. *Circ Res.* 2011;109:1269-1279

## 6 Zusammenfassung

Das akute Koronarsyndrom ist mit einer Ausschüttung von sCD40-Ligand vergesellschaftet. Die Rolle von sCD40-Ligand als Schlüsselspieler in der Pathogenese der Atherosklerose sowie in der Entstehung eines akuten Koronarsyndromes ist vielfach publiziert worden. Endothelzellen als Grenzfläche zwischen Blut- und Parenchymzellen nehmen an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen wie Entzündungsvorgängen teil; daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein verändertes Expressionsprofil von Endothelzellen nach sCD40-Ligand-Stimulation zu untersuchen.

Wir konnten eine verstärkte Expression vieler proinflammatorischer Mediatoren auf Genexpressionsebene messen. Zudem zeigte sich eine deutlich hochregulierte Genexpression von MIP-2, auch GRO-beta oder CXCL2 genannt. Dies konnten wir zunächst mittels real-time-PCR und dem Micro-Array, anschließend auch auf der Proteinebene aus den Zellüberständen mittels der ELISA-Analyse zeigen. In klinischen Serumproben von Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom (ACS) konnte letztlich noch eine deutliche Korrelation zwischen sCD40-Ligand-Spiegeln und MIP-2-Spiegeln in der ELISA-Analyse gemessen werden. Proinflammatorische Mediatoren wie MIP-2 spielen in der Chemoattraktion der Makrophagen eine wichtige Rolle. Dies unterstreicht die Schlüsselfunktion von sCD40-Ligand als verbindendes Element zwischen thrombotischen Ereignissen wie dem ACS und entzündlichen Prozessen wie der Atherosklerose. Deshalb könnte die Erforschung der MIP-2-Hochregulation viel Potenzial für neue Erkenntnisse zur Prävention des Progresses der Atherosklerose sowie für neue therapeutische Ansätze des akuten Koronarsyndromes beinhalten.

## 7 Summary

Acute coronary syndromes (ACS) have been associated with sCD40 Ligand (sCD40L) release. It has been suggested that CD40L is a key player in the pathogenesis of atherosclerosis and ACS. Endothelial cells are located at the interface between blood and parenchymal cells and take active part in many physiological and pathological processes, including inflammation. Therefore, the aim of the present study was to investigate differential gene expression profiles of endothelial cells after stimulation with sCD40L.

Stimulation of HUVEC with sCD40L leads to a profound release of proinflammatory mediators on a transcriptional level. In addition, gene expression profiling revealed a highly significant increase in expression of the macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2), also known as GRO-beta or CXCL2. This was quantitated by real-time-PCR as well as in microarray analysis, on a translational level this was quantitated by ELISA analysis derived from supernatants. In clinical serum samples from ACS patients there was a highly significant correlation between sCD40L and MIP-2.

Proinflammatory mediators as well as MIP-2 play an important role in the chemoattraction of macrophages, which underlines the key role of CD40L as a link between thrombotic events, e.g. ACS, and inflammatory processes, e.g. atherosclerosis. Therefore targeting MIP-2 up-regulation might be a potential approach to prevent the progression of atherosclerotic diseases as well as a new therapeutic approach to treat ACS.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACS	Acute Coronary Syndrome
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cpm	Counts pro Minute
CT-Wert	cycle threshold-Wert, Zyklus-Schwellenwert
dATP	Desoxynukleosid-Adenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiotreitol
ECGS/H2	Endotheliales Zell-Wachstum-Supplement/Heparin
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ELISA	Enzym-linked-immunosorbent Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FCS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GC-Gehalt	Anteil der DNA-Basen Guanin und Cytosin
hbFG	humaner rekomb. Basis-Fibroblasten-Wachstumsfaktor
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
HC 500	Hydrocortison (500µg/ml)
hEGF	Humaner rekombinanter epidermaler Wachstumsfaktor
HRP	Meerrettichperoxidase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IKK	Inhibitor of NF-κB Kinase
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
ISGF	Interferon Stimulated Gene Factor
JNK	c-Jun N-terminale Kinase

kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant Protein 1
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein 2
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
NO	Stickoxid
OD	optische Dichte
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SEM	Standard Error of the Mean
TAE	Tris Acid
TBE	Tris Borsäure EDTA
TF	Tissue Factor
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren
TWEEN	Polyoxethylensorbitanmonolaurate
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Möglichkeiten eines Atheroms.....	3
Abbildung 2: Terminologie Akutes Koronarsyndrom .....	6
Abbildung 3: Die Signaltransduktionswege des CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Systems .....	11
Abbildung 4: Typischer real-time-PCR Amplifikationsplot (www.qiagen.com) .....	20
Abbildung 5: Das Prinzip eines cDNA-Macro-Arrays .....	25
Abbildung 6: Unterschiedliche Genexpressionsprofile nach Stimulation .....	31
Abbildung 7: Die Aktivierung der p38 Map Kinase als Effekt der sCD40L-Stimulation .....	44
Abbildung 8: Die Signaltransduktionswege des CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Systems .....	45
Abbildung 9: Der Effekt von sCD40L auf die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B .....	46

## 10 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Effekt von sCD40L auf die MIP-2-Genexpression in HUVEC.....	35
Diagramm 2: Der Effekt von sCD40L auf die MIP-2 Genexpression in HUVEC .....	36
Diagramm 3: Der Effekt von sCD40L auf die MIP-2 Genexpression in HUVEC .....	388
Diagramm 4: Der Effekt von sCD40L auf die ISGF Genexpression in HUVEC.....	399
Diagramm 5: Effekt von sCD40L auf die IL-8-Genexpression in HUVEC .....	40
Diagramm 6: Der Effekt von sCD40L auf die IL-8-Genexpression in HUVEC .....	41
Diagramm 7: Der Effekt von sCD40L auf die MCP-1 Genexpression in HUVEC.....	42
Diagramm 8: Der Effekt von sCD40L auf die MCP-1 Genexpression in HUVEC.....	43
Diagramm 9: Effekt von sCD40L auf die MIP-2 Proteinsynthese in HUVEC im ELISA .....	49
Diagramm 10: Effekt von sCD40L auf die IL-8 Proteinsynthese in HUVEC im ELISA .....	50
Diagramm 11: Effekt von sCD40L auf die IL-6 Proteinsynthese in HUVEC im ELISA .....	51



## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Differentiell exprimierte Gene im Microarray nach sCD40L-Stimulation.....	32 - 34
Tabelle 2: Primärantikörper .....	87
Tabelle 3: Sekundärantikörper .....	87
Tabelle 4: Primer- und Sonden-Sequenzen der RT-PCR.....	88

## 12 Quellenangaben in numerischer Reihenfolge

- 1 Antoniadis C., Tousoulis D., Vasiliadou C., Stefanadi E., Marinou K. and Stefanadis C., Genetic polymorphisms of platelet glycoprotein Ia and the risk for premature myocardial infarction: effects on the release of sCD40L during the acute phase of premature myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 47 (2006) pp. 1959-1966
- 2 Ming Wang, Yan Li, Wen Li, Zun-en Xia, and Qing Wu., *DNA and Cell Biology*. March (2011), 30(3): 173-178.
- 3 Tousoulis D., Antoniadis C. and Stefanadis C., Assessing inflammatory status in cardiovascular disease. *Heart*, **93** (2007), pp. 1001–1007
- 4 Statistisches Bundesamt Deutschland, Wiesbaden. Todesursachenstatistik 2010
- 5 Statistisches Bundesamt Deutschland, Wiesbaden. Krankheitskostenstatistik 2010
- 6 Riede U.-N. a. S. H. E., *Allgemeine und spezielle Pathologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York, (1993) A.D
- 7 Maclellan W.A., Wang Y., Lusic A.J., Systems-based approaches to cardiovascular diseases, *Nat. Rev. Cardiol.* (2012).
- 8 Libby P., Inflammation in atherosclerosis, *Nature* 420 (2002) 868-874
- 9 Scheuner M. T., Genetic predisposition to coronary artery disease, *Curr.Opin.Cardiol.* 16 (2001) 251-260.
- 10 Hegele R. A., Candidate genes, small effects, and the prediction of atherosclerosis, *Crit Rev.Clin.Lab Sci.* 34 (1997) 343-367
- 11 Marenberg M. E., Risch N., Berkman L. F., Floderus B., Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins, *N.Engl.J.Med.* 330 (1994) 1041-1046

- 12** Asahina M., Mashimo T., Takeyama M., Tozawa R., Hashimoto T., Takizawa A., Ueda M., Aoto T., Kuramoto T., Serikawa T., Hypercholesterolemia and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor mutant rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012
- 13** Miserez A. R. and Braun J. R., Application of genetic principles to the causal assessment of atherosclerosis, *Ther.Umsch.* 52 (1995) 835-843.
- 14** Pamukcu B., Lip G.Y., Snezhitskiy V., Shantsila E., The CD40-CD40L System in cardiovascular disease, *Ann. Med.* (2011)Aug;43(5):331-340
- 15** Ross R. and Glomset J. A., The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts), *N.Engl.J.Med.* 295 (1976) 369-377
- 16** Ross R. and Glomset J. A., The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts), *N.Engl.J.Med.* 295 (1976) 420-425
- 17** Hansson G. K., Immune mechanisms in atherosclerosis, *Arterioscler.Thromb. Vasc.Biol.* 21 (2001) 1876-1890
- 18** Glass C. K. and Witztum J. L., Atherosclerosis. The road ahead, *Cell* 104 (2001) 503-516
- 19** Topper J. N., Cai J., Falb D. and Gimbrone M. A. Jr., Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 (1996) 10417-10422
- 20** De C. R., Libby P., Peng H. B., Thannickal V. J., Rajavashisth T. B., Gimbrone M. A. Jr., Shin W. S. and Liao J. K., Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines, *J.Clin.Invest* 96 (1995) 60-68
- 21** Nagel T., Resnick N., Atkinson W. J., Dewey C. F., and Gimbrone M. A. Jr., Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells, *J.Clin.Invest* 94 (1994) 885-891
- 22** Hansson G. K., Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, *N.Engl.J.Med.* 352 (2005) 1685-1695
- 23** Ross R., Atherosclerosis – an inflammatory disease, *N.Engl.J.Med.* 340 (1999) 115-126
- 24** Eo H.S., Lee K.B., Kim A.K., Kim M.H., Kim D.H., Kim D.I., Association with inflammatory cells and apolipoproteins to the progression of atherosclerosis. *J Korean Surg Soc.* (2011) Apr;80(4):289-296

- 25** Schwartz S. M., Virmani R. and Rosenfeld M. E., The good smooth muscle cells in atherosclerosis, *Curr.Atheroscler.Rep.* 2 (2000) 422-429.
- 26** Heeschen C., Dimmeler S., Hamm C. W., van den Brand M. J., Boersma E., Zeiher A. M. and Simoons M. L., Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes, *N.Engl.J.Med.* 348 (2003) 1104-1111.
- 27** Hamm, C. W., Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS), *Z Kardiol* 93: 72-90 (2004)
- 28** Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J.* (2011);32:2999–305
- 29** Steg PG, James SK, Atar D, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting with ST-segment elevation *Eur Heart J.* (2012) Oct; 33(20):2569-619.
- 30** Paulie S., Ehlin-Henriksson B., Mellstedt H., Koho H., Ben-Aissa H. and Perlmann P., A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes, *Cancer Immunol.Immunother.* 20 (1985) 23-28
- 31** Paulie S., Koho H., Ben-Aissa H., Hansson Y., Lundblad M. L. and Perlmann P., Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. II. Identification of the cellular target structures by immunoprecipitation and SDS-PAGE analysis, *Cancer Immunol.Immunother.* 17 (1984) 173-179
- 32** Robertson A.K., Hansson G.K.: T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: (2006) 2421-2432.
- 33** Anand S. X., Viles-Gonzalez J. F., Badimon J. J., Cavusoglu E. and Marmur J. D., Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease, *Thromb.Haemost.* 90 (2003) 377-384
- 34** Schonbeck U., Mach F., and Libby P., CD154 (CD40 ligand), *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 32 (2000) 687-693
- 35** Stumpf C., Lehner C., Eskafi S., Raaz D., Yilmaz A., Ropers S., Schmeisser A., Ludwig J., Daniel W. G. and Garlich C. D., Enhanced levels of CD154 (CD40 ligand) on platelets in patients with chronic heart failure, *Eur.J.Heart Fail.* 5 (2003) 629-637
- 36** Schonbeck U., Sukhova G. K., Shimizu K., Mach F. and Libby P., Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000) 7458-7463

- 37** Armitage R. J., Fanslow W. C., Strockbine L., Sato T. A., Clifford K. N., Macduff B. M., Anderson D. M., Gimpel S. D., vis-Smith T., Maliszewski C. R., Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40, *Nature* 357 (1992) 80-82
- 38** Hollenbaugh D., Grosmaire L. S., Kullas C. D., Chalupny N. J., Braesch-Andersen S., Noelle R. J., Stamenkovic I., Ledbetter J. A. and Aruffo A., The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity, *EMBO J.* 11 (1992) 4313-4321
- 39** Lederman S., Yellin M. J., Krichevsky A., Belko J., Lee J. J. and Chess L., Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation *J.Exp.Med.* 175 (1992) 1091-1101
- 40** Noelle R. J., Roy M., Shepherd D. M., Stamenkovic I., Ledbetter J. A. and Aruffo A., A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (1992) 6550-6554
- 41** Graf D., Korthauer U., Mages H. W., Senger G. and Kroczeck R. A., Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells, *Eur.J.Immunol.* 22 (1992) 3191-3194
- 42** Andre P., Nannizzi-Alaimo L., Prasad S. K. and Phillips D. R., Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease, *Circulation* 106 (2002) 896-899.
- 43** Lievens D., von Hundelshausen P., Platelets in atherosclerosis, *Thromb Haemost.* (2011) Nov 3;106(5):827-838.
- 44** Graf D., Muller S., Korthauer U., van K. C., Weise C. and Kroczeck R. A., A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation, *Eur.J.Immunol.* 25 (1995) 1749-1754
- 45** Ludewig B., Henn V., Schroder J. M., Graf D. and Kroczeck R. A., Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4+ CD45RA+ T cells with dendritic cells, *Eur.J.Immunol.* 26 (1996) 3137-3143
- 46** Wykes M., Poudrier J., Lindstedt R., and Gray D., Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells, *Eur.J.Immunol.* 28 (1998) 548-559
- 47** Mazzei G. J., Edgerton M. D., Losberger C., Lecoanet-Henchoz S., Graber P., Durandy A., Gauchat J. F., Bernard A., Allet B. and Bonnefoy J. Y., Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active, *J.Biol.Chem.* 270 (1995) 7025-7028

- 48** Schonbeck U. and Libby P., The CD40/CD154 receptor/ligand dyad, *Cell Mol.Life Sci.* 58 (2001) 4-43
- 49** Rickert R. C., Jellusova J. and Miletic A. V., Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. *Immunological Reviews*, 244: (2011) 115-133.
- 50** Whitmarsh A.J., A central role for p38 MAPK in the early transcriptional response to stress. *BMC Biol.* (2010);8:47
- 51** Mukundan L., Milhorn D. M., Matta B. and Suttles J., CD40-mediated activation of vascular smooth muscle cell chemokine production through a Src-initiated, MAPK-dependent pathway, *Cell Signal.* 16 (2004) 375-384
- 52** Mukundan L., Bishop G. A., Head K. Z., Zhang L., Wahl L. M. and Suttles J., TNF receptor-associated factor 6 is an essential mediator of CD40-activated proinflammatory pathways in monocytes and macrophages, *J.Immunol.* 174 (2005) 1081-1090
- 53** Engel D. et al., The immunobiology of CD154-CD40-TRAF interactions in atherosclerosis. *Semin Immunol* (2009); 21: 308-312.
- 54** Xia M., Ling W., Zhu H., Wang Q., Ma J. et al., Anthocyanin prevents CD40-activated proinflammatory signaling in endothelial cells by regulating cholesterol distribution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2007); 27:519-524
- 55** Lutgens E., Lievens D., Beckers L., Donners M., Daemen M., CD40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* (2007);17:118-123
- 56** Mach F., Schonbeck U., Sukhova G. K., Atkinson E. and Libby P., Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling, *Nature* 394 (1998) 200-203
- 57** Lutgens E., Cleutjens K. B., Heeneman S., Kotliansky V. E., Burkly L. C. and Daemen M. J., Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000) 7464-7469
- 58** Cella M., Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., Lane P., Lanzavecchia A. and Alber G., Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation, *J.Exp.Med.* 184 (1996) 747-752
- 59** Peng X., Remacle J. E., Kasran A., Huylebroeck D. and Ceuppens J. L., IL-12 up-regulates CD40 ligand (CD154) expression on human T cells, *J.Immunol.* 160 (1998) 1166-1172

- 60** Mach F., Schonbeck U., Bonnefoy J. Y., Pober J. S., and Libby P., Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor, *Circulation* 96 (1997) 396-399
- 61** Thim T., Hagensen M. K., Bentzon J. F., and Falk E., From vulnerable plaque to atherothrombosis, *J.Intern.Med.* 263 (2008) 506-516
- 62** Fernández Bello I., Alvarez M.T., López-Longo F.J., Arias-Salgado E.G., Martín M., Jiménez-Yuste V., Rodríguez de la Rúa A., Butta N.V., Platelet soluble CD40L and matrix metalloproteinase 9 activity are proinflammatory mediators in Behcet disease patients, *Thromb Haemost.* (2012) Jan 3;107(1):88-98
- 63** Refaai M., Phipps R., Spinelli S., Blumberg N. Platelet transfusions – impact on hemostasis, thrombosis, inflammation, and clinical outcomes. *Thromb Res* 127: 287-291 (2011)
- 64** Henn V., Slupsky J. R., Grafe M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G. and Kroczeck, R. A., CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells, *Nature* 391 (1998) 591-594
- 65** Urbich C., Dernbach E., Aicher A., Zeiher A. M. and Dimmeler S., CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species, *Circulation* 106 (2002) 981-986
- 66** Cipollone F., Chiarelli F., Davi G., Ferri C., Desideri G., Fazio M., Iezzi A., Santilli F., Pini B., Cucurullo C., Tumini S., Del P. A., Santucci A., Cucurullo F. and Mezzetti A., Enhanced soluble CD40 ligand contributes to endothelial cell dysfunction in vitro and monocyte activation in patients with diabetes mellitus: effect of improved metabolic control, *Diabetologia* 48 (2005) 1216-1224
- 67** Bavendiek U., Libby P., Kilbride M., Reynolds R., Mackman N. and Schonbeck U., Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1, *J.Biol.Chem.* 277 (2002) 25032-25039
- 68** Peng D.Q., Zhao S.P., Li Y.F., Li J. and Zhou H.N., Elevated soluble CD40 ligand is related to the endothelial adhesion molecules in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*, 319 (2002), 19-26
- 69** Oemrawsingh RM, Lenderink T, Akkerhuis KM, Heeschen C, Baldus S, Fichtlscherer S, Hamm CW, Simoons ML, Boersma E., Multimarker risk model containing troponin-T, interleukin 10, myeloperoxidase and placental growth factor

predicts long-term cardiovascular risk after non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Heart*. (2011);97:1061-1066

**70** Jaffe E. A., Nachman R. L., Becker C. G. and Minick C. R., Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria, *J.Clin.Invest* 52 (1973) 2745-2756

**71** Flaxenburg J.A., Melter M., Lapchak P.H., Briscoe D.M., Pal S., The CD40-induced signaling pathway in endothelial cells resulting in the overexpression of vascular endothelial growth factor involves Ras and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol*. (2004); 172:7503-7509

**72** Karmann K., Hughes C.C., Schechner J., Fanslow W.C. and Pober J.S., CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4342 (1995)

**73** Mullis K. B. and Faloona F. A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol*. 155 (1987) 335-350

**74** Chomczynski P. and Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal.Biochem*. 162 (1987) 156-159

**75** Pfaffl M. W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res*. 29 (2001)

**76** Sherlock G. Analysis of large-scale gene expression data. *Curr. Opin. Immunol*. (2000);121(1):201–205

**77** modifiziert nach: [https://www.pateur.fr/recherche/genopole/PF2/principe\\_en.htm](https://www.pateur.fr/recherche/genopole/PF2/principe_en.htm)

**78** Muth H., Kreis I., Zimmermann R., Tillmanns H., Hölschermann H., Differential gene expression in activated monocyte-derived macrophages following binding of factor VIIa to tissue factor. *Thromb Haemost*. (2005);94:1028-1034

**79** Haferlach T., Kohlmann A., Wiczorek L., Basso G., Kronnie G.T., Béné M.C., De Vos J., Hernández J.M., Hofmann W.K., Mills K.I. et al., Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: Report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J. Clin. Oncol*. (2010);28:2529-2537.

**80** Renart J, Reiser J, Stark GR, R G. Transfer of proteins from gels to diazobenzylmethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1979);76(7):3116–3120

- 81** Leng S.X., McElhane J.E., Walston J.D., Xie D., Fedarko N.S., Kuchel G.A. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* (2008);63:879–88
- 82** Kerr LD. Electrophoretic mobility shift assay. *Methods Enzymol.* (1995);254:619–632. doi: 10.1016/0076-6879(95)54044
- 83** Livak K.J., Schmittgen D.T., Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* (2001); 25: 402-408
- 84** Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A et al., A novel kinase cascade triggered by stress an heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell.* (1994); 78:1027-1037
- 85** Garner M.M., Revzin A., A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* (1981); 9:3047-3060
- 86** Farlik M., Reutterer B., Schindler C., Greten F., Vogl C. et al., Nonconventional initiation complex assembly by STAT and NF-kappaB transcription factors regulates nitric oxide synthase expression. *Immunity* (2010);33:25-34
- 87** Aukrust P., Damas J.K. and Solum N.O., Soluble CD40 ligand and platelets: self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation?. *J Am Coll Cardiol*, 43 (2004), 2326-2328
- 88** Tedgui A., Mallat Z., Cytokines in atherosclerosis pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* (2006); 86: 515-581
- 89** Kleemann R. et al., Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* (2008); 79: 360-376.
- 90** Charo I.F., Ransohoff R.M., The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* (2006); 354: 610-621
- 91** Brivanlou A.H., Darnell J.E., Signal Transduction and the Control of Gene Expression. *Science* 295, 813-818, (2002)
- 92** Plaikner M., Peer A. and Falkensammer et al., Lack of association of soluble CD40 ligand with the presence of acute myocardial infarction or ischemic stroke in the emergency department. *Clin Chem*, 55 (2009), pp. 175-178
- 93** Bavendiek U., Zirlik A., LaClair S., MacFarlane L., Libby P. and Schonbeck U., Atherogenesis in mice does not require CD40 ligand from bone marrow-derived cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (2005) pp. 1244-1249



- 94** Apple F. S., Pearce L. A., Chung A., Ler R. and Murakami M. M., Multiple biomarker use for detection of adverse events in patients presenting with symptoms suggestive of acute coronary syndrome. *Clin Chem*, 53 (2007), pp. 874-881
- 95** Tanne D., Haim M. and Goldbourt U. et al., CD40 ligand and risk of ischemic stroke or coronary events in patients with chronic coronary heart disease. *Int J Cardiol*, 107 (2006), pp. 322-326
- 96** Malarstig A., Lindahl B., Wallentin L. and Siegbahn A., Soluble CD40L levels are regulated by the -3459 A>G polymorphism and predict myocardial infarction and the efficacy of antithrombotic treatment in non-ST elevation acute coronary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (2006), 1667-1673
- 97** Schonbeck U., Varo N., Libby P., Buring J. and Ridker P.M., Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation*, 104 (2001), 2266-2268
- 98** L'Allier P.L., Tardif J.C. and Gregoire J. et al., Sustained elevation of serum CD40 ligand levels one month after coronary angioplasty predicts angiographic restenosis. *Can J Cardiol*, 21 (2005), 495-500
- 99** Olenchock B.A., Wiviott S.D. and Murphy S.A. et al., Lack of association between soluble CD40L and risk in a large cohort of patients with acute coronary syndrome in OPUS TIMI-16. *J Thromb Thrombolysis*, 26 (2008), 79-84
- 100** Morrow D.A., Sabatine M.S. and Brennan M.L. et al., Concurrent evaluation of novel cardiac biomarkers in acute coronary syndrome: myeloperoxidase and soluble CD40 ligand and the risk of recurrent ischaemic events in TACTICS-TIMI 18. *Eur Heart J*, 29 (2008), 1096-1102
- 101** Saxena A.R., Seely E.W., Goldfine A.B., Cardiovascular risk factors and menstrual cycle phase in premenopausal women, *J Endocrinol Invest*. (2011) Oct 3.
- 102** Rondina M.T., Lappe J.M., Carlquist J.F. et al., Soluble CD40 ligand as a predictor of coronary artery disease and long-term clinical outcomes in stable patients undergoing coronary angiography. *Cardiology*, 109 (2007), 196-201
- 103** Varo N., Nuzzo R., Natal C., Libby P. and Schonbeck U., Influence of pre-analytical and analytical factors on soluble CD40L measurements. *Clin Sci (Lond)*, 111 (2006), 341-347
- 104** Dominguez-Rodriguez A., Abreu-Gonzalez P., Garcia-Gonzalez M.J. and Kaski J.C., Diurnal variation of soluble CD40 ligand in patients with acute coronary syndrome. *Thromb Res*, 121 (2007), 293-299

- 105** Yip H.K., Chang L.T., Sun C.K. et al., Impact of clopidogrel on suppression of circulating levels of soluble CD40 ligand in patients with unstable angina undergoing coronary stenting. *Am J Cardiol*, 97 (2006), 192-194
- 106** Nannizzi-Alaimo L., Alves V.L. and Phillips D.R., Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation*, 107 (2003), 1123-1128
- 107** Li J., Zhao S.P., Peng D.Q., Xu Z.M. and Zhou H.N., Early effect of pravastatin on serum soluble CD40L, matrix metalloproteinase-9, and C-reactive protein in patients with acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 50 (2004), 1696-1699
- 108** Schwartz G.G., Olsson A.G., Ezekowitz M.D., Ganz P., Oliver M.F. et al., (2001) Myocardial ischemia reduction with aggressive cholesterol lowering (MIRACL) study investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes. The MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA* 285: 1711-1718
- 109** Marx N., Imhof A., Froehlich J. et al., Effect of rosiglitazone treatment on soluble CD40L in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Circulation*, 107 (2003), 1954-1957
- 110** Hetzel P.J., Balletshofer B., Rittig K. et al., Rapid effects of rosiglitazone treatment on endothelial function and inflammatory biomarkers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (2005), 1804-1809
- 111** Schonbeck U. et al., CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* (2000); 156: 7-14
- 112** Wolf D., Hohmann J.D., Wiedemann A., Bledzka K., Blankenbach H., Marchini T., Gutte K., Zeschky K., Bassler N., Hoppe N., Rodriguez A.O., Herr N., Hilgendorf I., Stachon P., Willecke F., Dürschmied D., von zur Muhlen C., Soloviev D.A., Zhang L., Bode C., Plow E.F., Libby P., Peter K., Zirlik A., Binding of CD40L to Mac-1's I-domain involves the EQLKKSRTL motif and mediates leukocyte recruitment and atherosclerosis – but does not affect immunity and thrombosis in mice. *Circ Res.* (2011);109:1269-1279

### 13 Alphabetisches Literaturverzeichnis

**Anand** S. X., Viles-Gonzalez J. F., Badimon J. J., Cavusoglu E. and Marmur J. D., Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease, *Thromb.Haemost.* 90 (2003) 377-384

**Andre** P., Nannizzi-Alaimo L., Prasad S. K. and Phillips D. R., Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease, *Circul.* 106 (2002) 896-899.

**Antoniades** C., Tousoulis D., Vasiliadou C., Stefanadi E., Marinou K., Stefanadis C., Genetic polymorphisms of platelet glycoprotein Ia and the risk for premature myocardial infarction: effects on the release of sCD40L during the acute phase of premature myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 47 (2006) pp. 1959-1966

**Apple** F. S., Pearce L. A., Chung A., Ler R. and Murakami M. M., Multiple biomarker use for detection of adverse events in patients presenting with symptoms suggestive of acute coronary syndrome. *Clin Chem*, 53 (2007), pp. 874-881

**Armitage** R. J., Fanslow W. C., Strockbine L., Sato T. A., Clifford K. N., Macduff B. M., Anderson D. M., Gimpel S. D., van-Smith T., Maliszewski C. R., Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40, *Nature* 357 (1992) 80-82

**Asahina** M., Mashimo T., Takeyama M., Tozawa R., Hashimoto T., Takizawa A., Ueda M., Aoto T., Kuramoto T., Serikawa T., Hypercholesterolemia and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor mutant rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012

**Aukrust** P., Damas J.K. and Solum N.O., Soluble CD40 ligand and platelets: self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation?. *J Am Coll Cardiol*, 43 (2004), 2326-2328

**Bavendiek** U., Libby P., Kilbride M., Reynolds R., Mackman N. and Schonbeck U., Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1, *J.Biol.Chem.* 277 (2002) 25032-25039

**Bavendiek** U., Zirlik A., LaClair S., MacFarlane L., Libby P. and Schonbeck U., Atherogenesis in mice does not require CD40 ligand from bone marrow-derived cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (2005) pp. 1244-1249

**Brivanlou** A.H., Darnell J.E: Signal Transduction and the Control of Gene Expression. *Science* 295, 813-818, (2002)

**Cella M.**, Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., Lane P., Lanzavecchia A. and Alber G., Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation, *J.Exp.Med.* 184 (1996) 747-752

**Charo I.F.**, Ransohoff R.M., The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* (2006); 354: 610-621

**Chomczynski P.** and Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal.Biochem.* 162 (1987) 156-159

**Cipollone F.**, Chiarelli F., Davi G., Ferri C., Desideri G., Fazia M., Iezzi A., Santilli F., Pini B., Cuccurullo C., Tumini S., Del P. A., Santucci A., Cuccurullo F. and Mezzetti A., Enhanced soluble CD40 ligand contributes to endothelial cell dysfunction in vitro and monocyte activation in patients with diabetes mellitus: effect of improved metabolic control, *Diabetologia* 48 (2005) 1216-1224

**De C. R.**, Libby P., Peng H. B., Thannickal V. J., Rajavashisth T. B., Gimbrone M. A. Jr., Shin W. S. and Liao J. K., Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines, *J.Clin.Invest* 96 (1995) 60-68

**Dominguez-Rodriguez A.**, Abreu-Gonzalez P., Garcia-Gonzalez M.J. and Kaski J.C., Diurnal variation of soluble CD40 ligand in patients with acute coronary syndrome. *Thromb Res*, 121 (2007), 293-299

**Engel D.** et al., The immunobiology of CD154-CD40-TRAF interactions in atherosclerosis. *Semin Immunol* (2009); 21: 308-312.

**EO H.S.**, Lee K.B., Kim A.K., Kim M.H., Kim D.H., Kim D.I., Association with inflammatory cells and apolipoproteins to the progression of atherosclerosis. *J Korean Surg Soc.* (2011) Apr;80(4):289-296

**Farlik M.**, Reutterer B., Schindler C., Greten F., Vogl C. et al., Nonconventional initiation complex assembly by STAT and NF-kappaB transcription factors regulates nitric oxide synthase expression. *Immunity* (2010); 33:25-34

**Fernández Bello I.**, Alvarez M.T., López-Longo F.J., Arias-Salgado E.G., Martín M., Jiménez-Yuste V., Rodríguez de la Rúa A., Butta N.V., Platelet soluble CD40L and matrix metalloproteinase 9 activity are proinflammatory mediators in Behcet disease patients, *Thromb Haemost.* (2012) Jan 3;107(1):88-98

- Flaxenburg** J.A., Melter M., Lapchak P.H., Briscoe D.M., Pal S., The CD40-induced signaling pathway in endothelial cells resulting in the overexpression of vascular endothelial growth factor involves Ras and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol.* (2004); 172:7503-7509
- Garner** M.M., Revzin A., A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* (1981); 9:3047-3060
- Glass** C. K. and Witztum J. L., Atherosclerosis. The road ahead, *Cell* 104 (2001) 503-516
- Graf** D., Korthauer U., Mages H. W., Senger G. and Kroczeck R. A., Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells, *Eur.J.Immunol.* 22 (1992) 3191-3194
- Graf** D., Muller S., Korthauer U., van K. C., Weise C. and Kroczeck R. A., A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation, *Eur.J.Immunol.* 25 (1995) 1749-1754
- Haferlach** T., Kohlmann A., Wieczorek L., Basso G., Kronnie G.T., Béné M.C., De Vos J., Hernández J.M., Hofmann W.K., Mills K.I. et al., Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: Report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J. Clin. Oncol.* (2010);28:2529-2537.
- Hamm** C. W., Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS), *Z Kardiol* 93: 72-90 (2004)
- Hamm** CW, Bassand JP, Agewall S, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J.* (2011);32:2999–305
- Hansson** G. K., Immune mechanisms in atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 1876-1890
- Hansson** G. K., Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, *N.Engl.J.Med.* 352 (2005) 1685-1695
- Heeschen** C., Dimmeler S. and Hamm C.W. et al., Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 348 (2003), 1104-1111
- Hegele** R. A., Candidate genes, small effects, and the prediction of atherosclerosis, *Crit Rev.Clin.Lab Sci.* 34 (1997) 343-367
- Henn** V., Slupsky J. R., Grafe M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G. and Kroczeck, R. A., CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells, *Nature* 391 (1998) 591-594

**Hetzel P.J.**, Balletshofer B., Rittig K. et al., Rapid effects of rosiglitazone treatment on endothelial function and inflammatory biomarkers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (2005), 1804-1809

**Hollenbaugh D.**, Grosmaire L. S., Kullas C. D., Chalupny N. J., Braesch-Andersen S., Noelle R. J., Stamenkovic I., Ledbetter J. A. and Aruffo A., The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity, *EMBO J.* 11 (1992) 4313-4321

[https://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF2/principe\\_en.htm](https://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF2/principe_en.htm)

**Jaffe E. A.**, Nachman R. L., Becker C. G. and Minick C. R., Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria, *J.Clin.Invest* 52 (1973) 2745-2756

**Karmann K.**, Hughes C.C., Schechner J., Fanslow W.C. and Pober J.S., CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4342 (1995)

**Kerr LD.** Electrophoretic mobility shift assay. *Methods Enzymol.* (1995);254:619–632. doi: 10.1016/0076-6879(95)54044

**Kleemann R.** et al. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* (2008); 79: 360-376.

**L'Allier P. L.**, Tardif J.C. and Gregoire J. et al., Sustained elevation of serum CD40 ligand levels one month after coronary angioplasty predicts angiographic restenosis. *Can J Cardiol*, 21 (2005), 495-500

**Lederman S.**, Yellin M. J., Krichevsky A., Belko J., Lee J. J. and Chess L., Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation *J.Exp.Med.* 175 (1992) 1091-1101

**Lee JC**, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S et al., A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* (1994); 372:739-746

**Leng S.X.**, McElhaney J.E., Walston J.D., Xie D., Fedarko N.S., Kuchel G.A. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* (2008); 63:879–88

**Li J.**, Zhao S.P., Peng D.Q., Xu Z.M. and Zhou H.N., Early effect of pravastatin on serum soluble CD40L, matrix metalloproteinase-9, and C-reactive protein in patients with acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 50 (2004), 1696-1699

- Libby P.**, Inflammation in atherosclerosis, *Nature* 420 (2002) 868-874
- Lievens D.**, von Hundelshausen P., Platelets in atherosclerosis, *Thromb Haemost.* (2011) Nov 3;106(5):827-838.
- Livak K.J.**, Schmittgen D.T., Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* (2001); 25: 402-408
- Ludewig B.**, Henn V., Schroder J. M., Graf D. and Kroczeck R. A., Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4+ CD45RA+ T cells with dendritic cells, *Eur.J.Immunol.* 26 (1996) 3137-3143
- Lutgens E.**, Cleutjens K. B., Heeneman S., Koteliansky V. E., Burkly L. C. and Daemen M. J., Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000) 7464-7469
- Lutgens E.**, Lievens D., Beckers L., Donners M., Daemen M., CD40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17:118-123
- Mach F.**, Schonbeck U., Bonnefoy J. Y., Pober J. S. and Libby P., Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor, *Circulation* 96 (1997) 396-399
- Mach F.**, Schonbeck U., Sukhova G. K., Atkinson E. and Libby P., Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling, *Nature* 394 (1998) 200-203
- Maclellan W.A.**, Wang Y., Lusis A.J., Systems-based approaches to cardiovascular diseases, *Nat. Rev. Cardiol.* (2012).
- Malarstig A.**, Lindahl B., Wallentin L. and Siegbahn A., Soluble CD40L levels are regulated by the -3459 A>G polymorphism and predict myocardial infarction and the efficacy of antithrombotic treatment in non-ST elevation acute coronary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26 (2006), 1667-1673
- Marenberg M. E.**, Risch N., Berkman L. F., Floderus B., Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins, *N.Engl.J.Med.* 330 (1994) 1041-1046
- Marx N.**, Imhof A., Froehlich J. et al., Effect of rosiglitazone treatment on soluble CD40L in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Circulation*, 107 (2003), 1954-1957
- Mazzei G. J.**, Edgerton M. D., Losberger C., Lecoanet-Henchoz S., Graber P., Durandy A., Gauchat J. F., Bernard A., Allet B. and Bonnefoy J. Y., Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active, *J.Biol.Chem.* 270 (1995) 7025-7028

- Ming Wang**, Yan Li, Wen Li, Zun-en Xia, and Qing Wu. DNA and Cell Biology. March (2011), 30(3): 173-178.
- Miserez A. R.** and Braun J. R., Application of genetic principles to the causal assessment of atherosclerosis, Ther.Umsch. 52 (1995) 835-843.
- Morrow D.A.**, Sabatine M.S. and Brennan M.L. et al., Concurrent evaluation of novel cardiac biomarkers in acute coronary syndrome: myeloperoxidase and soluble CD40 ligand and the risk of recurrent ischaemic events in TACTICS-TIMI 18. Eur Heart J, 29 (2008), 1096-1102
- Mukundan L.**, Bishop G. A., Head K. Z., Zhang L., Wahl L. M. and Suttles J., TNF receptor-associated factor 6 is an essential mediator of CD40-activated proinflammatory pathways in monocytes and macrophages, J.Immunol. 174 (2005) 1081-1090
- Mukundan L.**, Milhorn D. M., Matta B. and Suttles J., CD40-mediated activation of vascular smooth muscle cell chemokine production through a Src-initiated, MAPK-dependent pathway, Cell Signal. 16 (2004) 375-384
- Mullis K. B.** and Faloona F. A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, Methods Enzymol. 155 (1987) 335-350
- Muth H.**, Kreis I., Zimmermann R., Tillmanns H., Hölschermann H., Differential gene expression in activated monocyte-derived macrophages following binding of factor VIIa to tissue factor. Thromb Haemost. (2005);94:1028-1034.
- Nagel T.**, Resnick N., Atkinson W. J., Dewey C. F. and Gimbrone M. A. Jr., Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells, J.Clin.Invest 94 (1994) 885-891
- Nannizzi-Alaimo L.**, Alves V.L. and Phillips D.R., Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. Circulation, 107 (2003), 1123-1128
- Noelle R. J.**, Roy M., Shepherd D. M., Stamenkovic I., Ledbetter J. A. and Aruffo A., A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 89 (1992) 6550-6554
- Olenchock B.A.**, Wiviott S.D. and Murphy S.A. et al., Lack of association between soluble CD40L and risk in a large cohort of patients with acute coronary syndrome in OPUS TIMI-16. J Thromb Thrombolysis, 26 (2008), 79-84
- Oemrawsingh R.M.**, Lenderink T., Akkerhuis K.M., Heeschen C., Baldus S., Fichtlscherer S., Hamm C.W., Simoons M.L., Boersma E., Multimarker risk model containing troponin-T, interleukin 10, myeloperoxidase and placental growth factor



predicts long-term cardiovascular risk after non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Heart*. (2011);97:1061-1066

**Pamukcu B.**, Lip B.Y., Snezhitskiy V., Shantsila E., The CD40-CD40L system in cardiovascular disease. *Ann Med* (2011) Aug; 43(5):331-340

**Paulie S.**, Ehlin-Henriksson B., Mellstedt H., Koho H., Ben-Aissa H. and Perlmann P., A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes, *Cancer Immunol.Immunother*. 20 (1985) 23-28

**Paulie S.**, Koho H., Ben-Aissa H., Hansson Y., Lundblad M. L. and Perlmann P., Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. II. Identification of the cellular target structures by immunoprecipitation and SDS-PAGE analysis, *Cancer Immunol. Immunother*. 17 (1984) 173-179

**Peng D.Q.**, Zhao S.P., Li Y.F., Li J. and Zhou H.N., Elevated soluble CD40 ligand is related to the endothelial adhesion molecules in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*, 319 (2002), 19-26

**Peng X.**, Remacle J. E., Kasran A., Huylebroeck D. and Ceuppens J. L., IL-12 up-regulates CD40 ligand (CD154) expression on human T cells, *J.Immunol*. 160 (1998) 1166-1172

**Pfaffl M. W.**, A new mathematical model for relative quantification in real-time-PCR, *Nucleic Acids Res*. 29 2001

**Plaikner M.**, Peer A. and Falkensammer et al., Lack of association of soluble CD40 ligand with the presence of acute myocardial infarction or ischemic stroke in the emergency department. *Clin Chem*, 55 (2009), pp. 175-178

**Refaai M.**, Phipps R., Spinelli S., Blumberg N., Platelet transfusions – impact on hemostasis, thrombosis, inflammation, and clinical outcomes. *Thromb Res* 127:287-291 (2011)

**Renart J.**, Reiser J, Stark GR, R G. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1979);76(7):3116–3120

**Rickert R. C.**, Jellusova J. and Miletic A. V., Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. *Immunological Reviews* (2011), 244: 115-133.

- Riede** U.-N. a. S. H. E., Allgemeine und spezielle Pathologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York, (1993) A.D
- Robertson** A.K., Hansson G.K.: T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: (2006) 2421-2432.
- Rondina** M.T., Lappe J.M., Carlquist J.F. et al., Soluble CD40 ligand as a predictor of coronary artery disease and long-term clinical outcomes in stable patients undergoing coronary angiography. *Cardiology*, 109 (2007), 196-201
- Ross** R. and Glomset J. A., The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts), *N.Engl.J.Med.* 295 (1976) 369-377
- Ross** R. and Glomset J. A., The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts), *N.Engl.J.Med.* 295 (1976) 420-425
- Ross** R., Atherosclerosis – an inflammatory disease, *N.Engl.J.Med.* 340 (1999) 115-126
- Rouse** J., Cohen P., Trigon S., Morange M., Alonso-Llamazares A. et al., A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell.* (1994); 78:1027-1037
- Saxena** A.R., Seely E.W., Goldfine A.B., Cardiovascular risk factors and menstrual cycle phase in premenopausal women, *J Endocrinol Invest.* (2011) Oct 3.
- Scheuner** M. T., Genetic predisposition to coronary artery disease, *Curr.Opin.Cardiol.* 16 (2001) 251-260.
- Schonbeck** U. and Libby P., The CD40/CD154 receptor/ligand dyad, *Cell Mol.Life Sci.* 58 (2001) 4-43
- Schonbeck** U. et al., CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* (2000); 156: 7-14.
- Schonbeck** U., Mach F. and Libby P., CD154 (CD40 ligand), *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 32 (2000) 687-693
- Schonbeck** U., Sukhova G. K., Shimizu K., Mach F. and Libby P., Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000) 7458-7463
- Schonbeck** U., Varo N., Libby P., Buring J. and Ridker P.M., Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation*, 104 (2001), 2266-2268
- Schwartz** G.G., Olsson A.G., Ezekowitz M.D., Ganz P., Oliver M.F. et al. Myocardial ischemia reduction with aggressive cholesterol lowering (MIRACL) study investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute

coronary syndromes. The MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA* 285: (2011) 1711-1718

**Schwartz S. M.**, Virmani R. and Rosenfeld M. E., The good smooth muscle cells in atherosclerosis, *Curr.Atheroscler.Rep.* 2 (2000) 422-429.

**Sherlock G.** Analysis of large-scale gene expression data. *Curr. Opin. Immunol.* (2000);121(1):201–205

**Statistisches Bundesamt Deutschland**, Wiesbaden. Krankheitskostenstatistik 2010

**Statistisches Bundesamt Deutschland**, Wiesbaden. Todesursachenstatistik 2010

**Steg PG**, James SK, Atar D, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting with ST-segment elevation *Eur Heart J.* (2012) Oct; 33(20):2569-619

**Stumpf C.**, Lehner C., Eskafi S., Raaz D., Yilmaz A., Ropers S., Schmeisser A., Ludwig J., Daniel W. G. and Garlichs C. D., Enhanced levels of CD154 (CD40 ligand) on platelets in patients with chronic heart failure, *Eur.J.Heart Fail.* 5 (2003) 629-637

**Tanne D.**, Haim M. and Goldbourt U. et al., CD40 ligand and risk of ischemic stroke or coronary events in patients with chronic coronary heart disease. *Int J Cardiol*, 107 (2006), pp. 322-326

**Tedgui A.**, Mallat Z., Cytokines in atherosclerosis pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* (2006); 86: 515-581

**Thim T.**, Hagensen M. K., Bentzon J. F., and Falk E., From vulnerable plaque to atherothrombosis, *J.Intern.Med.* 263 (2008) 506-516

**Topper J. N.**, Cai J., Falb D. and Gimbrone M. A. Jr., Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 (1996) 10417-10422

**Tousoulis D.**, Antoniades C. and Stefanadis C., Assessing inflammatory status in cardiovascular disease. *Heart*, 93 (2007), pp. 1001-1007

**Urbich C.**, Dernbach E., Aicher A., Zeiher A. M. and Dimmeler S., CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species, *Circulation* 106 (2002) 981-986

**Varo N.**, Nuzzo R., Natal C., Libby P. and Schonbeck U., Influence of pre-analytical and analytical factors on soluble CD40L measurements. *Clin Sci (Lond)*, 111 (2006), 341-347

**Whitmarsh** A.J., A central role for p38 MAPK in the early transcriptional response to stress. *BMC Biol.* (2010);8:47

**Wolf** D., Hohmann J.D., Wiedemann A., Bledzka K., Blankenbach H., Marchini T., Gutte K., Zeschky K., Bassler N., Hoppe N., Rodriguez A.O., Herr N., Hilgendorf I., Stachon P., Willecke F., Dürschmied D., von zur Muhlen C., Soloviev D.A., Zhang L., Bode C., Plow E.F., Libby P., Peter K., Zirlik A., Binding of CD40L to Mac-1's I-domain involves the EQLKKSKTL motif and mediates leukocyte recruitment and atherosclerosis – but does not affect immunity and thrombosis in mice. *Circ Res.* (2011);109:1269-1279

**Wykes** M., Poudrier J., Lindstedt R. and Gray D., Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells, *Eur.J.Immunol.* 28 (1998) 548-559

**Xia** M., Ling W., Zhu H., Wang Q., Ma J. et al., Anthocyanin prevents CD40-activated proinflammatory signaling in endothelial cells by regulating cholesterol distribution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2007);27:519-524

**Yip** H.K., Chang L.T., Sun C.K. et al., Impact of clopidogrel on suppression of circulating levels of soluble CD40 ligand in patients with unstable angina undergoing coronary stenting. *Am J Cardiol*, 97 (2006), 192-194

## 14 Anhang

### 14.1 Material

#### 14.1.1 Zellen

HUVEC

Isoliert aus Nabelschnüren

#### 14.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Accutase

PAA, Pasching, Österreich

Endothelzell-Basal-Medium

Clonetics, Walkersville (USA)

FCS (Fetales Kälberserum)

Gibco BRL, Eggenstein

HBSS

Gibco BRL, Eggenstein

Kollagenase Typ IV

Biochrom, Berlin

Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B

Gibco BRL, Eggenstein

sCD40L (#020245)	Cell Systems, St.Katharinen
Supplement	Clonetics, Walkersville (USA)
TNF- $\alpha$	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

### 14.1.3 Antikörper, Standards und Chemikalien

Bovines Serumalbumin	Paesel und Lorei, Frankfurt
Humanes sCD40L	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Humanes GRO-beta	IBL, Hamburg
Humanes ICAM-1	Diaclone, Besançon, Frankreich
Humanes IL-6	Diaclone, Besançon, Frankreich
Humanes IL-8	Diaclone, Besançon, Frankreich
Humanes VCAM-1	Diaclone, Besançon, Frankreich
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	Zymed, Carlton, USA
Tween <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich, München

**Tabelle 2: Primärantikörper**

Name	Typ	Antigen	Immunisierte Spezies	Firma
p38 MAP Kinase (# 9212)	polyklonal	human	Kaninchen	Cell Signaling, Massachusetts, USA
Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) (# 9211)	polyklonal	human	Kaninchen	Cell Signaling, Massachusetts, USA

**Tabelle 3: Sekundärantikörper**

Name	Typ	Antigen	Immunisierte Spezies	Firma
Ig G (# sc-2004)	HRP-gekoppelter anti- IgG	Kaninchen	Ziege	Santa Cruz, Kalifornien, USA

### 14.1.4 Primer und Sonden

Tabelle 4: Primer- und Sonden -Sequenzen der RT-PCR

Gene	Primer	Sequenz (5'→3')	Größe
<b>EDF-1</b>	sense	5'-TTA GCG GCA CAG AGA CGA GG-3'	101 bp
	antisense	5'-TCC AGC TTG GCC GTG TTC T-3'	
<b>ELK-3</b>	sense	5'-AGC CTT AGT CCA GTT GCT CCG-3'	104 bp
	antisense	5'-GGG ATT GGC ACT GGC ATG T-3'	
<b>GRO-beta</b>	sense	5'-GCC AGT GCT TGC AGA CCC T-3'	101 bp
	Sonde	5'-AAC ATC CAA AGT GTG AAG GTG AAG TCC CC-3'	
	antisense	5'-GGC TAT GAC TTC GGT TTG GG-3'	
<b>IL-8</b>	sense	5'-TTG GCA GCC TTC CTG ATT TCT -3'	158 bp
	Sonde	5'-AGC TCT GTG TGA AGG TGC AGT TTT GCC A-3'	
	antisense	5'-GCG CAG TGT GGT CCA CTC TC-3'	
<b>IL-6</b>	sense	5'-GTA CAT CCT CGA CGG CAT CTC-3'	101 bp
	antisense	5'-GGT TCA GGT TGT TTT CTG CCA-3'	
<b>ISGF3</b>	sense	5'-GA CTT CCG GGA GGA CCA GG-3'	107 bp
	antisense	5'-AGG CGA GTC TTC CAG ACA GCT-3'	
<b>MCP-1</b>	sense	5'-TCG CCT CCA GCA TGA AAG TC-3'	101 bp
	antisense	5'-GGC ATT GAT TGC ATC TGG CT-3'	
<b>PBGD</b>	sense	5'-CCC ACG CGA ATC ACT CTC AT-3'	86 bp
	Sonde	5'-CTG TTT TCT TCC GCC GTT GCA GC-3'	
	antisense	5'-TGT CTG GTA ACG GCA ATG CG-3'	
<b>PRDX-1</b>	sense	5'-GTG CCC CAC GGA GAT CAT T-3'	147 bp
	antisense	5'-ATG GGT CCC AGT CCT CCT TG-3'	
<b>Prothymosin -<math>\alpha</math></b>	sense	5'-GGG AGC AGG AGG CTG ACA AT-3'	132 bp
	antisense	5'-TGC CCG TAG CTG ACT CAG CT-3'	
<b>TRRAP-2</b>	sense	5'-CGC AGC CCA TCA GTG CAG TCT-3'	105 bp
	antisense	5'-CAC ACC GGC GAG AGA GCA-3'	

### 14.1.5 Reagenzien und Materialien

5x Transkriptionspuffer First Strand Buffer

Invitrogen, Carlsbad

5x Transkriptionspuffer

Invitrogen, Carlsbad

96Well Platten

Greiner, Stuttgart

Agarose

Sigma-Aldrich

Laborchemikalien, Seelze

[ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] dATP

Dupont, Dreieich

Aqua dest.	Baxter S.A., Lessines, Belgien
cDNA-Macroarray Human 1.2 Kit	Becton Dickinson, Heidelberg
DNA-Ladder	Invitrogen, Carlsbad
DNase I, RNase free	Boehringer, Mannheim
dNTPs (desoxygenierte Nukleosidtriphosphate)	Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom
Dithiotreitol (DTT)	Invitrogen, Carlsbad
Einwegpipetten	Greiner, Stuttgart
Ethanol	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Hybridisierungsflaschen	Duran, Mainz
Isopropanol	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Loading-solution	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
MicroAmp Optical Tubes	Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom
MicroAmp Reaction Tubes	Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom
MMLV-RT (Moloney murine leukaemia virus Reverse Transkriptase)	Invitrogen, Carlsbad
Pipettenspitzen	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Primer für RT-PCR	Metabion, Planegg-Martinsried
Protran BA Nitrocellulose	Schleicher & Schuell, Dassel
Random Primer	Boehringer, Mannheim

RNasin	Promega, Mannheim
RNasin Plus RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
RNazol Phenol, Guanidinium Thiocyanat	WAK-Chemie, Steinbach
RNeasy RNA Kit	Qiagen, Hilden
Röntgenfilm (Bas-MP 2040S)	Fuji, Tokyo, Japan
Sheared salmon testes DNA	Sigma, München
SybrGreen <sup>®</sup>	Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom
TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma, München
Zellkulturschalen (60x15mm)	Falcon, Franklin Lakes, United States
Zellkulturflaschen	Greiner, Stuttgart

### 14.1.6 Verwendete Lösungen und Gele

TAE-Puffer 50x (pH8)	2M Tris Base (242,28g) 50mM EDTA Dinatriumsalz (18,6g) ad 1000ml H <sub>2</sub> O
TBE-Puffer 5x (pH8)	54g Tris-Base 27,5g Borsäure 20ml 0,5M EDTA ad 800ml H <sub>2</sub> O
Elutriationspuffer 2x	800ml H <sub>2</sub> O 1000ml 10x PBS 50ml Pyruvat (100mM) 50ml EDTA 1%



	10ml Glukose 10%
Elutriations-Waschpuffer 1x	400ml H <sub>2</sub> O 50ml 10x PBS 25ml Pyruvat (100mM) 25ml EDTA 1% 2,5ml Albumin (human) 20%
Array 10x Denaturierungslösung	1M NaOH 10mM EDTA
Array 2x Neutralisierungslösung (pH 7,0)	1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 200ml H <sub>2</sub> O
Array 20x SSC (pH 7,0)	175,3g NaCl 88,2g Na <sub>3</sub> Citrate x 2H <sub>2</sub> O 900ml H <sub>2</sub> O
Array 20% SDS	200g SDS 1L H <sub>2</sub> O
Array Waschlösung 1	2x SSC 1% SDS
Array Waschlösung 2	0,1x SSC 0,5% SDS
ELISA Waschpuffer	PBS mit 0,05% Tween <sup>®</sup>
ELISA Blockpuffer	1% bovines Serumalbumin (BSA) 5% Sucrose (Saccharose) 0,02% Na-Acid 2%

	ad 1L PBS
ELISA Substratpuffer	8,2g Na-Acetat-Trihydrat 6,9g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O ad 1000ml Aqua dest., pH 4,2
ELISA Grundpuffer	Tris(20mM)-NaCl (150mM), pH 7,3
ELISA Verdünnungspuffer	0,1% BSA 0,05% Tween <sup>®</sup> ad 1000ml Grundpuffer
Zellysepuffer	1% (v/v) NP40 20mM hepes 450mM NaCl 0,2 mM EDTA 10 mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 25% (vol/vol) Glycerin 200 mM DTT 0,25 mM PMSF 1,25 µg/ml Leupeptin 5µg/ml Aprotinin
Trenngel für Western Blot 10%	30% Acrylamid 1,5M Tris, pH 8,8 10% (w/v) SDS 10% (w/v) APS 0,0005% (v/v) TEMED

Sammelgel für Western Blot 10%	30% Acrylamid 0,5 M Tris, pH 8,8 10% (w/v) SDS 10% (w/v) APS 0,0005% (v/v) TEMED
5x Elektrophoresepuffer (SDS-Page)	5,1g 25 mM Tris, pH 8,3, gelöst in 900 ml Aqua dest. 94g 250 mM Glyzin 0,1% (w/v) SDS
Auftragspuffer (2x)	100 mM Tris, pH 6,8 4% (w/v) SDS 20% (v/v) Glycerin 0,2% (w/v) Bromphenol blau 200mM DTT
Laufpuffer	25mM Tris 250mM Glyzin 0,1% SDS
Waschpuffer	1x PBS 0,1% (v/v) Tween 20 <sup>®</sup> Aqua dest.
Transferpuffer (pH 8,5)	3,02g 25 mM Tris 14,4g 192 mM Glycin 200ml 20% (v/v) Methanol
Blockpuffer	1x PBS 0,1% (v/v) Tween 20 <sup>®</sup> 5% (w/v) Magermilchpulver

Antikörperlösungspuffer	1x PBS 0,1% (v/v) Tween 20® 5% (w/v) Magermilchpulver
Western blot stripping solution	2% (w/v) SDS Aqua dest. HCL

## 14.2 Geräte

ABIPRISM 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom
Agarosegelkammer	Kreuzer, Reiskirchen
Beckmann JE-5.0 Zentrifuge	Beckmann Instruments, Fullerton, Kanada
ECL® Filme	Amersham, Freiburg
ELISA-Reader SPECTRAFluor Plus	Tecan, Crailsheim
Eppendorf® Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungsinkubator	Bachofer, Reutlingen
Mikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Minishaker MS2	IKA Labortechnik, Staufen
Phosphorimager Reader (BAS-1000)	Fuji, Tokyo, Japan
Photometer, Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Sterile Werkbank mit Personenschutz	Haereus Instruments, Hanau
Thermocycler (Radioaktivität)	Perkin Elmer, Norwalk, United States
Thermocycler	Biometra, Göttingen
UV-Leuchttisch	Biometra, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zellkulturinkubator	WTB, Tuttlingen
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Haereus Instruments, Hanau

## 15 Kongressbeiträge

Poster auf dem jährlichen Kongress der American Heart Association in New Orleans (08-12.11.2008): Stadlbauer T., Molitor B., Wilhelm J., Harwaldt P., Schaub M., Hoelschermann H., Tillmanns H., Hofmann W.-K.; Elevated Level Of sCD40L During Acute Coronary Syndrome Leads To Systemic MIP-2 Release.  
(Circulation 2008;118:S 580)

Poster auf dem jährlichen Kongress der European Society of Cardiology in Wien (01.-05.09.2007): T.H.W.Stadlbauer, B.Molitor, J.Wilhelm, B.Parviz, A.Weber, A.Barth, P.Harwaldt, H.Hoelschermann, H.Tillmanns, W.K.Hofmann; Elevated Levels Of sCD40L During Acute Coronary Syndrome Leads To Systemic MIP-2 Release.

Poster auf dem 27ten Kongress der International Society for Heart and Lung Transplantation in San Francisco (25.-28.04.2007): D.Schuster, B.Molitor, B.Parviz, A.Weber, A.Barth, P.Harwaldt, H.Hoelschermann, H.Tillmanns, T.H.W.Stadlbauer; Differential Gene Expression in Human Endothelial Cells after Stimulation with sCD40L  
(Journal of Heart and Lung Transplantation, 26, issue 2 (2007), S. S79-S80)

## 16 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

**Ort, Datum**

---

**Unterschrift**

## 17 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Harald-Horst Tillmanns für das Thema der Dissertation und das Ermöglichen wissenschaftlicher Arbeit bedanken.

Besonders bedanke ich mich bei Dr. Heidrun Muth, die die Arbeit anfangs eng mit betreut hat und mit ihren kompetenten Anregungen und Hilfestellungen den Einstieg in wissenschaftliches Arbeiten geebnet hat. Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeiterinnen des kardiologischen Labors, Behnoush Parviz und Antje Weber sowie meiner Studienkollegin Petra Harwaldt; ohne ihre Hilfe und geduldige Anleitung bei der praktischen Durchführung sowie der guten Stimmung auch neben der Arbeit wäre mir vieles schwerer gefallen.

Als weiterer Mitarbeiter war mit seiner Kompetenz und seinem Engagement insbesondere bei der real-time-PCR Andreas Barth wichtig. Ich hoffe, dass er sich trotz aller gesundheitlichen Rückschläge bald wieder voll im kardiologischen Labor einbringen kann.

Mit Hilfe und in Kooperation mit Prof. W.-K. Hofmann, früher an der Charité tätig, jetzt am Universitätsklinikum Mannheim, wurden die Micro-Arrays durchgeführt und analysiert. Ihm gilt daher ebenfalls mein aufrichtiger Dank.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Stadlbauer, früher Universität Gießen, jetzt an der TU München, der die Betreuung meiner Doktorarbeit in gewissem Sinne zunächst geerbt und dann so vorbildlich und engagiert fortgeführt hat, wie man es sich nur wünschen kann.

Auch Herrn Prof. Dr. Martin C. Heidt danke ich für die Betreuung der Arbeit und die Bereitschaft, sich als Gutachter zur Verfügung zu stellen.

Ohne meine „Gießener Jungs“ wäre sicherlich auch keine Beendigung der Arbeit denkbar gewesen, haben doch Moritz, Flo, Ole, Jost, Josh, Flori, Matze und Philipp neben den Ermutigungen, diese Arbeit durchzuführen, auch für den wichtigen Ausgleich außerhalb der Uni gesorgt.

Auch möchte ich mich an dieser Stelle besonders bei meinen Eltern für die Geduld und die kontinuierliche, immer motivierende Unterstützung bedanken. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

