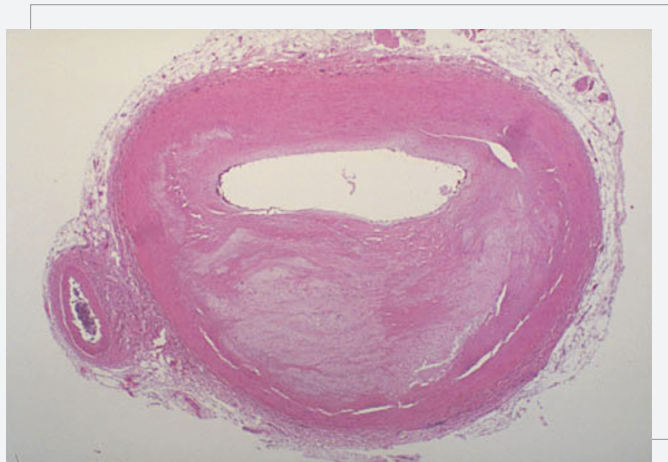

Quantifizierung der Zell-Zyklus-Inhibitoren
 $p27^{Kip1}$ und $p21^{Cip1}$ in humanem koronarem
Athertomiegewebe:

Primärstenose versus Restenose



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

ALMUT BARBARA ZIEGLER

aus Neunkirchen / Saar
Gießen 2003

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2004

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Quantifizierung der Zell-Zyklus-Inhibitoren p27^{Kip1} und
p21^{Cip1} in humanem koronarem Atherektomiegewebe:
Primärstenose versus Restenose.

Inauguraldissertation zur Erlangung
des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Almut Barbara Ziegler
aus Neunkirchen/Saar

Gießen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum für
Innere Medizin Medizinische Klinik I
Leiter Prof. Dr. H.Tillmanns des Klinikums
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. Braun-Dullaes

Gutachter: Prof. Dr. Müller

Tag der Disputation: 19.04.2004

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	3
1.1	Atherosklerose: Entstehung und Therapieoptionen	3
1.2	Der Zellzyklus	5
1.2.1	G1/S-Phase	5
1.2.2	G2/M-Phase.....	8
1.3	Rolle des p27 ^{Kip1} /p21 ^{Cip1} für den Zellzyklus	9
1.4	p27 ^{Kip1} und p21 ^{Cip1} als prognostische Marker maligner Erkrankungen	10
1.5	p27 ^{Kip1} und p21 ^{Cip1} im Tiermodell	10
1.6	Ziel der Studie	11
2.	Material	13
2.1	Patientenkollektive (Gewebearten)	13
2.1.1	Koronares Atherektomiegewebe	13
2.1.2	Aortengewebe von Kindern.....	14
2.1.3	Aortengewebe Erwachsener	15
2.1.4	Arteria mammaria interna Gewebe	15
2.1.5	Thrombendarteriektomiegewebe der Arteria carotis interna.....	16
2.2	Geräte und Hilfsmittel.....	17
2.3	Antikörper	20
2.3.1	Primärantikörper.....	20
2.3.2	Sekundärantikörper	20
2.4	Chemikalien.....	21
2.5.....	Lösungen	23
2.5.1	Proteinbestimmung.....	23
2.5.2	Western Blot.....	25
2.6	Zusammensetzung der Polyacrylamidgele (PAGE).....	26
2.6.1	Trenngel.....	26
2.6.2	Sammelgel	26
2.6.3	Empfohlene Acrylamidkonzentration für verschiedene Proteingrößen	27
3.	Methoden.....	28
3.1	Lyse der Gewebeproben.....	28
3.2	Proteinbestimmung.....	28
3.3	Western Blot.....	29
3.3.1	Herstellung des zweischichtigen SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970)	29
3.3.2	Probenbereitung.....	30
3.3.3	Elektrophorese.....	31
3.3.4	Transfer	31
3.3.5	Immundetektion.....	32
3.3.6	Strippen der Membran.....	33
3.3.7	Densitometrische Auswertung	33
3.4	Statistik.....	35

4.	Ergebnisse	36
4.1	Quantifizierung des „cyclin-dependent“ Kinaseinhibitors p27 ^{Kip1} in vaskulären Geweben	36
4.1.1	Vergleich der verschiedenen Gewebe	36
4.1.2	Subanalyse der Primärstenosen	37
4.1.3	Subanalyse der Restenosen	38
4.2	Relative Quantifizierung des „cyclin-dependent“ Kinaseinhibitors p21 ^{Cip1} in vaskulären Geweben	39
4.2.1	Vergleich der verschiedenen Gewebe	39
4.2.2	Subanalyse der Primärstenosen	40
4.2.3	Subanalyse der Restenosen	41
4.3	Einfluß von Statinen auf die Expression von p27 ^{Kip1} und p21 ^{Cip1} in Primär- und Restenosegeweben.....	41
4.4	Proliferative Aktivität in vaskulären Geweben	43
4.5	Vergleich des Kollagen III Gehalts in vaskulären Geweben	45
5.	Diskussion	47
6.	Zusammenfassung.....	58
7.	Literaturverzeichnis	60
8.	Abbildungsverzeichnis.....	73
9.	Publikationen	75
9.1	Originalarbeiten.....	75
9.2	Abstracts.....	75
10.	Lebenslauf.....	76
11.	Danksagung.....	78

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose: Entstehung und Therapieoptionen

In Europa, Amerika und Teilen Asiens stellen Folgeerkrankungen der Atherosklerose wie Myokardinfarkt oder zerebraler Infarkt mit 40% die Haupttodesursache dar [1].

Die primäre Atherosklerose stellt eine Entzündungsreaktion mit Proliferation dar, welche zu einer Einengung des Arterienlumens mit Minderversorgung des Gewebes führt. Für die Entstehung der Atherosklerose wurde bereits von Virchow eine Verletzung des Endothels postuliert (Virchow 1856), welcher bis heute, nach Integration mehrerer Modelle zur "response to injury"-Hypothese geworden, eine führende Rolle bei der Plaquentstehung zugesagt wird [2; 3; 4]. Die "response to injury"-Hypothese kann jedoch auch auf alle weiteren vaskuloproliferativen Erkrankungen übertragen werden, denn allen ist eine Gefäßverletzung mit folgender Ausbildung einer sogenannten "Neointima" gemeinsam. Gefäßverletzung kann durch mechanische Intervention, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Inhaltsstoffe des Tabakrauches, Hyperlipidämie u.a. erfolgen, welche eine vaskuloproliferative Kaskade triggern, die in drei Phasen unterteilt werden kann: (1) eine frühe Phase der Thrombozytenaktivierung, Thrombusformation und Monozytenrekrutierung, (2) eine intermediäre Phase der Gefäßmuskelzellmigration und -proliferation und (3) eine späte Phase der Deposition extrazellulärer Matrix [5; 6; 7].

Multiple Wachstumsfaktoren wie bFGF („basic fibroblast growth factor“), PDGF („platelet-derived growth factor“), IGF-1 („insulin-like growth factor-1“), TGF- β („transforming growth factor β “) und chemotaktisch wirksame Zytokine vermitteln die proliferative Antwort eines Gefäßes auf ein Trauma. Diese stammen aus den adhären den Thrombozyten und Monozyten, den beschädigten Endothelzellen und den glatten Gefäßmuskelzellen der Gefäßwand.

Dieses Zusammenspiel führt letztlich zu einer Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC „vascular smooth muscle cells“) in die sich bildende „Neointima“, wo sie extrazelluläre Matrix synthetisieren, die zum größten Teil aus Kollagen besteht [2; 8; 9].

Häufige klinische Manifestation der Atherosklerose ist die koronare Herzkrankheit (KHK). Neben medikamentösen Präventions- und Behandlungsmöglichkeiten (ASS,

Statine, Nitrate, β -Blocker) gibt es verschiedene invasive Methoden, um signifikante (50-74% Querschnittsverminderung) und kritische (75-99%) Stenosen der Koronarien zu beseitigen:

Bei der PTCA (perkutane transluminale Koronarangioplastie) wird mit Hilfe eines Ballons der verengte Gefäßabschnitt dilatiert. Allerdings ist die Restenoserate nach Angioplastie mit bis zu 35% nach einem halben Jahr sehr hoch [10]. Das "response-to-injury" Modell der Atherosklerose kann auch für die Erklärung dieser restenotischen Prozesse herangezogen werden. Das akute Gefäßtrauma führt zur Leukozytenadhäsion und Inflammation mit lokaler Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren. In der Folge kommt es zur Migration und Proliferation hauptsächlich glatter Gefäßmuskelzellen, programmiertem Zelltod (Apoptose), Matrixdeposition und zu chronischen Umbauprozessen in der Gefäßwand (Remodelling) [5; 7; 11; 12].

Um bessere Ergebnisse mit geringeren Restenoseraten zu erzielen, werden in der Klinik seit 1992 endovaskuläre Stents eingesetzt, deren Indikation sich ständig erweitert. In manchen Zentren werden bereits bei 90% der perkutanen Revaskularisierungen Stents plaziert [13]. Es zeigte sich jedoch, dass diese Methode die Erwartung, die Durchgängigkeit des Gefäßes dauerhaft zu gewährleisten, nicht immer erfüllt. Durch die starke Reaktion der Gefäßwand mit einer länger als bei der PTCA anhaltenden intimalen Zellproliferation, erlitten 20-30 % der Patienten eine In-Stent-Restenose, mit intravaskulärem Ultraschall (IVUS) dargestellt sogar 43% innerhalb von 9 Monaten [10; 14; 15].

Grundsätzlich findet bei der In-Stent-Restenose der gleiche Mechanismus wie bei Restenose nach Angioplastie statt. Unterschiedlich ist das fokale, tiefe Einschneiden der Stentstreben in die Gefäßwand, was zu einer direkt proportionalen neointimalen Hyperplasie führt [16]. Außerdem übt der Stent im Gegensatz zur transienten Dehnung bei PTCA eine permanente Dehnung auf die Gefäßwand aus, was ebenso wie das im Gefäß verbleibende körperfremde Material des Stents einen starken Proliferationsreiz verursacht [16]. Allerdings verhindert der Stent das frühe elastische Recoil der Arterienwand und das späte negative Remodeling, was nach PTCA ohne Stenteinsatz beobachtet wird [13; 17].

Die Möglichkeit die atherosklerotische Neointima, das Restenosematerial nach PTCA und auch das In-Stent-Restenosematerial zu entfernen bietet die Atherektomie. Dabei wird das Stenosematerial im Rahmen eines

Herzkathetereingriffs mit Hilfe eines besonderen Aufsatzes herausgeschnitten. Bei den In-Stent-Restenosen wird, durch die Stentstreben begrenzt, lediglich die Neointima entfernt. Sie besteht beim Menschen und im Tiermodell hauptsächlich aus glatten Gefäßmuskelzellen und extrazellulärer Matrix [18; 19; 20; 21]. Ohne Stent sind in 19% der Atherektomien Mediaanteile enthalten.

Neben der Inflammation und Matrixdeposition spielt, wie oben dargelegt, Proliferation eine entscheidende Rolle bei der Atheroskleroseentstehung, vor allem jedoch bei der Restenoseentstehung nach Angioplastie oder der Stentplatzierung.

Im Mittelpunkt antiproliferativer Therapieansätze steht derzeit die Maschinerie, die die Endstrecke aller mitogenen Stimuli darstellt: der Zellzyklus.

1.2 Der Zellzyklus

Ruhende (G₀) Zellen treten in die erste "gap"-Phase (G₁) ein, in der die Zellzyklusproteinsynthese und –aktivierung beginnt (siehe Abbildung 1 aus [11]). In der späten G₁-Phase erreichen die Zellen den sogenannten Restriktionspunkt (R). Nach diesem legt sich die Zelle zur DNA-Replikation in der folgenden Synthesephase (S) fest und die weitere Progression durch die zweite "gap"-Phase (G₂) und die Mitose-Phase (M) ist von der weiteren Anwesenheit der Wachstumsfaktoren unabhängig. Die geordnete und korrekte Transition von einer Phase in die nächste wird von der Zelle an sogenannten "checkpoints" kontrolliert [22]. Verschiedenen Wachstumsfaktoren kommen bei der Zellzyklusprogression unterschiedliche Rollen zu. PDGF („platelet-derived growth factor“) und bFGF („basic fibroblast growth factor“) stellen "Kompetenzfaktoren" dar, die Prozesse initiieren, welche zur Transkription der frühesten Zellzyklusgene für den Zellzykluseintritt führen. "Progressionsfaktoren", wie "epidermal growth factor" (EGF) und IGF-1, stimulieren hingegen die Progression der kompetenten Zellen in Richtung S-Phase [23; 24]

1.2.1 G₁/S-Phase

Zellzyklusphasen werden koordiniert durch Expression und/oder Aktivierung spezifischer Kinasen, den „cyclin-dependent“ Kinasen (Cdk), welche Holoenzyme mit ihren regulatorischen Untereinheiten, den Zyklinen bilden. In der beginnenden

G1-Phase akkumulieren die D Zyklone (D1, D2, D3) mit den frühen Cdk's (Cdk4, Cdk6) und die Menge an PCNA („proliferating cell nuclear antigen“), ein Faktor der die DNA-Polymerase- δ stimuliert [25] und ebenfalls mit dem Zyklin D/Cdk4-Komplex assoziiert ist [26], nimmt zu. Hohe Spiegel an CKI („cyclin-dependent“ Kinaseinhibitor) $p27^{Kip1}$ in ruhenden G0 Zellen nehmen beim Eintritt in den Zellzyklus ab [27]. $p27^{Kip1}$ bindet und hemmt G1-Phase Zyklin/Cdk-Komplexe. Nun freie Zyklin D/Cdk4/PCNA-Komplexe werden mit Hilfe einer Cdk aktivierenden Kinase (CAK) phosphoryliert und dadurch aktiviert. Die Abnahme an $p27^{Kip1}$ bedingt die stöchiometrische Veränderung des Verhältnisses des Inhibitors zu Zyklin D/Cdk4/PCNA-Komplexen und erlaubt so eine enzymatische Aktivierung des hochregulierten Cdk2. Cdk2 bildet Komplexe mit Zyklin E und A, welche in der späten G1-Phase gebildet werden. In dieser Phase erreichen die Zellen den Restriktionspunkt (R), nach dem sie unabhängig von weiterer Stimulation von Wachstumsfaktoren auf das Fortschreiten und damit die DNA-Replikation und die Zellteilung festgelegt sind.

Die aktivierten Cdk-Komplexe phosphorylieren das Retinoblastom-Gen (RB), welches als negativer Regulator der Transkription verschiedener Proteine während des Zellzyklus fungiert [28]. Hypophosphoryliertes RB bindet und inhibiert die Isoformen des Transkriptionsfaktors E2F, wohingegen hyperphosphoryliertes RB diese E2F's freigibt. Hauptsächlich E2F-1 dient dazu, die Expression von Genen wie PCNA, Cdk1, Zyklin E und Zyklin A, die für das Fortschreiten zur S-, G2- und M-Phase erforderlich sind, hochzuregulieren [29].

Der wachstumsfaktor-stimulierte Eintritt in den Zellzyklus wird durch die hochregulierte Transkription der Protoonkogene *c-fos*, *c-myc*, *c-myb*, *B-myb* und *ras* vermittelt. Ihre Genprodukte dienen als Transkriptionsfaktoren, die die Expression spezifischer den Zellzyklus regulierender Gene steigern [30]. Zum Beispiel führt die Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen zu einer schnellen Induktion von *c-fos*, was wiederum die mRNA Expression von Zyklin D1, Cdk4 und Zyklin E erhöht [31]. Wachstumsfaktoren vermehren auch die Menge an *c-myc* [32], einem Protein, das entscheidend für das Fortschreiten sowohl durch die G1-, als auch die G2-Phase des Zellzyklus ist [33]. Wie *c-fos*, induziert *c-myc* die Akkumulation von Zyklinen in der frühen G1-Phase und verstärkt Zyklin D- und Zyklin E-assoziierte Kinaseaktivität [34; 35]. Dass die Hemmung des *c-myc* Gens zwar die Hochregulation von Zyklin A und Zyklin E, aber nicht die von Zyklin D verhindert,

läßt komplexe Interaktionen und Zusammenhänge von Ereignissen des Zellzyklus vermuten [36]. *H-ras* ist ein membranassoziiertes, Guanin-Nukleotid bindendes Protein, das Wachstum regulierende Signale (EGF, PDGF, bFGF und IGF-1) von Thyrosin-Kinase-Rezeptoren der Zelloberfläche mit zytoplasmatischen Second-Messenger-Signalketten verbindet [37]. Aufhebung der *ras* Aktivität durch Verwendung dominant negativer Mutanten oder Neutralisation durch Antikörper hemmt den Eintritt der Zellen in die S-Phase [38], während Überexpression von *ras* Protein die Menge an Zyklin D vergrößert und die G1-Phase verkürzt [39]. Weiterhin aktivieren *myc* und *ras* Proteine gemeinsam Zyklin E/Cdk2 und E2F, was mit der Abnahme an $p27^{Kip1}$ zusammenfällt [40]. Zusätzlich sind die mRNA Spiegel von dem zu *c-myb* gehörenden Gen *B-myb* während der späten G1-bis S-Phase erhöht [41].

Die Anfangsphase des Zellzyklus ist nicht nur von $p27^{Kip1}$ sondern von einer weiteren CKI, dem $p21^{Cip1}$ reguliert. Das 21-kD große Protein ist ein integraler Baustein der Zyklin-Cdk Komplex-Regulation [26]. Ein einzelnes $p21^{Cip1}$ Molekül scheint für die enzymatische Cdk Aktivierung nötig zu sein, wohingegen mehrere Moleküle an einem Komplex zu dessen Inaktivierung führen. Der Spiegel an $p21^{Cip1}$ Protein ist in G0-Phase-Zellen niedrig, steigt aber in der späten G1-Phase an, was als Gegengewicht („negativer Feedback“) für die gesteigerte Akkumulation und enzymatische Aktivierung der Zyklin/Cdk Komplexe verstanden wird [26]. Auch das Tumorsuppressorprotein p53 ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt [42]. p53 kann als Transkriptionsfaktor die Expression vieler Gene hochregulieren einschließlich der für $p21^{Cip1}$ und es kann Zellen bei DNA Schaden in der G1-Phase festhalten, was den hauptsächlichen Mechanismus des antiproliferativen Effektes radioaktiver Strahlung darstellen könnte. Dieser schützende Effekt wurde mit einer p53 stimulierten $p21^{Cip1}$ Akkumulation in Verbindung gebracht [42; 43]. $p21^{Cip1}$ kann direkt die Aktivierung der DNA Polymerase- δ durch PCNA hemmen, wobei die DNA Replikation verhindert und deren Reparatur ermöglicht wird [44]. Außerdem kann p53, gemeinsam mit E2F, die Apoptose fördern, was einen weiteren Schutz vor der Verbreitung beschädigter DNA in Zellen, die den Restriktionspunkt (R) überschritten haben, darstellt [45]. p53 wirkt nicht nur als Transkriptionsfaktor, sondern auch durch direkte Protein-Protein Interaktionen. Tatsächlich wird eine

Beteiligung des p53 Proteins bei der Regulation des normalen Durchlaufs G0-G1-S und der Vervollständigung der G2/M-Phase vermutet [46; 47].

„Homeobox“ Genprodukte, Transkriptionsfaktoren deren Rolle bei der Differenzierung kardiovaskulärer Zellen bekannt ist, sind ebenfalls Modulatoren des Zellzyklus Eintritts [48]. In ruhenden (Serumentzug) glatten Gefäßmuskelzellen sind besonders die GAX („growth arrest-specific homeobox“) mRNA Spiegel vermehrt und werden, wenn die Zellen in den Zellzyklus eintreten [49], schnell herunterreguliert, was eine regulierende Funktion im G0-G1 Übergang vermuten läßt.

1.2.2 G2/M-Phase

Nachdem die DNA Replikation vollständig ist und die Zelle die weitere G2-Phase durchläuft, steigt der Proteingehalt an Zyklin B an. Dieses Protein bildet einen Komplex mit Cdk 1 („cyclin-dependent“ Kinase 1), früher auch als Cdc 2 („cell division cycle“ 2) Kinase bezeichnet, um den MPF („mitosis-promoting factor“) zu bilden. Aktivierung des MPF benötigt die Phosphorylierung eines Treonins (Thr 161) des Cdk 1 durch die CAK (Cdk aktivierende Kinase) und die Dephosphorylierung eines Thyrosins (Tyr 15) durch die Cdc 25 Phosphatase [50]. Der aktivierte MPF initiiert dann die Prophase und induziert gleichzeitig wieder die Zerstörung des Zyklin B durch vorhandene Proteasen und damit den Beginn der Anaphase [51]. Im Anschluß erfolgt dann die Inaktivierung von Cdk 1 durch Dephosphorylierung von Thr 161, womit der Zellzyklus vollendet ist.

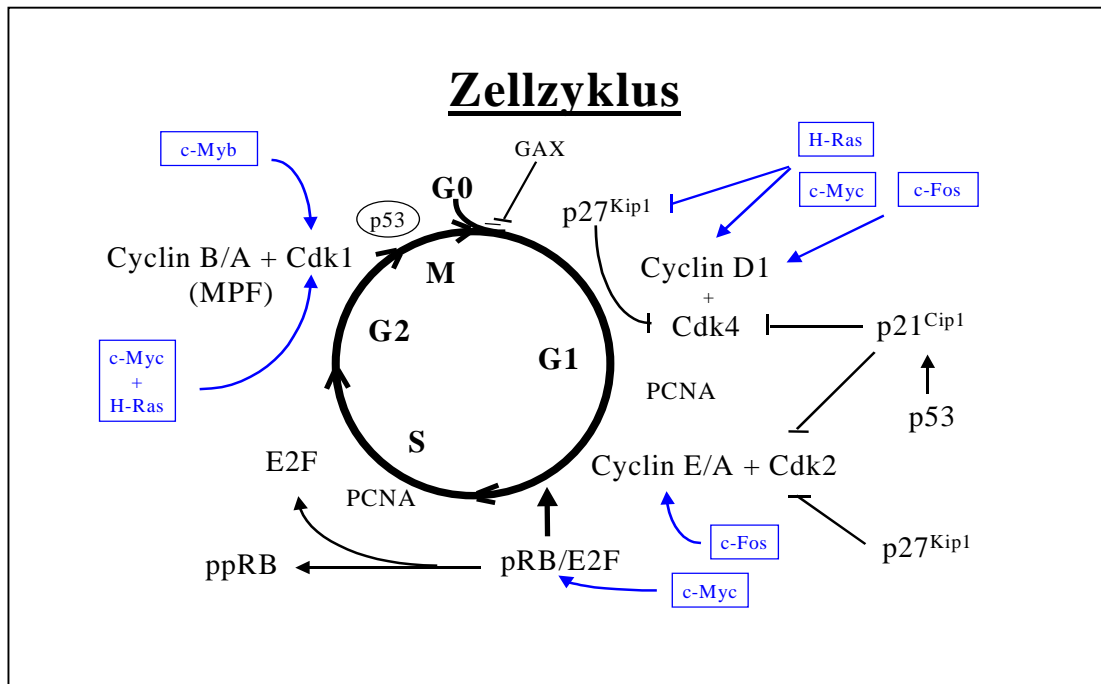


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema des Zellzyklus mit den verschiedenen Signaltransduktionssystemen aus [11]

1.3 Rolle des p27^{Kip1}/p21^{Cip1} für den Zellzyklus

Die beiden Cdk Inhibitoren p27^{Kip1} und p21^{Cip1} haben sowohl negative [52] als auch positive [53; 54] Regulatorfunktion für Zyklin/Cdk Komplexe in der G1-Phase. Der in ruhenden G0-Phase Zellen hohe p27^{Kip1} Spiegel hemmt deren Eintritt in den Zellzyklus und wird nach mitogener Stimulation herunterreguliert [27; 55]. p21^{Cip1} wird von dem Tumorsupressorprotein p53 induziert und reguliert. Der Spiegel ist niedrig in G0-Phase Zellen und wird bei mitogener Stimulation in der späten G1-Phase hochreguliert, was als negativer Feedback und Regulatormechanismus der Zellzyklusaktivierung angesehen wird [26; 56].

Außerdem ist nicht die absolute Menge, sondern die Stöchiometrie der beiden CKI zu Zyklin/Cdk Komplexen der G1-Phase entscheidend für das Proliferationsverhalten der Zelle [11; 52; 54].

1.4 p27^{Kip1} und p21^{Cip1} als prognostische Marker maligner Erkrankungen

Für verschiedene maligne und nicht maligne Erkrankungen existieren Marker, die entweder als Screening zur Erfassung der Erkrankung (β -HCG bei Hodentumor, Bence-Jones-Proteine bei Plasmozytom) oder als Verlaufskontrolle (CEA bei Kolorektalem Karzinom, α -1-Fetoprotein bei Leberzellkarzinom oder gutartigen Lebererkrankungen, PSA bei gut- und bösartigen Prostataerkrankungen) verwendet werden. Die Menge beziehungsweise das Neuaufreten dieser Marker hat in vielen Fällen therapeutische und prognostische Auswirkungen.

Seit einiger Zeit ist die Anwendbarkeit der beiden CKI p27^{Kip1} und p21^{Cip1} für die Prognoseeinschätzung verschiedener maligner Erkrankungen nachgewiesen.

Zum Beispiel für p27^{Kip1} beim:

Lungen-Ca [57]; Mamma-Ca [58; 59]; Kolon-Ca [60; 61; 62]; Larynx-Ca [63]; Magen-Ca [64; 65; 66]; Prostata-Ca [67; 68]; Ovarial-Ca [69]; Nierenzellkarzinom [70]

oder für p21^{Cip1} beim Magen-Ca [66; 71]; Ösophagus-Ca [72]; Larynx-Ca [73]; Kolon-Ca [62]

Gezeigt und untersucht wurde, dass der Verlust an dem entsprechenden CKI und damit das Fehlen der Inhibition des Zellzyklus mit einem progressiven Tumorwachstum und damit einer schlechteren Prognose korreliert. Es besteht somit eine inverse Korrelation zwischen dem CKI-Spiegel und der Malignität des Tumors.

1.5 p27^{Kip1} und p21^{Cip1} im Tiermodell

Bei der experimentellen Ballondilatation in verschiedenen Tiermodellen (Dilatation der internen Carotisarterie der Ratte als gängigstes Modell) konnte man feststellen, dass die Veränderungen der Zellzyklusproteine, die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und die Verbreiterung der sich bildenden Neointima in der 1.-3. Woche ihren Höhepunkt hat [5; 11; 56; 74].

Der Verlauf der beiden CKI's bei traumatischer Stimulation war entgegengesetzt. In nicht-traumatisierten Gefäßen fand man hohe $p27^{Kip1}$ Spiegel, die nach dem Trauma herunterreguliert wurden [27; 55]. $p21^{Cip1}$ hingegen zeigte steigende Spiegel nach Gefäßtraumatisierung [26; 56] (s.Abbildung 2, aus [11] entnommen).

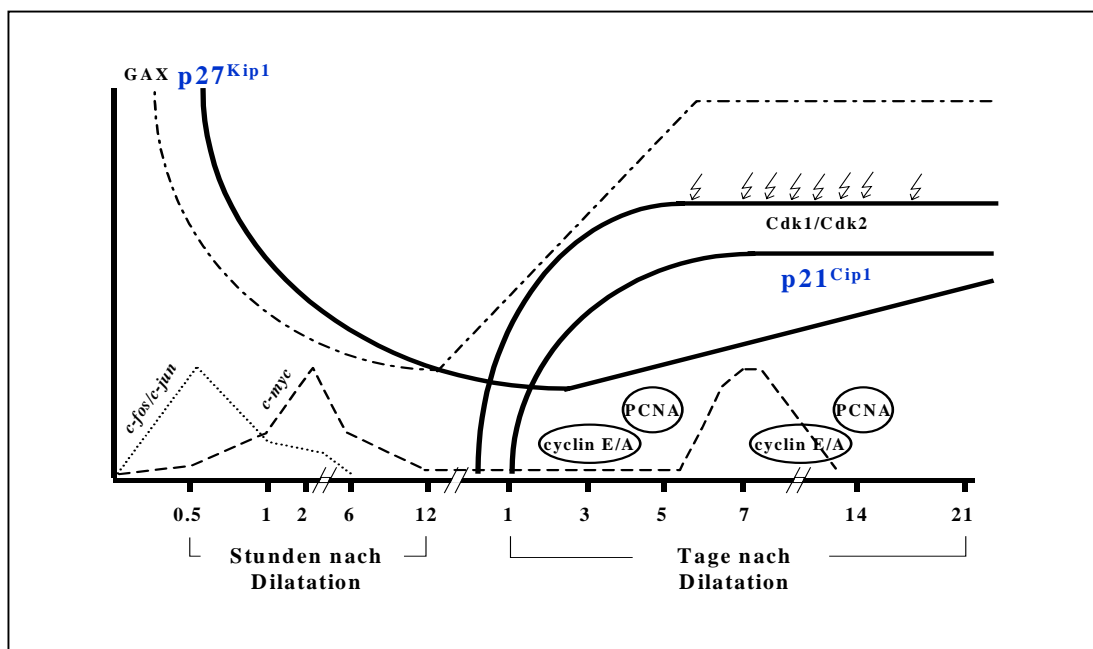


Abbildung 2: Verlauf von Zellzyklusregulatoren wie $p27^{Kip1}$ und $p21^{Cip1}$ nach Ballonangioplastie der A. carotis interna der Ratte aus [11]

1.6 Ziel der Studie

Das Ziel unserer Studie war es, den Gehalt der beiden „cyclin-dependent“ Kinaseinhibitoren $p27^{Kip1}$ und $p21^{Cip1}$ in koronaren Atherektomiegeweben von Primärstenosen und In-Stent Restenosen und in verschiedenen anderen humanen vaskulären Geweben zu bestimmen und die Übertragbarkeit der im Tiermodell zuvor beschriebenen Veränderungen und Regulatormechanismen auf den Menschen zu prüfen.

Im Hinblick auf die Verwendungsmöglichkeit des $p27^{Kip1}/p21^{Cip1}$ als prognostische Marker vieler maligner Erkrankungen wollten wir zudem untersuchen, ob deren Spiegel in Atherektomiegeweben ähnlich den Tumoren prognostische Aussagekraft

für die Entwicklung einer Restenose besitzen. Dazu teilten wir die Gruppe der Primärstenosen in solche, die im Mittel nach 8,5 Monaten nach Primäratherektomie eine angiographisch diagnostizierte Restenose ($\geq 50\%$) entwickelten und solche, bei denen das im gleichen zeitlichen Rahmen nicht der Fall war.

Zusätzlich untersuchten wir Restenosegewebe welches früh (< 200 Tage) und spät (> 200 Tage) entstanden war. Eventuell bestehende Unterschiede der Zellzyklusregulatoren im zeitlichen Verlauf sollten so einen Eindruck der „Aggressivität“ des Wachstums geben. Die proliferative Aktivität der Gewebe ermittelten wir mittels Bestimmung folgender Zellzyklusregulatoren:

-PCNA („proliferating cell nuclear antigen“), das als Zellzyklusaktivator einen akzeptierter Proliferationsmarker darstellt, der nicht nur wie z.B. [^3H]-Thymidin-Markierung Zellen in der S-Phase sondern auch solche in der G1- und G2-Phase kennzeichnet. Es ist daher ein oft eingesetzter Marker für stattfindende Proliferation [25; 27; 75; 76].

-Cdk2 („cyclin-dependent“ Kinase 2), die in der späten G1-Phase durch Phosphorylierung des RB die Zyklusprogression erlaubt und deshalb ebenfalls stattfindende Proliferation anzeigt.

Als extrazelluläres Matrixprotein bestimmten wir die Expressierung des Kollagen III, das eine Untergruppe des Kollagens darstellt, die mit Typ I Kollagen Aggregate bildet und Hauptbestandteil extrazellulärer Matrix atherosklerotischer Plaques und der Neointima nach PTCA darstellt [2; 8; 9]. Koyama zeigte für Kollagenfibrillen außerdem einen Einfluß auf die Zellzyklusregulation durch Hochregulation des p27^{Kip1} [77].

In vitro war ein p27^{Kip1} stabilisierender Effekt von Statinen gefunden worden, welcher für deren protektive Wirkung bezüglich der Atheroskleroseentstehung verantwortlich gemacht wurde [26; 78; 79]. Wir wollten durch Vergleich der klinischen Daten mit dem p27^{Kip1}- Gehalt der Atherektomiegewebe der Koronarien, die Übertragbarkeit auf die in vivo Situation beim Menschen überprüfen.

2. Material

2.1 Patientenkollektiv (Gewebearten)

2.1.1 Koronares Atherektomiegewebe

Die 33 Gewebeproben wurden bei direktionalen Atherektomien der Koronarien (67% LAD = left anterior descending artery, 30% RCA = right coronary artery, 3% RCX = Ramus circumflexus) in den Jahren 1997-98 im Herzkatheterlabor der Inneren Medizin/Kardiologie der Justus-Liebig Universität Gießen gewonnen. Es wurden keine Auswahlkriterien festgelegt, um die Gruppen nicht zu verkleinern. Die Patientencharakteristika sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Die 33 Patientenproben wurden in 2 verschiedene Untergruppen geteilt:

- Restenose (rs): Atherektomie einer In-Stent Restenose (n=18)
- Primärstenose (ps): Atherektomie einer Primärstenose (n=15)

Die geringe Größe der einzelnen Gewebe (zwischen 17,6 und 70 mg) machten eine zusätzliche histologische Untersuchung unmöglich. Deshalb wurde die zuvor durchgeführte histologische Aufarbeitung von Atherektomiegeweben durch Dr. Bohle der Abteilung für Pathologie der JLU als allgemeingültig verwendet. Die vorherrschenden Gewebearten waren fibröse Plaques (95%) und komplizierte Plaques (71%). 24% der Atherektomiegewebe zeigten umschriebene atheromatöse Stellen. Media konnte in 19% der Gewebe entdeckt werden und Adventitia in keinem. In-Stent-Restenosen bestanden v.a. aus glatten Gefäßmuskelzellen und extrazellulärer Matrix [18; 80; 81; 82].

Die Restenosen wurden im Mittel nach $10,4 \pm 2,1$ Monaten (zwischen 2,9 und 27 Monate) nach Stenteinsatz entfernt.

	rs	ps
	n=18	n=15
Alter (Jahre)	63±9	60±9
Frauen	15%	13%
Männer	85%	87%
BMI ("body mass index", kg/m ²)	27±4	28±8
Gesamtcholesterin (mg/dl)	175±13	233±13
Hypertonie	77%	60%
Diabetes mellitus Typ II	23%	33%
Myokardinfarkt	38%	27%
Aortokoronarer Bypass	23%	0%
Statine	100%	53%
ASS	92%	67%
ACE-Hemmer	54%	40%
Zeit zwischen Stenteinsatz und Atherektomie (Monate)	10,4±4	–
Atherektomie aus der RCX	1	–
Atherektomie aus der LAD	7	15
Atherektomie aus der RCA	10	–

(LAD= "left anterior descending coronary artery", RCA= "right coronary artery",
RCX= Ramus circumflexus der linken Koronararterie)

2.1.2 Aortengewebe von Kindern:

Die Proben (n = 7) dieser Gruppe fielen 1999-2000 bei Herzoperationen (Switch Operation bei Transposition der großen Arterien = TGA) in der Herz- und Gefäßchirurgie der Justus-Liebig Universität Gießen an. Es wurden keine Ein- und Ausschlußkriterien festgelegt. Die Gewebestücke wurden im unteren Drittel der Aorta ascendens etwa 2 cm oberhalb der Aortenklappe entnommen und enthalten alle Wandteile.

n= 7

Alter	3 ± 5,48
Mädchen	3 (43%)
Jungen	4 (57%)

2.1.3 Aortengewebe Erwachsener:

Dieses Gewebe (n= 25) wurden im Rahmen von Koronaren Bypass Operationen im Jahr 1999 in der Herz- und Gefäßchirurgie der Justus-Liebig Universität Gießen gewonnen. Die Stenzen wurden im unteren Drittel der Aorta ascendens etwa 2 cm oberhalb der Aortenklappe an einer Stelle entnommen, die makroskopisch keine atherosklerotischen Veränderungen aufwies. Die Adventitia wurde vor Verwendung abpräpariert.

n= 25

Alter	64 ± 10,34
Frauen	3 (12%)
Männer	22 (88%)

2.1.4 Arteria mammaria interna Gewebe (LIMA: „left internal mammary artery“):

Die Gewebeproben (n= 15) wurden 1997 bei Koronaren Bypass Operationen in der Herz- und Gefäßchirurgie der Kerckhoff Klinik in Bad Nauheim gesammelt und entsprechen einem Durchschnitt durch alle Wandteile.

n= 15

Alter	65 ± 8,37
Frauen	3 (20%)
Männer	12 (80%)

2.1.5 Thrombendarteriektomiegewebe der Arteria carotis interna (TEA):

Die Gewebeproben (n= 10) fielen 1999-2000 im Rahmen von Thrombendarteriektomien (TEA) der Arteria carotis interna der Herz- und Gefäßchirurgie der Justus-Liebig Universität Gießen an. Das Gewebe entspricht herausgeschältem atherosklerotischem Material.

n= 10

Alter	69 ± 5,84
Frauen	2 (20%)
Männer	8 (80%)

2.2 Geräte und Hilfsmittel:

Adobe Photoshop 4.0 LE	ADOBE SYSTEMS INCORPORATED, San Jose, USA
Biofuge fresco	HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau
Blockthermostat 1302	HAEP LABOR CONSULT, Bovenden
Blott-Kammer (halbtrocken)	KEUTZ, Reiskirchen
Combitips	EPPENDORF, Hamburg
Elektrophoresekammer (horizontal)	KEUTZ, Reiskirchen
Feinwaage	SARTORIUS, Göttingen
Grobwaage	SARTORIUS, Göttingen
High Voltage Power Pack P30	BIOMETRA, Göttingen
Hybond ECL Nitrocellulose Membran	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
High performance chemoluminescence film Hyperfilm ECL	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
Inkubator 1000	HEIDOLPH, Kelheim
Kämme verschiedener Größe für PAGE-Elektrophorese	KEUTZ, Reiskirchen
Magnetrührer Ikamag RCT basic	IKA LABORTECHNIK, Staufen
Mikro-Federschere (Flachgriff)	AESULAP, Tuttlingen
Minishaker MS1	IKA LABORTECHNIK, Staufen

Ministößel	FISHER, Schwerte
Minizentrifuge	POLY LABO, Heidelberg
Mikrotiterplatte	GREINER, Frickenhausen
Nitrocellulose Membran Hybond ECL	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer SLT Spectra	SLT LABINSTRUMENTS, Crailsheim
Pipette	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Multipette	EPPENDORF, Hamburg
Pipetus-akku	HIRSCHMANN, Eberstadt
Pipettenspitzen	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Polypropylen-Röhrchen 15 ml, 50 ml	GREINER, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,65 ml, 1,5 ml, 2 ml	EPPENDORF, Hamburg
Röntgenkassette	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
Scan Maker III	MICROTEK, Ratingen
Schüttler Duomax 1030	HEIDOLPH, Kelheim
Serologische Einmalpipetten	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Spacer für PAGE-Elektrophorese	KEUTZ, Reiskirchen

Whatman-Filterpapier

SCHLEICHER&SCHÜLL, Dassel

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

	Antikörper				
	p27 ^{Kip1}	p21 ^{Cip1}	PCNA	Cdk2	Kollagen III
Isotyp	IgG monokl.	IgG2a	IgG monokl.	IgG polykl.	IgG monokl.
Wirt	Maus	Maus	Maus	Kaninchen	Maus
Konzentration	200 µg/ml	250 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml
Eingesetzte Konzentration	1 : 200	1 : 500	1 : 200	1 : 200	1 : 100
Aufbewahrungstemp.	2-8 °C	20 °C	2-8 °C	2-8 °C	20 °C
Bezug	Santa Cruz Heidelberg	Trans. Lab. Heidelberg	Santa Cruz Heidelberg	Santa Cruz Heidelberg	Calbioch. Bad Soden

2.3.2 Sekundärantikörper

	Antikörper	
	Anti-Maus	Anti-Kaninchen
Isotyp	IgG-HRP	IgG-HRP
Wirt	Ziege	Ziege
Konzentration	200 µg/500 µl	200 µg/500 µl
Eingesetzte Konzentration	1 : 2000	1 : 2000
Aufbewahrungstemp.	2-8 °C	2-8 °C
Bezug	Santa Cruz Heidelberg	Santa Cruz Heidelberg

HRP „horse-radish peroxydase“ = Meerrettich-Peroxidase

2.4 Chemikalien

30% Acrylamidstammllösung (0,8% Bisacrylamid)	ROTH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	SIGMA, Steinheim
Aprotinin (aus der Rinderlunge)	SIGMA, Steinheim
Aqua destillata	BRAUN, Melsungen
BSA (Bovines Serum Albumin)	BIO-RAD, München
Bromphenolblau	ROTH, Karlsruhe
Dulbecco`s 1x PBS („Phosphate Buffered Saline“)	PAA LABORATORIES, Linz, Österreich
ECL Plus Western blotting detection reagents (A,B)	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
Ethanol	RIEDEL-DE HAEN, Seelze
Glycerol	SIGMA, Steinheim
Glycin	ROTH, Karlsruhe
HCl 37,3% (rauchend)	SIGMA, Steinheim
Isopropanol	MERCK, Darmstadt
Leupeptin	SIGMA, Steinheim
Methanol	RIEDEL-DE HAEN, Seelze
2-Mercaptoethanol	SIGMA, Steinheim

Milchpulver (fettfrei)	BIO-RAD, München
NaCl	ROTH, Karlsruhe
Natrium Deoxycholat	SIGMA, Steinheim
Natrium Orthovanadat	ACROS, Geel, Belgien
NP40 (Igepal Ca-630)	SIGMA, Steinheim
Ocadaic Säure	SIGMA, Steinheim
p27 ^{Kip1} Kontrollprotein (10µg/0,1ml)	SANTA CRUZ, Heidelberg
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	SIGMA, Steinheim
Protein Assay (A,B,S)	BIO-RAD, München
Rainbow Markers Braunschweig	AMERSHAM PHARMACIA,
SDS ultra pure („Sodium Dodecyl Sulfate“)	ROTH, Karlsruhe
TEMED (N,N,N,N-Tetra-Methylthylenediamin)	BIO-RAD, München
Trizma Base	SIGMA, Steinheim
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaureat)	SIGMA, Steinheim

2.5 Lösungen:

2.5.1 Proteinbestimmung:

Reagenz A

- 1-5% Natriumhydroxid
- <1% Natriumtartrat
- <1% Kupfersulfat in destilliertem Wasser

Reagenz B

- <1% Lithiumsulfat
- <1% Tungstic Säure
- <1% Molybdische Säure
- <1% Salzsäure
- <1% Phosphorische Säure in destilliertem Wasser

Reagenz S

- 5-10% Natriumdodecylsulfat in destilliertem Wasser

2.5.2 Western Blot

Elektrophoresepuffer 5x (Stocklösung)

- 15 g Tris
- 72 g Glycin
- 5 g SDS
- ph 8,3
- auf 1 Liter destilliertes Wasser

Ladepuffer 10x

3,3 ml 3,75M Tris ph 6,8
2 g SDS
5 ml Glycerol
3 mg Bromphenolblau
1 ml 2-Mercaptoethanol
auf 10 ml destilliertes Wasser

Stripping Puffer (Stocklösung)

680 µl 2-Mercaptoethanol
6,25 ml 1M Tris ph 6,7
20 ml 10% SDS
auf 100 ml destilliertes Wasser

Transferpuffer (Stocklösung)

14,4 g Glycin
3,03 g Tris
200 ml Methanol
auf 1 Liter destilliertes Wasser

Waschpuffer (Stocklösung)

24,2 g Tris
80 g NaCl
0,1% Tween 20 (erst vor Gebrauch zugeben)
ph 7,6
auf 1 Liter destilliertes Wasser

Blocklösung

5% Milchpulver (fettfrei)
in Waschpuffer (mit Tween 20)

RIPA Puffer

PBS

1%	NP40
0,5%	Natriumdeoxycholat
0,1%	SDS

Inhibitoren (erst bei Gebrauch zufügen)

10 µl/ml von 10 mg/ml PMSF in Isopropanol
30 µl/ml Aprotinin
10 µl/ml 100 mM Natrium Orthovanadat

Aufbewahrung aller Stocklösungen bei 4 °C möglich.

2.6 Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele (PAGE)

2.6.1 Trenngel (5ml):

5%:

30% Acrylamidstammlösung	830 µl
1M Tris (pH 6,8)	630 µl
10% Natrium (Sodium) Dodecylsulfat (SDS)	50 µl
10% Ammoniumpersulfat	50 µl
Temed	5 µl

Mit destilliertem Wasser auf 5 ml auffüllen

2.6.2 Sammelgel (15ml):

10%:

30% Acrylamidstammlösung	5,0 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	3,8 ml
10% SDS	150 µl
10% Ammoniumpersulfat	150 µl
Temed	6 µl

Mit destilliertem Wasser auf 15 ml auffüllen

12%:

30% Acrylamidstammlösung	6,0 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	3,8 ml
10% SDS	150 µl
10% Ammoniumpersulfat	150 µl
Temed	6 µl

Mit destilliertem Wasser auf 15 ml auffüllen

2.6.3 Empfohlene Acrylamidkonzentration für verschiedene Proteingrößen

Proteingröße (kD)	% Acrylamid imTrenngel
36-205	5%
24-205	7,5%
14-205	10%
14-66	12,5%
14-45	15%

3. Methoden

3.1 Lyse der Gewebeproben

Die Lyse der Gewebeproben fand auf Eis statt, um die Aufspaltung der Proteine durch in den Zellen enthaltene Proteasen möglichst gering zu halten. Je nach Probengröße (zwischen 17,6 und 70 mg) wurde RIPA Puffer (siehe 2.5 Lösungen) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben (zwischen 200 und 500 µl), die Probe in dem Puffer mit einer Mikroschere zerkleinert und anschließend mit einem Stössel bearbeitet. Die beiden letzten Schritte wurden mehrmals wiederholt und die Proben nach 30 Minuten für 12 Minuten bei 4° C und 12 000 U/min zentrifugiert. Dann konnte man mit einer Pipette mit einer 100 µl Spitze den Überstand abnehmen, in 100 µl Aliquots in 0,65 ml Reaktionsgefäßen verteilen und das Lysat vor der Lagerung bei -80° C zur Proteinbestimmung verwenden.

3.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte abgeändert nach der Methode von Lowry [83; 84]. Für den Assay wurde eine Mikrotiterplatte verwendet. Essentiell für die Bestimmung des Proteingehalts in µg/µl ist das Mitführen eines internen Standards. Verwendet wurde BSA (Bovines Serum Albumin 0,17 µg; 0,35 µg; 0,7 µg; 1,4 µg) Zusätzlich mußte der Hintergrund, der durch den RIPA Puffer entstanden war, beachtet werden, indem er als weitere Probe gemessen und das Ergebnis vom Proteingehalt der Proben subtrahiert wurde. Von den Proben wurden 5 µl pro Vertiefung verwendet. Der Standard wurde mit destilliertem Wasser auf 5 µl aufgefüllt und in alle Vertiefungen wurden 25 µl Reagenz A (1 ml Reagenz A, 20 µl Reagenz S) und 200 µl Reagenz B zugefügt (siehe 2.5 Lösungen). Nachdem die mit Alufolie abgedeckte Mikrotiterplatte 15 Minuten auf dem Schüttler gestanden und der Farbumschlag ins Blaue stattgefunden hatte, konnte die maximale Absorption bei 750 nm im Photometer abgelesen werden. Sowohl vom Standard als auch von den Lysaten wurde eine zweifache Proteinbestimmung vorgenommen, um eventuelle Pipettierungenauigkeiten durch das Bilden des Mittelwertes auszugleichen.

3.3 Western Blot

3.3.1 Herstellung des zweischichtigen SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970)

Die Acrylamidlösung bildet beim Polymerisieren lange Ketten welche durch Bisacrylamid kovalent verbunden werden. So entstehen abhängig vom totalen Anteil an Feststoffen ($T\% = \text{Acrylamid} + \text{Bisacrylamid}/100 \text{ ml, \% w/v, w= „weight“, v= „volume“}$) und dem Verhältnis von Verbindungsmolekülen des Bisacrylamids zu Acrylamidmonomeren ($C\% = \text{Bisacrylamid}/\text{Acrylamid} + \text{Bisacrylamid, \% w/w}$) Gele verschiedener Porengröße. Das System nach Laemmli (1970) besteht aus dem unteren Trenngel und dem darüber liegenden circa 2 cm breiten Sammelgel, mit den darin liegenden Taschen. Im Sammelgel werden die Proteine konzentriert und im Trenngel der Größe nach separiert. Die beiden Glasplatten, zwischen denen sich später Trenn- und Sammelgel befanden, wurden seitlich durch 2 Spacer auseinandergehalten, rechts, links und unten mit einem Gummischlauch abgedichtet und mit Klammern zusammengepreßt. Die Dichtigkeit konnte durch Einfüllen von destilliertem Wasser getestet werden, welches anschließend wieder ausgeschüttet wurde. Die Trenngellösung (siehe 2.6 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele) wurden in einem Polypropylen-Röhrchen (50 ml) angesetzt und durch Zugabe von 10% APS (Ammoniumpersulfat; Reaktionsinitiator) und TEMED (Reaktionskatalysator) deren Polymerisation gestartet. Noch flüssig konnte das Trenngel nun mit Hilfe des Pipetus-akku und einer serologischen Einmalpipette in den Spalt zwischen den Glasplatten bis zu einer bestimmten Höhe (um noch ausreichend Raum für das spätere Sammelgel zu belassen) gegossen werden. Zur Glättung der Oberfläche konnte man das Trenngel während der Polymerisation mit 1 ml 70% Ethanol bedecken. Die komplette Polymerisation des Acrylamids war nach 1 bis 2 Stunden beendet. Die Ethanolschicht auf dem Trenngel wurde mit destilliertem Wasser abgespült. Die Polymerisationsreaktion des Sammelgels wurde nun, durch Zugabe von APS und TEMED, wie bereits für das Trenngel beschrieben, gestartet. Die Sammelgellösung konnte ebenfalls mit Hilfe des Pipetus-akku und einer serologischen Einmalpipette in den Spalt gegossen werden und der Kamm, welcher die späteren Taschen im Gel bildete, in das noch flüssige Sammelgel geschoben werden. Auch die Polymerisation des Sammelgels benötigte 1 bis 2 Stunden. War sie

erfolgt, konnte der Kamm vorsichtig entfernt und nicht polymerisiertes Gel mit destilliertem Wasser aus den Taschen gespült werden.

3.3.2 Probenbereitung

Bei allen folgenden Schritten wurden die Proben auf Eis bearbeitet. Je nach Antikörper benötigte man zwischen 20 und 40 µg Protein pro Probe

Antikörper	Eingesetzte Proteinmenge
Anti-p27 ^{Kip1}	40 µg
Anti-p21 ^{Cip1}	30 µg
Anti-PCNA	30 µg
Anti-Cdk2	30 µg
Anti-Kollagen	20 µg

Da alle Proben eines Western Blots mit destilliertem Wasser auf ein gleiches Endvolumen gebracht wurden, richtete sich dieses nach dem am niedrigsten konzentrierten und damit voluminösesten Lysat. Das der gewünschten Proteinmenge entsprechende Volumen wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, ein Zehntel des späteren Endvolumens an 10fach konzentriertem (10x) Ladepuffer (siehe 2.5 Lösungen) und die Restmenge an destilliertem Wasser zugegeben. Das im Ladepuffer enthaltene SDS denaturiert die Proteine indem es sie umhüllt und gleichmäßig, entsprechend der Länge des Proteins, mit einer negativen Ladung versieht.

Essentiell für die Aussagekraft eines Western Blots ist das Mitlaufen eines internen Gewichtsstandards, welcher aus einem Gemisch von Proteinen definierter Größe besteht, die auf entsprechender Höhe sichtbare Banden bilden. Dieser Standard wurde bis auf das folgende Erhitzen wie eine Probe behandelt und mit 10x Ladepuffer und destilliertem Wasser versehen. Im Anschluß wurden die mit einer Nadel am Deckel perforierten Reaktionsgefäße für 5 Minuten in einen auf 95°C erwärmten Heizblock gestellt und dann für einige Sekunden in einer Minizentrifuge zentrifugiert.

3.3.3 Elektrophorese

Elektrophorese ist ein Vorgang, bei dem geladene Moleküle in einem elektrischen Feld in Richtung der entsprechenden Elektrode wandern. Da diese Moleküle mit einer Geschwindigkeit entsprechend ihrer Größe, Ladung und Form wandern, dient Elektrophorese der Separation verschiedener Proteinmoleküle. Das Gel ist als stabilisierendes Medium nötig, weil der angelegte Strom, durch die Wärme die er erzeugt, zu Diffusion und damit zum Vermischen der verschiedenen Banden führen würde. Außerdem dienen die Poren des Acrylamidgel als Sieb für die unterschiedlich großen Proteine. Die Elektrophoresekammer des verwendeten vertikalen Systems besteht aus einer oberen und einer unteren Kammer. Die beiden Glasplatten mit dem dazwischen befindlichen Gel, von den Klammern und dem abdichtenden Gummischlauch befreit, bildeten die Seitenwand der oberen Kammer und standen in der mit Elektrophoresepuffer gefüllten unteren Kammer. Das Gel bildete die Verbindung zwischen den beiden Kammern und der Stromfluß von Kathode zu Anode war so gewährleistet. Nun konnte die obere Kammer mit Puffer gefüllt und die Proben mit einer Pipette (100 µl Spitze) vorsichtig in die Taschen des Sammelgels gefüllt werden. Dies war trotz der Füllung der Taschen mit Elektrophoresepuffer möglich, da das Lysat-Ladepuffergemisch eine höhere Dichte besaß und auf den Taschenboden sank. Die Elektrophorese lief mit 90 V konstant für 1,5 bis 3 Stunden je nach Proteingröße und Geldichte. Die Elektrophorese konnte beendet werden, wenn sich die Banden des sichtbaren Gewichtsstandarts und damit auch der Probenproteine der Größe entsprechend genügend weit auseinandergesogen hatten und somit gut zu differenzieren waren.

3.3.4 Transfer

Der Transfer dient dazu, die Proteine vom empfindlichen, nicht lagerbaren Gel auf ein haltbareres Medium, eine Nitrozellulosemembran, zu bringen. Die beiden Glasplatten wurden mit Hilfe eines Messers getrennt und das Gel nach vorsichtigem Zurechtschneiden für 15 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Dies war notwendig, da das Gel in Transferpuffer an Größe verliert, wodurch während des Transfers die Banden auf der Membran unscharf würden. Die Nitrocellulosemembran mußte nach Anfeuchten mit destilliertem Wasser für 2-5 Minuten in Transferpuffer eingeweicht

werden. Für den Transfer eines Gels benötigte man 6 Whatman-Filterpapiere, welche auf die Größe des Gels zurecht geschnitten und ebenfalls in Transferpuffer eingeweicht wurden. Der Boden (Anode) der Blott-Kammer (halbtrockenes System) mußte mit destilliertem Wasser angefeuchtet werden, um den Kontakt für den angelegten Strom zu gewährleisten. Die unterste Lage bildeten 3 Whatman-Filterpapiere, welche blasenfrei übereinandergelegt wurden. Darüber lag die Membran und das Gel und darüber wieder 3 Whatman-Filterpapiere. Nun konnte der ebenfalls mit destilliertem Wasser angefeuchtete Deckel (Kathode) über den Stapel gelegt und die Spannung (35 V konstant für 60 Minuten) angelegt werden. Die Vollständigkeit des Transfers konnte anhand des auf der Membran befindlichen farbigen Gewichtsstandards überprüft werden. Die fertige Membran wurde entweder direkt weiter bearbeitet oder konnte getrocknet auf einer Lage Filterpapier bei 2-8°C aufbewahrt werden.

3.3.5 Immundetektion

Der erste Schritt war das Blocken unspezifischer Bindungsstellen an den Proteinen mit Hilfe einer Blocklösung (5% fettfreies Milchpulver in einfachem (1x) Waschpuffer; siehe 2.5 Lösungen) in welcher die Membran für 1 Stunde unter permanentem leichtem Schütteln lag. Nach Dekantieren der Blocklösung folgte die einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper der in entsprechender Konzentration (siehe 2.3 Antikörper) ebenfalls in Blocklösung zugegeben wurde. Im Anschluss wurde der Antikörper abgeschüttet und die Membran zweimal mit Waschpuffer gespült und dann einmal 15 Minuten und dreimal 5 Minuten in circa 30 ml Waschpuffer auf dem Schüttler gewaschen, um überschüssigen und unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Der nächste Schritt war die Inkubation mit Sekundärantikörper (entsprechend dem jeweiligen Primärantikörper; siehe 2.3 Antikörper) ebenfalls in Waschpuffer (Verdünnung 1:2000) für eine weitere Stunde mit anschließendem Waschen (einmal 15 Minuten; dreimal 5 Minuten). Das spätere Darstellen der Banden auf einem Röntgenfilm wurde ermöglicht durch einen chemolumineszierenden Stoff, der mit der am Sekundärantikörper gebundenen Meerrettichperoxidase (HRP „horseradish peroxydase“) reagierte. Verwendet wurde eine 1:40 Mischung von ECL plus Substanz A und ECL plus Substanz B (siehe 2.5 Lösungen), mit welcher die Membran für 5 Minuten bedeckt wurde, um dann über

einem Filterpapier abgetropft und mit einer Lage Frischhaltefolie möglichst faltenfrei umhüllt zu werden.

Im Anschluß daran konnte die Membran in einer Dunkelkammer einem sensiblen Röntgenfilm für 10 Sekunden bis 5 Minuten exponiert werden. Die Dauer der Exposition hing von der Menge des eingesetzten Proteins, der Antikörperkonzentration und der Spezifität des Primärantikörpers ab.

3.3.6 Strippen der Membran

Um eine Nitrozellulosemembran einem weiteren Antikörper exponieren zu können, wurde die Technik des Strippens angewendet. Hierbei wurden die nach der Immundetektion noch auf der Membran befindlichen Primär- und Sekundärantikörper durch die Zugabe von Stripping Puffer (siehe 2.5 Lösungen) für 30 Minuten bei 52°C in einem langsam schüttelnden Inkubator entfernt. Im Anschluss wurde der Stripping Puffer dekantiert und dessen Reste mit Waschpuffer in zweimal 10 Minuten auf dem Schüttler abgespült und wieder mit dem Blocken begonnen. Die dann folgenden Schritte entsprachen dem bereits beschriebenen Ablauf (siehe 3.3.5 Immunodetektion).

3.3.7 Densitometrische Auswertung

Das Ergebnis eines Western Blots sind verschieden starke Banden auf einem Röntgenfilm. Die Methode der Densitometrie (Dichtigkeitsmessung) ermöglicht es, die entstandenen Banden zu quantifizieren (absolut oder relativ). Hierbei wurden die Banden auf dem Röntgenfilm mit dem Programm Scan Wizard eingescannt und mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop bearbeitet: Es wurde ein Negativbild angefertigt, jede Bande einzeln umfahren und mit Hilfe der Pixel und der mittleren Helligkeit (Pixel*M) ein Produkt gebildet, das die Größe und Dichte der verschiedenen Banden beinhaltet und mit der Menge des gesuchten Proteins korrelierte.

1. Absolute Quantifizierung

Mit Hilfe von p27^{Kip1} Standardprotein konnte eine interne Western-Blot-Standardkurve angefertigt werden (0,1 ng; 0,2 ng; 0,4 ng; 0,6 ng; 0,8 ng; 1,0 ng p27^{Kip1}), die densitometrisch ausgewertet wurde (siehe Abbildung 3). Mit Hilfe

dieser Kurve war es nun möglich, den mitgeführten Gewebeproben des Western Blots entsprechend ihrer Densitometriedaten einen absoluten Wert in ng pro eingesetztem mg Protein zuzuordnen.

Ein exemplarischer Western Blot und dessen densitometrische Auswertung sind in folgender Abbildung gezeigt. Der Korrelationskoeffizient weist mit $r = 0,99$ auf die sehr gute lineare Anordnung der verschiedenen Punkte der Standardkurve hin.

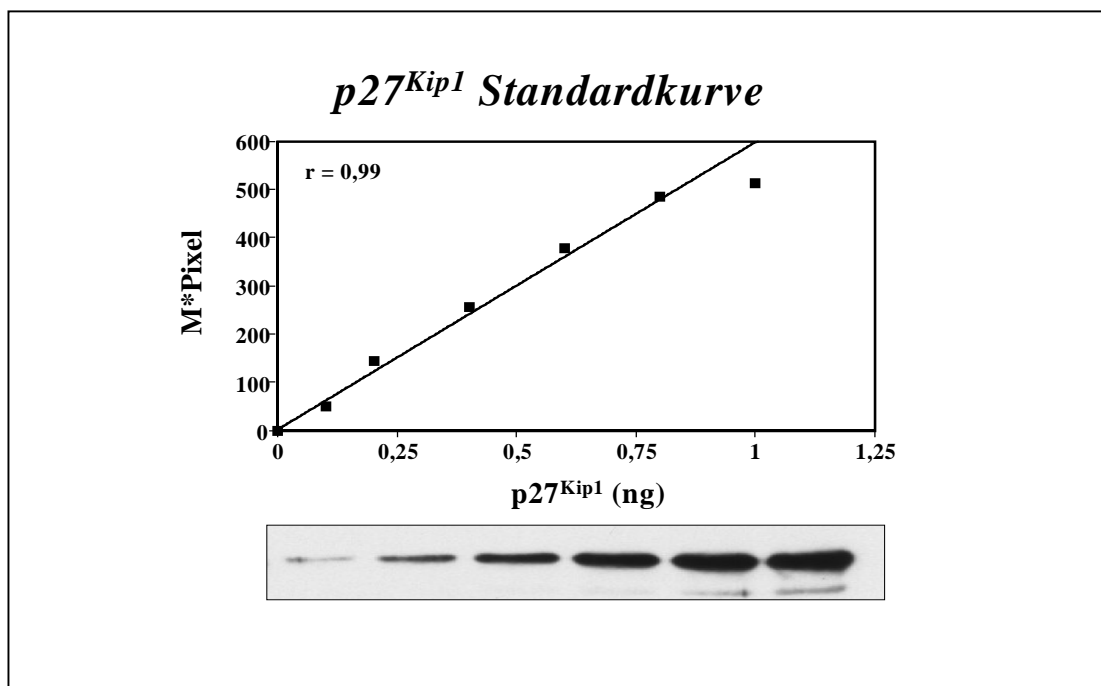


Abbildung 3: Standardkurve mit p27^{Kip1}-Standardprotein und exemplarische Western Blot Banden

2. Relative Quantifizierung

Bei allen Western Blots wurde eine Referenzprobe aus Thrombendarteriektomiegewebe der Arteria carotis interna (TEA) mitgeführt (gleiche Menge an Protein wie die restlichen Proben des Western Blots), mit der die anderen Proben des Blots densitometrisch verglichen und relative Mengenangaben des Proteins in % gebildet werden konnten. So war es möglich, alle Proben verschiedener Western Blots miteinander zu vergleichen. Allerdings erlaubte es diese Art der Auswertung nicht absolute Angaben zu machen.

3.4 Statistik

Alle Angaben der deskriptiven Statistik sind in der Form Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mit ANOVA, der Post-Test mit der Methode nach Bonferroni durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde bei entsprechender Wahrscheinlichkeit p angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Quantifizierung des „cyclin-dependent“ Kinaseinhibitors p27^{Kip1} in vaskulärem Gewebe

4.1.1 Vergleich der verschiedenen Gewebe

Die Spiegel des „cyclin-dependent“ Kinaseinhibitors (CKI) p27^{Kip1} wurden mit Hilfe eines rekombinanten Proteins, mit dem wir eine Standardreihe entwickelt haben quantifiziert (siehe 3.3.7 Densitometrische Auswertung) und der absolute Gehalt in ng/mg eingesetztem Protein angegeben. Wir fanden in den Primärstenosen (ps, 5.9 ± 0.5 ng/mg Protein) signifikant verminderte Werte im Vergleich zu Thrombendarteriektomiegewebe der Arteria carotis interna (TEA, 16.5 ± 1.7 ng/mg Protein), Aorta Erwachsener (14.9 ± 0.9 ng/mg Protein), oder Arteria mammaria interna (LIMA, 16.7 ± 1.1 ng/mg Protein, $p < 0.001$, Abb.4).

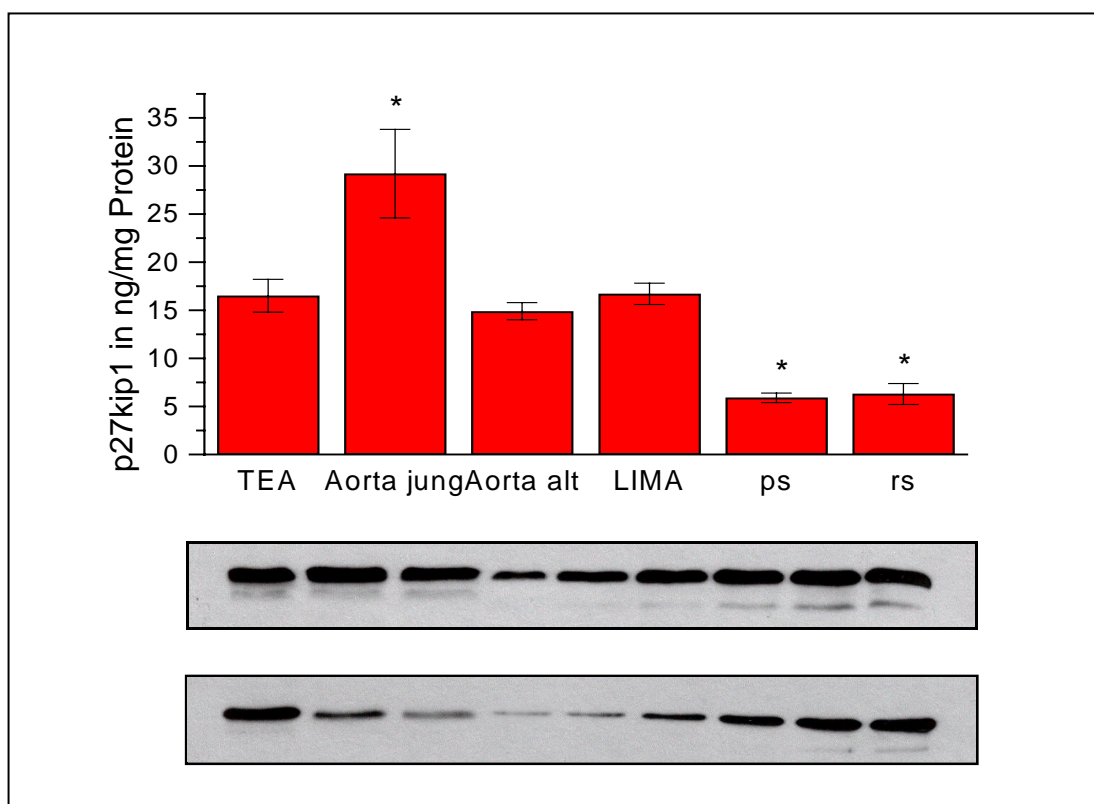


Abbildung 4: p27^{Kip1} Gehalt in ng/mg der verschiedenen vaskulären Gewebe, Fehlerbalken : ±Standardfehler. Exemplarische Western Blots mit je drei Proben (1. Blot: TEA; Aorta jung; Aorta alt; 2. Blot LIMA; ps; rs) und der anschließenden Standardreihe 0,1 ng; 0,2 ng; 0,4 ng; 0,6 ng; 0,8 ng; 1,0 ng

In Restenosegewebe (rs), das im Mittel innerhalb von $10,4 \pm 2,1$ Monaten entstanden war, fanden wir einen Spiegel an $p27^{Kip1}$ der mit $6,3 \pm 1,1$ ng/mg Protein ebenfalls signifikant niedriger als in den Vergleichsgeweben ($p < 0,001$) und somit vergleichbar mit den Primärstenosegeweben war. Signifikant hohe Werte an $p27^{Kip1}$ fanden wir in der kindlichen Aorta mit $29,2 \pm 4,6$ ng/mg Protein, verglichen mit den restlichen Geweben ($p < 0,05$).

4.1.2 Subanalyse der Primärstenosen

Um die mögliche Verwendbarkeit als prognostischen Faktor zu untersuchen, verglichen wir den $p27^{Kip1}$ Spiegel von primären Atherektomieproben, welche im weiteren klinischen Verlauf der Patienten durch eine Re-Stenose belastet waren. Diese waren angiographisch gesichert ($\geq 50\%$ Stenose des Lumens, $n = 4$, in Kontrollangiographie nach im Mittel 8,5 Monaten nach Primäratherektomie) und wurden mit Patienten verglichen, deren Klinik und Re-Angiographie negativ für eine weitere Restenose waren ($n = 11$). Mit $4,8 \pm 0,3$ ng/mg $p27^{Kip1}$ (Abb. 5) in den Proben der Patienten mit späterer Restenose, verglichen mit $6,1 \pm 0,5$ ng/mg Protein der Gewebe der restenosefreien Patientengruppe, konnte man keinen signifikanten Unterschied feststellen.

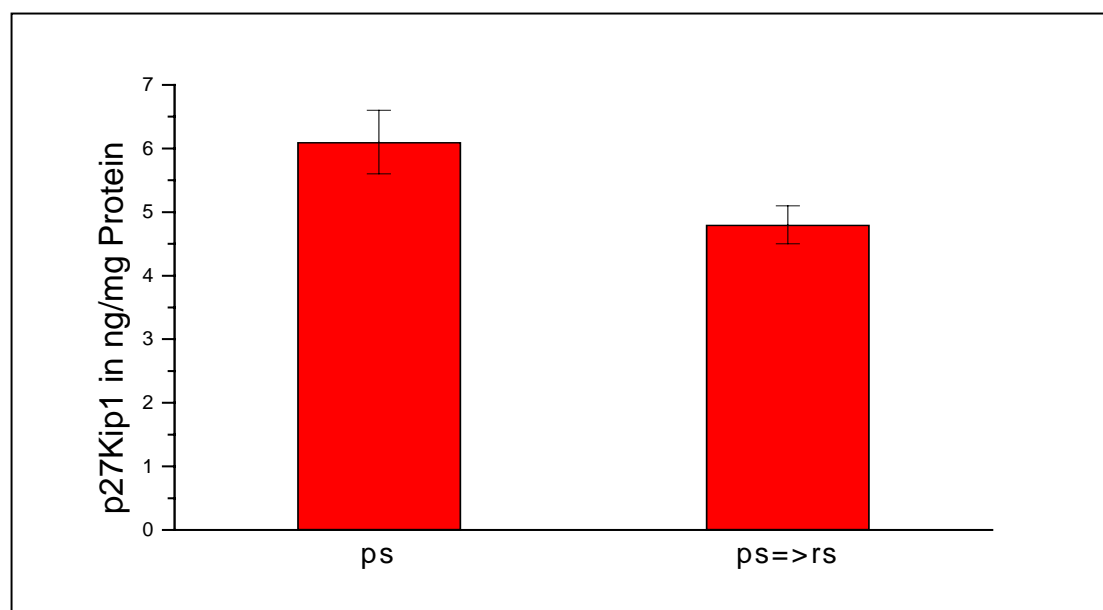


Abbildung 5: $p27^{Kip1}$ Gehalt in Primärstenosen ohne/mit Restenose

4.1.3 Subanalyse der Restenosen

In einer Subanalyse haben wir die Gruppe der Restenosegewebe weiter unterteilt in solche, die früh nach Stenteinsatz entstanden waren (<200 Tage, n= 7) und solche die spät entstanden waren (>200 Tage, n= 11). Damit wollten wir den eventuellen Unterschied im Zeitverlauf beschreiben und zwischen schneller gewachsenen und langsamer entstandenen Restenosen unterscheiden. In beiden Untergruppen wurden die In-Stent-Restenosen durch Atherektomie entfernt. Der Vergleich des Gehalts an p27^{Kip1} zeigte mit 8.6 ± 1.4 ng/mg Protein vs. 4.9 ± 1.4 ng/mg Protein (Abb. 6), dass in den frühen Stenosen tendenziell höhere Spiegel vorhanden waren, aber keine signifikanten Unterschiede bestanden.

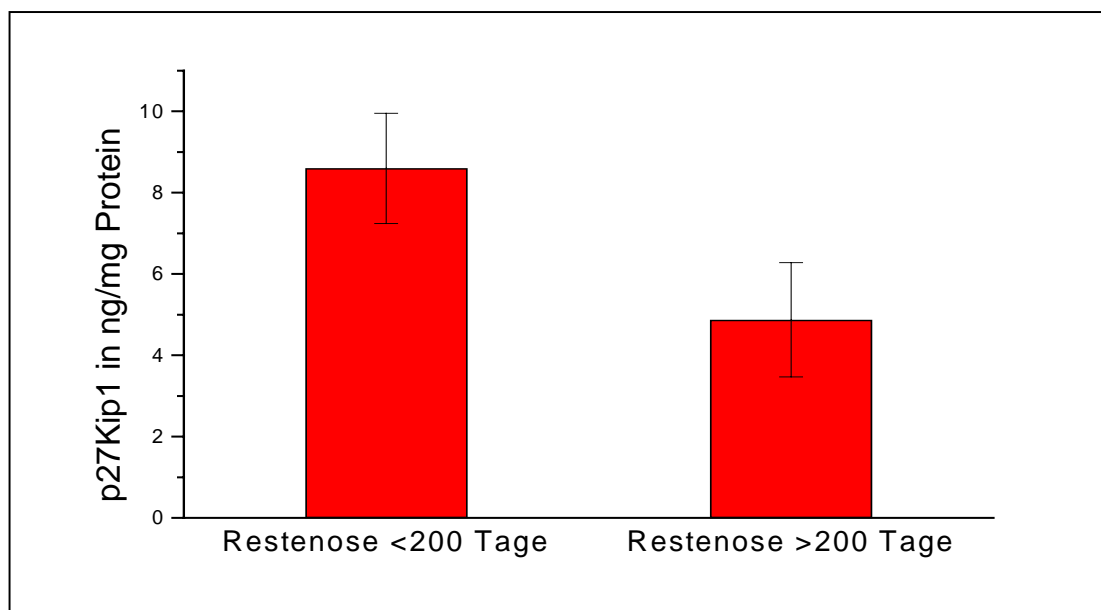


Abbildung 6: p27^{Kip1} Gehalt in ng/mg in frühen/späten Restenosen

4.2 Relative Quantifizierung des „cyclin-dependent“ Kinaseinhibitors p21^{Cip1} in vaskulärem Gewebe

4.2.1 Vergleich der verschiedenen Gewebe

Neben dem CKI („cyclin-dependent“ Kinaseinhibitor) p27^{Kip1} haben wir den ebenfalls in der G1-Phase agierenden CKI p21^{Cip1} (siehe Einleitung) in den Geweben gemessen. In Ermangelung eines Kontrollproteins, wurden die Proteinspiegel für p21^{Cip1} densitometrisch in Relation zum Referenzgewebe der Arteria carotis interna (TEA= Thrombendarteriektomie) gesetzt.

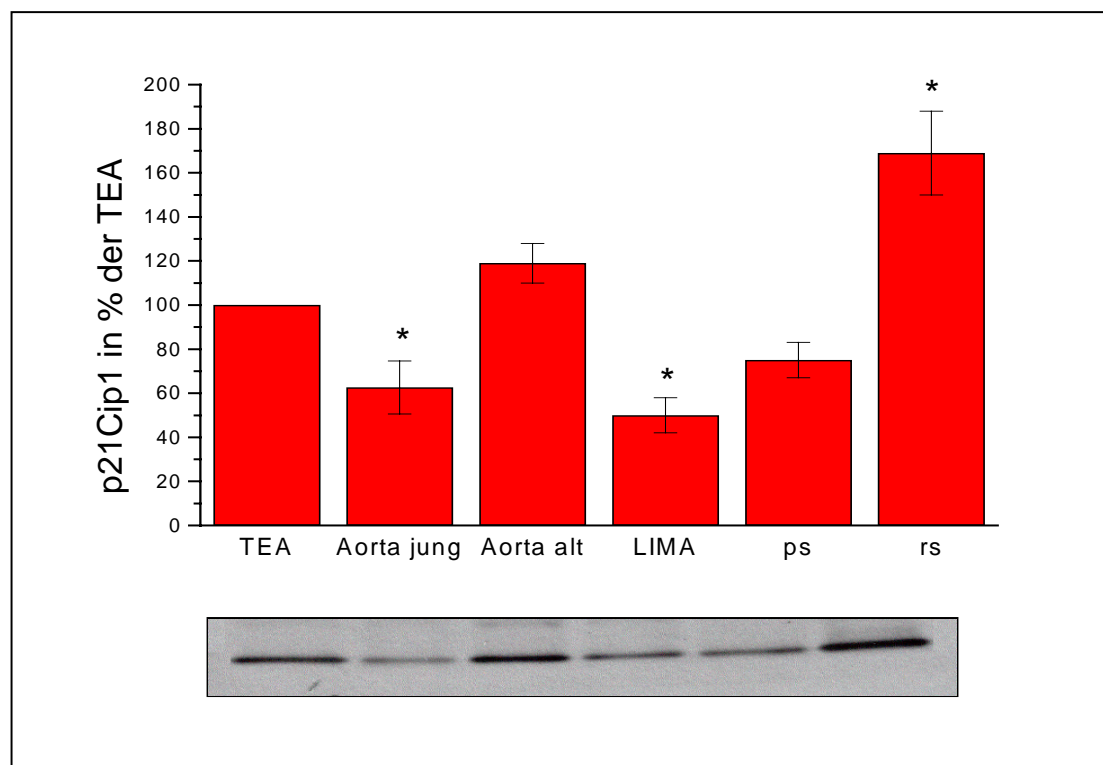


Abbildung 7: p21^{Cip1} Gehalt der verschiedenen vaskulären Gewebe in % des TEA-Gewebes (Thrombendarteriektomie der Arteria carotis interna). Exemplarischer Western Blot der verschiedenen im Balkendiagramm dargestellten Gewebe

Es zeigten sich im Primärstenosegewebe mit 75 ± 8 % der TEA nicht signifikant aber dennoch erniedrigte Spiegel an p21^{Cip1} (Abb.7). Signifikant niedrigere p21^{Cip1} Spiegel waren in der Arteria mammaria interna (LIMA) enthalten (50 ± 8 % der TEA, $p < 0.01$). Damit unterschied sich das Arteria mammaria Gewebe signifikant von der Referenzgröße. Die Restenosegewebe enthielten hingegen signifikant höhere Spiegel verglichen mit TEA (169 ± 19 % der TEA, $p < 0,01$). Nahm man ps als

Vergleichsgewebe, war dieser Unterschied noch stärker betont (225% der Primärstenose). Das Aortengewebe Erwachsener zeigte keine signifikanten Unterschiede zur TEA (119 ± 9 % der TEA).

Im Gegensatz zum CKI $p27^{\text{Kip1}}$ war der Gehalt an $p21^{\text{Cip1}}$ in der Vergleichsgruppe der Kinderaorta mit 62.6 ± 12 % der TEA signifikant niedriger als im Referenzgewebe ($p < 0.05$) und somit in ähnlicher Höhe wie in der LIMA und den Primärstenosen.

4.2.2 Subanalyse der Primärstenosen

Auch die CKI $p21^{\text{Cip1}}$ haben wir hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft untersucht, indem wir die Primärstenosegewebe solcher Patienten, die im weiteren Verlauf eine Restenose entwickelten, mit solchen, die keine Restenose entwickelten, verglichen. Wir fanden mit 73 ± 8 % vs. 79 ± 17 % der TEA keinen Unterschied im $p21^{\text{Cip1}}$ Spiegel der beiden Untergruppen (Abb.8).

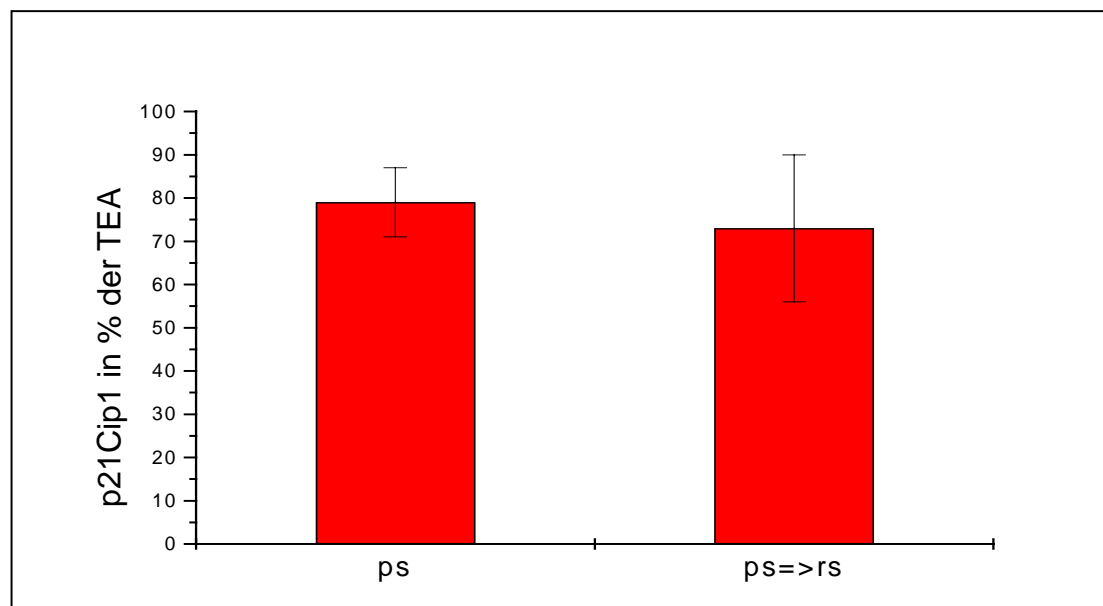


Abbildung 8: $p21^{\text{Cip1}}$ Gehalt in % der TEA in Primärstenosen ohne/mit Restenose

4.2.3 Subanalyse der Restenosen

Die Unterteilung in schnell entstandene Restenosen (<200 Tage, n= 7) und solche die langsamer entstanden waren (>200 Tage, n= 11), brachte keinen signifikanten Unterschied (194±48 % vs.154±11 % der TEA) (Abb.9).

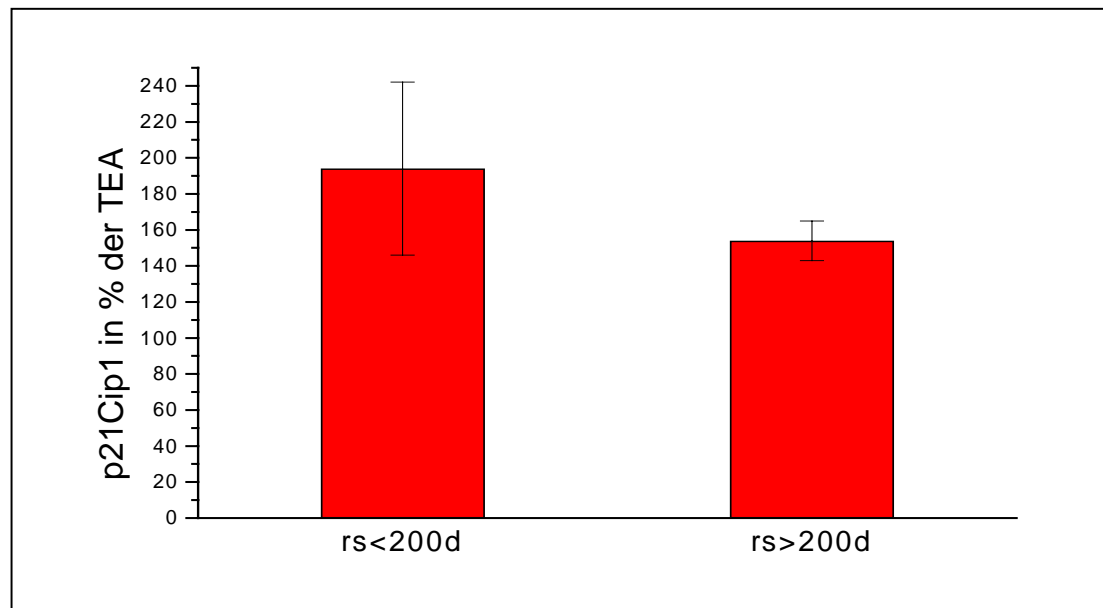


Abbildung 9: p21^{Cip1} Gehalt in % der TEA in frühen/späten Restenosen

4.3 Einfluß von Statinen auf die Expression von p27^{Kip1} und p21^{Cip1} in Primär- und Restenosegewebe

In mehreren Studien konnte in vitro bereits gezeigt werden, daß HMG-CoA Inhibitoren (β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-Coenzym-A; Statine) über eine Stabilisierung von p27^{Kip1} in den Zellzyklus einzugreifen vermögen [26; 78; 79].

Um die Wirkung der Statine auf den p27^{Kip1} Gehalt zu überprüfen, teilten wir die Primärgewebeproben in eine Gruppe von Patienten, die mit Statinen behandelt wurde und solche, die keine Statine einnahmen.

	rs	ps
Statine	100%	53%
Cholesterin (mg/dl)	174±13	232±13

In den Primärgeweben der mit Statinen behandelten Patienten konnten jedoch keine höheren CKI Spiegel ($n= 8$, 5.5 ± 0.8 ng/mg Protein), verglichen mit der unbehandelten Gruppe ($n= 7$, 6.4 ± 0.4 ng/mg Protein) gemessen werden (Abb.10).

Die Patientengruppe mit In-Stent Restenosen war zu 100% ($n= 18$) mit Statinen therapiert worden. Der Spiegel des $p27^{Kip1}$ war mit 6.3 ± 1.1 ng/mg Protein ähnlich hoch wie in den Primärgeweben.

Die Durchschnittsdosis der Statine war mit 28 ± 5 mg/d vergleichbar in allen beiden Gruppen.

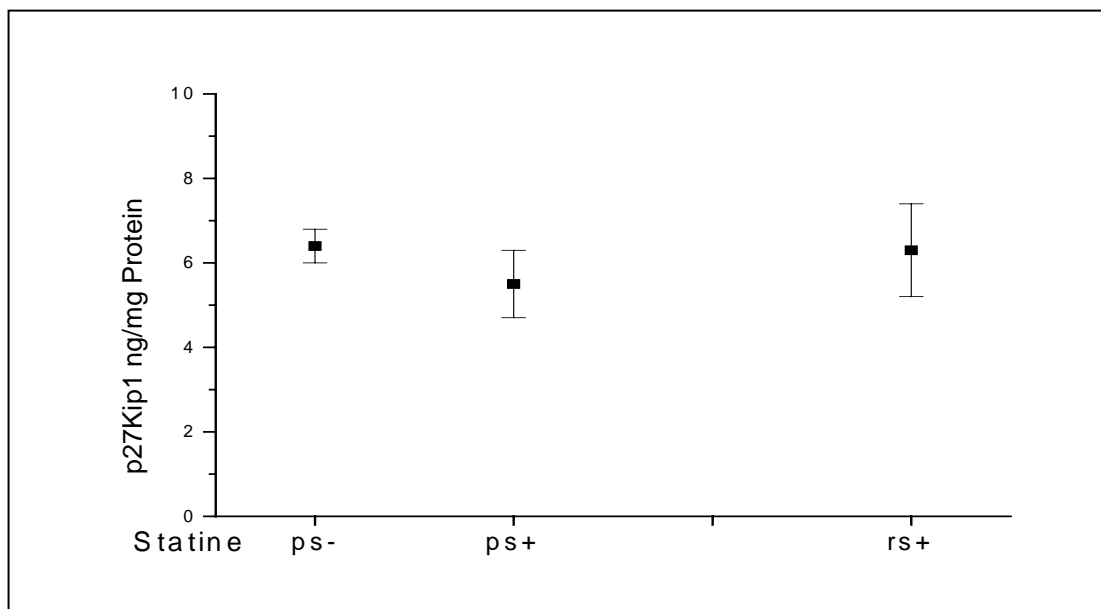


Abbildung 10: Vergleich des $p27^{Kip1}$ Gehalts in ng/mg in den Primärgeweben statinbehandelter Patienten mit solchen unbehalteter Patienten. Vergleich mit Restenosegewebe statinbehandelter Patienten

Auch auf die Expression von $p21^{Cip1}$ schienen die Statine keinen Einfluß zu haben (Primärgewebe mit Statinen vs. ohne Statine 92.3 ± 22 vs. 92.9 ± 18 % der TEA, Abb.11). Die Restenosegruppe hatte wie bereits oben beschrieben (siehe 4.2 Relative Quantifizierung des „cyclin-dependent“ Kinaseinhibitors $p21^{Cip1}$ in vaskulärem Gewebe) deutlich höhere Mengen an $p21^{Cip1}$ (169 ± 19 % der TEA).

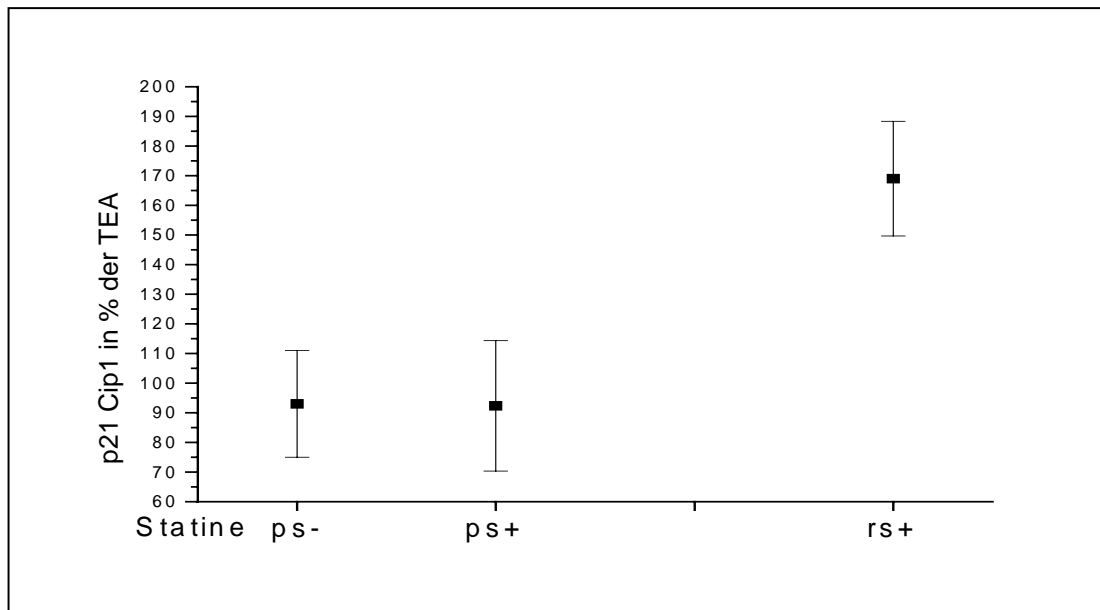


Abbildung 11: Vergleich des p21^{Cip1} Gehalts in % des TEA-Gewebes in den Primärgeweben statinbehandelter Patienten mit solchen unbehalteter Patienten. Vergleich mit Restenosegewebe statinbehandelter Patienten

4.4 Proliferative Aktivität in vaskulärem Gewebe

Um proliferative Aktivität in den Geweben zu messen, bestimmten wir die Spiegel der Proliferationsmarker PCNA („proliferating cell nuclear antigen“) und Cdk2 („cyclin-dependent“ Kinase 2).

Im Vergleich der unterschiedlichen Gewebe konnten wir keine Unterschiede erkennen. Die relativen Spiegel der beiden Proteine, bezogen auf die Referenzgröße TEA, unterschieden sich nicht signifikant (Abb.12).

Auch die Untergruppierung sowohl der Primärgewebe, als auch der Restenosegruppe wie oben bereits beschrieben, brachte keine signifikanten Unterschiede. Die Primärgewebe der Patienten, die im weiteren Verlauf eine Restenose zeigten, hatten sogar niedrigere aber nicht signifikant niedrigere PCNA Spiegel als die Gewebe der restenosefreien Patienten. Cdk2 zeigte hingegen keinen Unterschied (Abb.13 und 14).

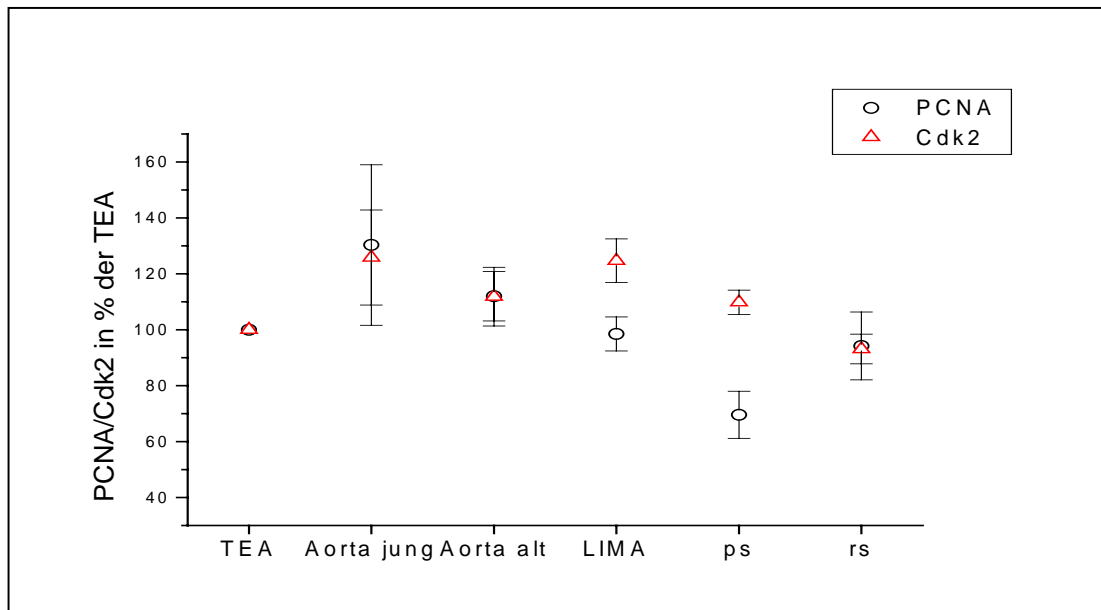


Abbildung 12: Gehalt der Proliferationsmarker PCNA und Cdk2 in % der TEA in den verschiedenen vaskulären Geweben

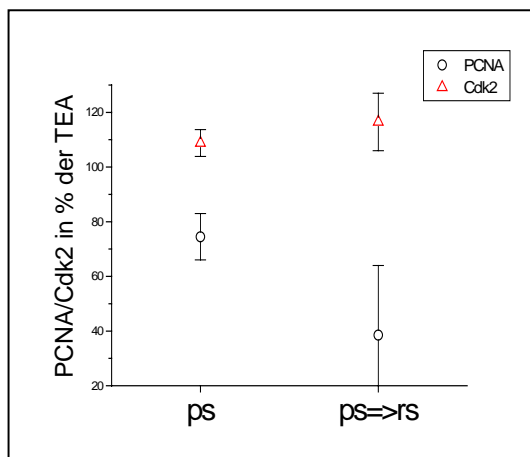


Abbildung 13: PCNA/Cdk2 in % der TEA in Primärstenosen ohne/mit Restenoseentwicklung

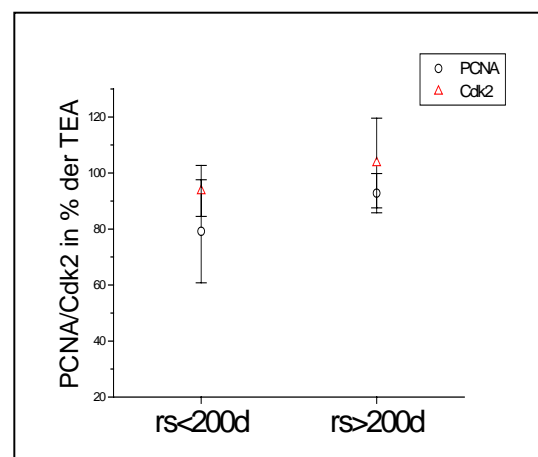


Abbildung 14: PCNA/Cdk2 in % der TEA in frühen/späten Restenosen

Auch die Einnahme von Statinen schien keinen Einfluß auf die Proliferationsmarker PCNA und Cdk2 und damit die proliferative Aktivität zu haben. Die beiden Marker zeigen keine signifikanten Unterschiede in den drei Gruppen (Abb.15). Verglichen

haben wir wieder Primärgewebe von statinbehandelten Patienten mit solchen die nicht behandelt wurden und die Restenosegewebe von statinbehandelten Patienten.

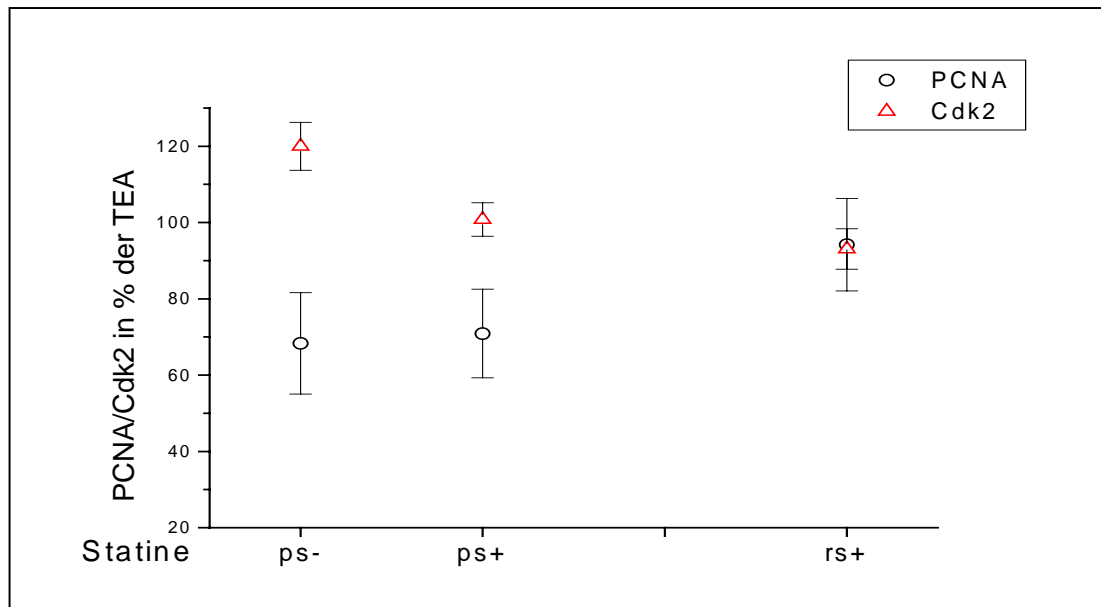


Abbildung 15: Vergleich der Proliferationsmarker PCNA/CDk2 in % von TEA in den Primärgeweben statinbehandelter Patienten mit solchen unbehalteter Patienten. Vergleich mit Restenosegewebe statinbehandelter Patienten

4.5 Vergleich des Kollagen III Gehalts in vaskulärem Gewebe

Neben den Inhibitoren des Zellzyklus $p27^{Kip1}$, $p21^{Cip1}$ und den Proliferationsmarkern und Aktivatoren des Zellzyklus PCNA, Cdk2, haben wir den Gehalt an Kollagen III, einem Matrixprotein gemessen. Dieser Untertyp des Kollagens ist v.a. in dehnbaren Organen wie Blutgefäßen und dem Magen-Darmtrakt enthalten und bildet mit Kollagen I Aggregate [85; 86]. Weiterhin ist Kollagen der größte Bestandteil der extrazellulären Matrix, die nach PTCA deponiert wird und die in primären atherosklerotischen Plaques enthalten ist [2; 8; 9]. Auch hier war TEA als Referenzgewebe verwendet worden (100%). Im kindlichen Aortengewebe war mit 49.5 ± 11.4 % von TEA verglichen mit dem TEA Gewebe signifikant weniger ($p < 0.05$) und mit den anderen Geweben weniger Kollagen III enthalten (Aorta 74.9 ± 7.4 , LIMA 88.6 ± 7.7 % von TEA).

Die beiden Gruppen der Atherektomiegewebe unterschieden sich nur tendenziell im direkten Vergleich: Primär Gewebe vs. Restenose 84 ± 7.9 vs. 107 ± 4.8 % von TEA. Die weitere Subanalyse der Primärstenosen in solche ohne vs. solche mit Restenose erbrachte mit 85.1 ± 9 vs. 77 ± 16 keinen Unterschied.

Auch die Unterteilung der Restenosegewebe in frühe und späte (< 200 Tage) zeigte keinen Unterschied im Kollagen III Gehalt ($113 \pm 7,5$ vs. $104 \pm 6,3$ % von TEA)

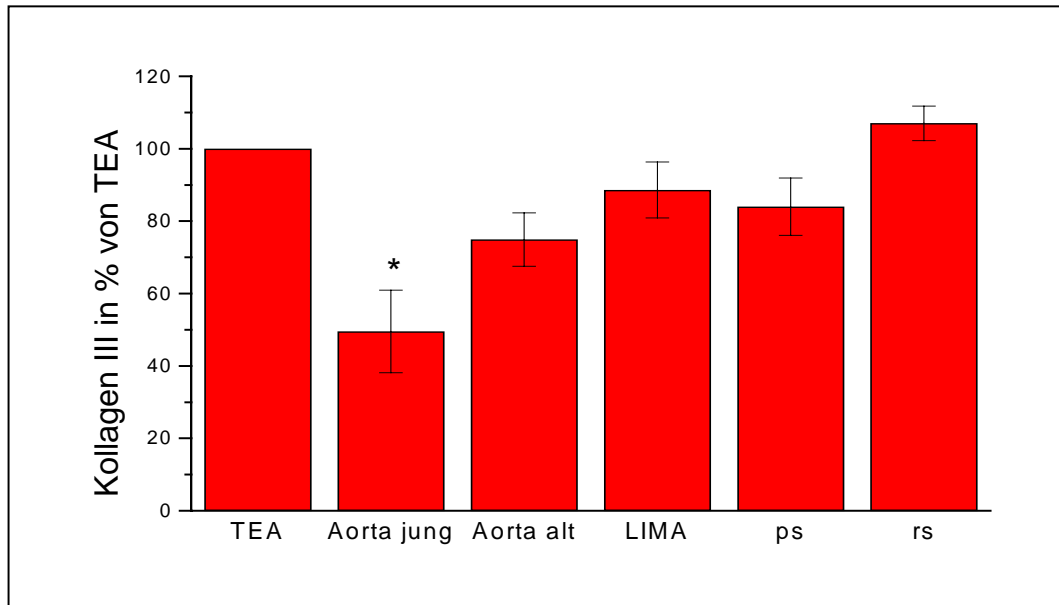


Abbildung 16: Kollagen III Gehalt in % von TEA der verschiedenen vaskulären Gewebe

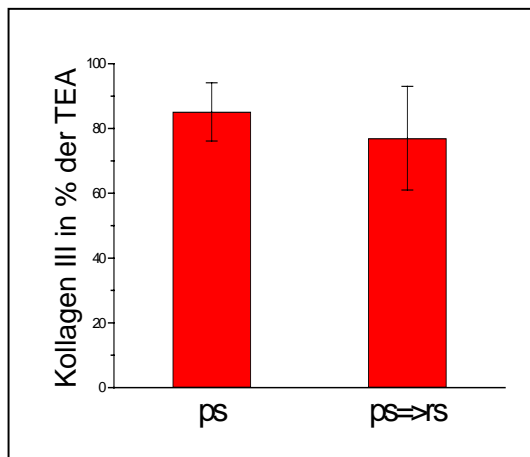


Abbildung 17: Kollagen III in % von TEA in Primärstenosen ohne/mit Restenoseentwicklung

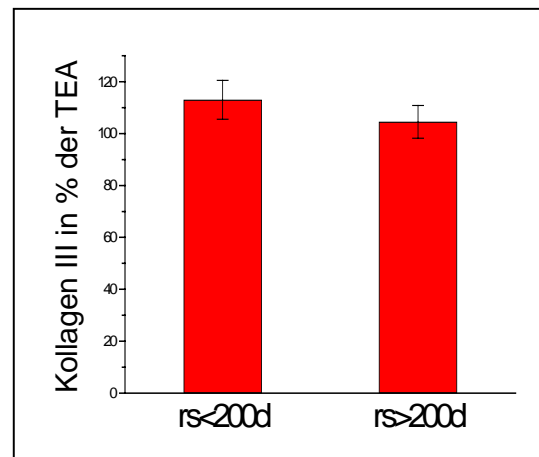


Abbildung 18: Kollagen III in % von TEA in frühen/späten Restenosen

5. Diskussion

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die beiden „cyclin-dependent“ Kinaseinhibitoren (CKI) p27^{Kip1} und p21^{Cip1} prognostische Bedeutung für verschiedene humane Tumoren haben (siehe Einleitung). Auch bei vaskuloproliferativen Erkrankungen in verschiedenen Tiermodellen und in humanem Gewebe, wurden veränderte Spiegel dieser CKI's gefunden [18; 87; 88; 89]. Die klinische Relevanz dieser Entdeckungen wurde allerdings nie gezeigt.

Ziel unserer Studie war es, die Spiegel des p27^{Kip1} und p21^{Cip1} in primären koronaren atherosklerotischen Läsionen und In-Stent-Restenosen, mit verschiedenen anderen vaskulären Geweben zu vergleichen und die CKI-Spiegel mit klinischen Daten zu korrelieren.

Wir konnten zeigen, dass die p27^{Kip1} Expression in Atherektomiegewebe von Stenosen und Restenosen der Koronarien, verglichen mit anderen Gefäßregionen und anderen neointimalen Geweben wie TEA-Gewebe der Arteria carotis interna (TEA: Thrombendarteriektomie) signifikant niedriger war. Allerdings konnte weder für p27^{Kip1} noch für p21^{Cip1} eine prognostische Signifikanz für die Entwicklung einer Restenose gezeigt werden. Unsere Daten, eines stark hochregulierten p21^{Cip1} in Restenosen, sprechen hingegen dafür, dass bei koronarer vaskuloproliferativer Erkrankung des Menschen, im Unterschied zu malignem Wachstum (siehe 1. Einleitung), ein intakter negativer Feedbackmechanismus vorhanden ist. Entsprechend zeigte die proliferative Aktivität in keinem der untersuchten Gewebe Unterschiede. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die p27^{Kip1} Spiegel bei Patienten, die mit Statinen behandelt wurden, nicht höher waren als bei den nicht mit diesem Pharmakon behandelten Patienten. Der günstige Effekt der Statine auf Atherosklerose und Restenose scheint somit nicht auf einem p27^{Kip1}-stabilisierenden Effekt zu beruhen. Beim Kollagen, dem Hauptbestandteil extrazellulärer Matrix, fanden wir in allen Gewebegruppen ähnliche Spiegel. Lediglich in den Kinderaorten war signifikant weniger Kollagen III enthalten als in den übrigen Gruppen. Wir interpretieren dies als eine erst im Laufe des Lebens stattfindende Intimaverdickung und Matrixdeposition [90].

Die koronaren Atherektomiegewebe haben wir mit unterschiedlichen vaskulären Geweben verglichen. Als Referenzgröße verwendeten wir Thrombendarteriektomiegewebe der Arteria carotis interna (TEA), das unserem

koronaren Stenosegewebe im Bezug auf die Gewebezusammensetzung am ähnlichsten war. Es handelt sich ebenfalls um neointimales Stenosegewebe, das ähnlich den In-Stent-Restenosen, keine Mediaanteile aufweist da die Neointima intraoperativ isoliert und direkt herausgeschält werden kann. Als „Negativkontrolle“, das heißt unverändertes humanes vaskuläres Gewebe, verwendeten wir kindliches Gewebe der Aorta ascendens, welches im Rahmen von Herzoperationen wie der „Switch“-Operation bei Transposition der großen Arterien (TGA) ausgestanzt wurde. Da es sich um einen Ausschnitt durch die komplette Gefäßwand handelt, stellt die Media mit glatten Gefäßmuskelzellen den größten Anteil dar. Ein weiteres vaskuläres Gewebe für den Vergleich mit koronaren Stenosegeweben, stellte Aortengewebe Erwachsener dar, das ähnlich dem der Kinder im Rahmen von Bypassoperationen ausgestanzt worden war, also auch aus allen Wandschichten bestand. Da die Stenzen in makroskopisch unverändertem Aortengewebe entnommen wurden, gingen wir davon aus, dass sie nur die altersentsprechende intimale Verdickung aufwiesen, die auch in Koronargefäßen und anderen Arterien des Körpers ab dem 3. Lebensjahr vorzufinden sind [90], aber keine Atherosklerose und Plaquebildung vorlag. Als weiteres Kontrollgewebe verwendeten wir Stücke der häufig und mit guten Langzeitergebnissen als Bypass verwendeten Arteria mammaria interna (LIMA: „left internal mammary artery“). Sie zeigte in der Vergangenheit, im Gegensatz zu Koronarien und anderen Arterien des Menschen, keine altersabhängigen Veränderungen der Intima und wurde bereits in anderen Studien als Beispiel nicht pathologisch veränderter humaner Arterien gegenüber den Koronarien verwendet. Weiterhin hat sie eine mit den Koronararterien vergleichbare Größe und ist ebenfalls den intrathorakalen Druckschwankungen ausgesetzt [91; 92]. Wegen des möglichen Zusammenhangs ihrer relativen Resistenz gegen Atherosklerose und den von uns quantifizierten Zellzyklusregulatoren, stellt die Arteria mammaria in unserer Studie, wie auch in vielen anderen, ein interessantes Vergleichsgewebe dar.

Die bisherigen Studien verwendeten zur Quantifizierung von Proteinen in Gewebestücken immunhistochemische Färbungen, die allerdings einige limitierende Nachteile haben. Zum einen erfolgt die Auswertung bei der Immunhistochemie lediglich in einem Schnitt einer Ebene. Dadurch fällt eine Unterscheidung zwischen einer intraindividuell unterschiedlichen Anzahl positiver Zellen in einer bestimmten Schnittebene und wirklichen interindividuellen Unterschieden schwer. Fokal

klonales Wachstum konnte bereits von Schwartz et al beschrieben werden [93; 94]. Er zeigte den monoklonalen Ursprung einer atherosklerotischen Läsion, die aus vorbestehenden Zellgruppen wächst. Zum anderen handelt es sich bei der Immunhistochemie nur um eine qualitative Aussage, die der Grundvoraussetzung der Zellzyklusregulation nicht gerecht wird. Entscheidend für Zellzyklusprogression und damit die proliferative Aktivität der Gewebe sind nämlich nicht die Einzelspiegel der CKI's und Cdk/Zyclin Komplexe, sondern deren stöchiometrisches Verhältnis zueinander [11; 52; 54; 95]. Die Immunhistochemie hingegen erlaubt nur die qualitative Bewertung der Anzahl PCNA- (oder Cdk2-) positiver Zellen, ohne deren Expressionsspiegel zu berücksichtigen. Mit dieser Technik fand man zum Beispiel in Koronararterien viele positiv Zellen (Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen, T-Lymphozyten und Endothelzellen), sowohl für p27^{Kip1}, als auch für positive Zellzyklusregulatoren, unabhängig davon, ob es sich um atherosklerotische Primärläsionen, Restenosen oder um unveränderte Gefäße handelte [18; 89; 96]. In manchen Studien wurden mit Hilfe der Immunhistochemie, bis zu 59% PCNA-positive Zellen in koronarem Restenosematerial gefunden. Dieser hohe Anteil muß kritisch betrachtet werden, denn selbst Neoplasien weisen mit circa 10% PCNA-positiven Zellen, eindeutig geringere Werte auf (siehe unten) [97; 98]. Es wird deutlich, dass die qualitative Aussage der Immunhistochemie, eine Einschätzung der proliferativen Aktivität schwierig bis unmöglich macht. Deshalb sind die Ergebnisse vieler Immunhistochemie -Studien als fraglich einzustufen.

Die von uns verwendete Technik des Western-Blots mißt hingegen die absolute oder relative Menge des spezifischen Proteins im eingesetzten Gewebe. Sie macht also quantitative Aussagen möglich. Für p27^{Kip1} haben wir mit Hilfe einer Standardkurve aus Kontrollprotein die Spiegel in ng/mg eingesetztem Protein angeben können. Die p21^{Cip1}, PCNA, Cdk2 und Kollagen III Spiegel in den untersuchten Proben wurden in Ermangelung eines Standardproteins densitometrisch mit den gefundenen Spiegeln in den Thrombendarteriektomiegeweben (TEA) der Arteria carotis interna verglichen und als relative Menge angegeben (siehe 3.3.7 Densitometrische Auswertung). Damit konnten wir die unterschiedlichen Zellzyklusproteine der Gewebe direkt miteinander vergleichen und auch die verschiedenen Gewebe untereinander vergleichen.

Der Nachteil des Western Blots hingegen war, dass durch Verwendung des gesamten Probematerials, eine histologische Aufarbeitung nicht mehr möglich war. Außerdem

wird in den Versuchen eine bestimmte Menge Protein eingesetzt, unabhängig davon, ob es sich um zelluläre oder extrazelluläre Proteine handelt. Es konnte allerdings in früheren Studien, durch histopathologische Untersuchungen, gezeigt werden, dass sich Primär- und Restenosegewebe kaum unterschieden und größtenteils aus fibrösen Plaquesgewebe (95%) und komplizierten Plaqueanteilen (71%) bestehen. In 19% der Primärstenosegewebe waren Mediaanteile enthalten [80]. In-Stent-Restenosen bestanden v.a. aus glatten Gefäßmuskelzellen und extrazellulärer Matrix [18; 81; 82].

Bei der experimentellen Ballondilatation in verschiedenen Tiermodellen zeigte sich, dass die Veränderungen der Zellzyklusproteine, die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und die Verbreiterung der sich bildenden Neointima in der Regel in der 1.-3. Woche ihren Höhepunkt haben [5; 11; 56; 74]. Der Verlauf der beiden CKI's bei mitogener Stimulation war entgegengesetzt. In ruhenden Zellen fand man hohe p27^{Kip1} Spiegel, die bei Zellzykluseintritt herunterreguliert wurden [27; 55]. p21^{Cip1} hingegen zeigte steigende Spiegel bei Stimulation [26; 56] (siehe 1. Einleitung). Wir konnten in unserer Studie zeigen, dass der CKI p27^{Kip1} sowohl in der Primär- als auch in der Restenosegruppe der Koronarien, im Vergleich zu anderem vaskulärem Gewebe wie LIMA, Aorta Erwachsener und von Kindern und selbst zu Atherektomiegewebe der Arteria carotis interna, signifikant vermindert war. Dies scheint auf eine generelle Proliferationsbereitschaft der Atherektomiegewebe, vor allem der Primärstenosen mit zusätzlich niedrigen p21^{Cip1} Spiegeln, hinzuweisen. Allerdings konnten wir mit Hilfe der Proliferationsmarker PCNA und Cdk2 weder in der Restenosegruppe, noch in den Primärgeweben Hinweise für vermehrte proliferative Aktivität verglichen mit den anderen vaskulären Geweben zeigen. Die Aufteilung der Primärgewebe (mit/ohne späterer Restenose) und der Restenosen (frühe/späte Restenosen) brachte ebenfalls keine Unterschiede. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen früherer Studien, die ebenfalls humanes Atherektomiegewebe, unter Berücksichtigung des Gewinnungszeitpunktes, auf die Zusammensetzung und proliferative Aktivität hin untersucht haben [81; 87; 92; 99]. In einer Studie von O'Brien et al. [99], fanden sich sowohl in primären, als auch in restenotischen, koronaren Atherektomiegeweben, kein oder so geringe PCNA Mengen, dass man annehmen konnte, dass Proliferation nur in geringem Maße stattgefunden hatte. Selbst in den frühesten Restenosegeweben (innerhalb der ersten 6 Tage nach Primäreingriff entnommen), war nur ein minimaler Anteil der Zellen PCNA positiv.

Allerdings war die Gruppe der frühen Restenosen mit $n=9$ zu gering, um eine tatsächlich erhöhte Proliferation in dieser frühen Phase sicher auszuschließen. Auch der Vergleich des Proliferationsprofils über die Monate, in denen die Restenosen entfernt worden waren, erbrachte keinen Unterschied.

Der niedrige Gehalt an proliferierenden Zellen in primärem Gewebe, also atherosklerotischen Plaques, verglichen mit Koronararterien mit lediglich diffuser intimaler Verbreiterung, war in einer Studie von Gordon et al. [92] beschrieben worden. Die proliferierenden Zellen wurden als glatte Gefäßmuskelzellen, Makrophagen und Leukozyten identifiziert. Die geringe proliferative Aktivität ($<1\%$ der Zellen) stimmt mit der Klinik der primären atherosklerotischen Plaques insofern überein, als dass atherosklerotische Plaques angiographisch und mit Hilfe von Ultraschall über Jahre hinweg unverändert bleiben [100; 101].

In einer weiteren Studie von Strauss et al. [81], in welcher koronare In-Stent-Restenosegewebe mit Restenosegewebe nach Ballonangioplastie verglichen worden waren, fanden sich ebenfalls keine Anzeichen für Proliferation (PCNA positive Zellen). Allerdings existierten große interindividuelle Unterschiede bezüglich der Zelldichte, mit einem Trend der Abnahme der Zelldichte im zeitlichen Verlauf.

Nur bei einer Studie von Pickering et al. [87], fand man, mit Hilfe immunhistochemischer Darstellung PCNA-positiver Zellen, sogar noch nach einem Jahr einen relativ hohen Anteil proliferierender Zellen (glatte Gefäßmuskelzellen, Makrophagen und Endothelzellen). Mit bis zu 59% positiver Zellen bei den Restenosegeweben, zeigten sich sogar höhere Anteile als sie bei Neoplasien beschrieben wurden [97; 98]. Es zeigte sich auch ein deutlicher Unterschied, zwischen primärem und restenotischem Gewebe. Um so erstaunlicher sind die hohen Spiegel der Proliferationsmarker, da keine der Restenosen innerhalb des ersten Monats nach Primärintervention entnommen wurde. Somit wurde ebenfalls nicht die im Tierexperiment beschriebene frühe Situation dargestellt. Allerdings war der Großteil der Atherektomiegewebe aus peripheren Arterien entnommen, die auch in einer Studie von O'Brien eine etwas höhere Proliferationsrate als Atherektomiegewebe der Koronarien besaßen [99].

Trotz der Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit denen vieler Studien, mag es erstaunlich erscheinen, dass kein Unterschied an Proliferation zwischen Primärgeweben, deren langsame Entwicklung bekannt ist, verglichen mit Restenosen nach Stenteinsatz zu bestehen scheint. Es liegt die Vermutung nahe, dass in

Anlehnung an das Tiermodell der Höhepunkt der Proliferation v.a. in den ersten Tagen nach Intervention stattfindet und die von uns gefundenen Veränderungen das Residuum früherer proliferativer Aktivität darstellen. Außerdem kann auch mit wenigen Zellteilungen, d.h. mit niedriger Proliferationsrate, eine Massenzunahme entstehen, die in einem kleinen Lumen wie dem der Koronarien, über kurz oder lang zu einer kritischen Stenose (75-99% Querschnittsverminderung) führt. Des weiteren ist es fraglich, ob die beiden Proliferationsmarker sensitiv genug sind, um kleinste Unterschiede der Proliferation aufzuzeigen, wie sie bei nicht-malignem Wachstum wie neointimaler Entwicklung, erwartet werden. Schon geringste Veränderungen führen zu einem stöchiometrischen Ungleichgewicht zwischen CKI's und Cdk/Zyclin Komplexen und ändern damit die proliferative Aktivität im Gewebe [11; 52; 54]. Weiterhin scheint es Anhaltspunkte für Proliferation unabhängig von PCNA zu geben [102].

Restenosegewebe hingegen, zeigen signifikant erhöhte p21^{Cip1} Spiegel im Vergleich zu Primärstenosen und zum Vergleichsgewebe. In mehreren Studien wurde bereits beschrieben, dass der Spiegel in G0-Phase Zellen niedrig ist und bei mitogener Stimulation in der späten G1-Phase hochreguliert wird, was als negativer Feedback- und Regulatormechanismus der Zellzyklusaktivierung angesehen wird [26; 56]. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die Proliferation zum Zeitpunkt der Restenoseentnahme durch einen intakten negativen Feedbackmechanismus des p21^{Cip1} inhibiert wird. Allerdings weisen sie auch darauf hin, dass Proliferation zu einem früheren Zeitpunkt stattgefunden haben könnte.

Eine tierexperimentelle Studie mit Zeitverläufen, welche unsere Daten stützt und den Zusammenhang der p21^{Cip1} Regulation und der Proliferation demonstriert, ist die Studie von Nabel et al. [56]. Es wurde am Schweinmodell gezeigt, dass p21^{Cip1} die intimale Zellproliferation nach Ballonangioplastie limitiert. Diese Überexpression des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1}, war zeitlich und die Lokalisation betreffend, direkt mit einer Abnahme der intimalen Zellproliferation verbunden. Kurz nach dem Maximum der Proliferation am Tag 7 nach Angioplastie, nahm die p21^{Cip1} Expression zu und verhinderte so als „negativer feedback“ die überschießende Proliferation. Allerdings war auch in dieser Studie beschrieben, dass bereits 60 Tage nach Angioplastie der Gehalt des p21^{Cip1} nicht mehr nachweisbar war. Wir hingegen konnten in den humanen Koronargeweben weiterhin hohe Spiegel finden, obwohl die Angioplastie mit Stenteinsatz im Mittel bereits 10,4 Monate zurücklag. Hierfür

könnte der permanente Wachstumsstimulus durch die Stentstreben verantwortlich sein, der den „negativen feedback“ weiter aufrecht erhält, im Gegensatz zur lediglich transienten Aufdehnung des Gefäßes bei Angioplastie. Außerdem könnte das Modell an der Iliofemoralarterie des Schweins, mit den dort gefundenen Zeitverläufen, nicht direkt auf die Situation an der humanen Koronararterie übertragbar sein. Eine ähnliche negative Feedbackregulation konnte jedoch bereits in Koronarien Herztransplantierter dargestellt werden [103].

In den Vergleichsgeweben fielen die hohen p27^{Kip1} Spiegel des kindlichen Gewebes auf. Sie könnten im Zusammenhang mit physiologischen Wachstumsvorgängen stehen. Durch Hochregulation auch von p27^{Kip1} könnte überschießendes Wachstum verhindert werden und der physiologische Rahmen gewahrt werden. Das p21^{Cip1} hingegen, von dem der negative Feedback bereits aus mehreren tierexperimentellen Studien bekannt ist, war in den Kindergeweben nicht hochreguliert gemessen worden.

Die im Tiermodell systematisch konstruierten Zeitverläufe konnten bei der Untersuchung von humanen Geweben natürlich nicht nachvollzogen werden, da die Proben der individuellen Klinik des Patienten entsprechend zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden. Die Gewebe der In-Stent-Restenosen und auch die der Primärstenosen reflektieren nicht die frühe Situation nach Trauma beziehungsweise während der Atheroskleroseentstehung [100; 101]. Um trotzdem eventuell bestehende Unterschiede in Bezug auf die Zellzyklussituation im zeitlichen Verlauf zu erkennen, unterteilten wir die Restenosen in früh entstandene (<200 Tage; n= 7) und solche, die erst spät (>200 Tage; n= 11) eine Intervention mittels Atherektomie nötig machten. Allerdings wurde die früheste Atherektomie 2,9 Monate nach Stenteinsatz durchgeführt, weshalb auch hier nicht mehr die im Tiermodell beschriebene, früheste Situation nach Intervention dargestellt werden konnte. Die späteste Entnahme der Restenose, fand 27 Monate nach Stentplatzierung statt. Weder bei p27^{Kip1}, noch bei p21^{Cip1}, fanden wir signifikante Unterschiede bei einer Unterteilung in frühe/späte Restenosen. Lediglich tendenziell höhere Werte der frühen Restenosen konnten wir beschreiben. Das heißt, auch die früher symptomatisch werdenden Restenosen haben keine besonders niedrigen CKI-Spiegel als Zeichen eines besonders „aggressiven“ Wachstums, sondern eher tendenziell höhere Spiegel. Dies könnte mit der von Strauss et al. gefundenen Reduktion der Zelldichte im zeitlichen Verlauf nach Stenteinsatz zusammenhängen [81].

Mit dem CKI-Gehalt der Primärgewebe wollten wir deren prognostische Signifikanz hinsichtlich der Restenosebildung, analog verschiedener Tumoren, überprüfen (siehe Einleitung). Dazu haben wir eine Unterteilung der Primärgewebe in Primärgewebe mit folgender Restenose und solche, die in der angiographischen Kontrolle restenosefrei blieben, vorgenommen. Der Vergleich erbrachte keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Gehalts an p21^{Kip1} und p27^{Kip1}. Beide CKIs schienen somit keine prognostische Aussagekraft für die Entwicklung einer Restenose zu haben.

Ein weiterer interessanter Aspekt bei der Interpretation unserer Daten ist die in einigen Studien beschriebene positive Korrelation zwischen laminaren Scherkräften (“shear stress“), die durch den Blutstrom auf die Gefäßwand ausgeübt werden und der Hemmung des Endothelzellwachstums [104; 105; 106; 107]. Als molekularer Mechanismus dieser Inhibition, ist eine Induktion des G1-Phase Inhibitors p21^{Cip1} beschrieben worden. Der Gehalt an p27^{Kip1} blieb unverändert. Die von uns gefundenen Unterschiede im p21^{Cip1} Spiegel der verschiedenen vaskulären Geweben, könnten somit auch mit den regional unterschiedlichen Scherkräften erklärt werden [105]. Da der Gesamtquerschnitt der Arterien in der Peripherie zunimmt, ist die Flußgeschwindigkeit, ebenso wie die Scherkräfte, in den kleineren Gefäßen vermindert [108]. Auf diesem Weg könnten starke Scherkräfte, wie sie in großen Arterien wie der Aorta und der Arteria carotis vorkommen, höhere p21^{Cip1} Spiegel erklären und damit einen gewissen Schutz vor proliferativen, atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen darstellen, wohingegen geringere Scherkräfte in kleinen Gefäßen, wie in Koronarien und in der Arteria mammaria interna, diesen Schutzmechanismus nicht auslösen. Trotzdem ist die LIMA aus bisher ungeklärten Gründen, viel weniger von Atherosklerose betroffen, als vergleichbare andere Gefäße des Menschen. Nach der Größe und auch der intrathorakalen Lokalisation, sollten die Koronarien vergleichbar der LIMA sein. Das betont, bei signifikant niedrigen p21^{Cip1} Spiegeln der LIMA und niedrigen Werten in den Primärstenosen, verglichen mit den Kontrollgeweben TEA und Aorta Erwachsener, den hohen p21^{Cip1} Gehalt in den In-Stent-Restenosen, wo wie bereits beschrieben, wahrscheinlich ein negativer Feedbackmechanismus vorliegt. Die Arteria carotis interna, ebenso wie die Aorta Erwachsener, haben vergleichsweise hohe p21^{Cip1} Spiegel, was mit den höheren Scherkräften zusammenhängen könnte. Die jungen Aorten unterscheiden sich hämodynamisch durch eine besonders gute

Windkesselfunktion von älteren, weniger elastischen Aorten Erwachsener. Im Modell konnte bereits gezeigt werden, dass verminderte Elastizität mit erhöhten Scherkräften einher geht [109]. Durch die bessere Elastizität der Kinderaorten werden also die Scherkräfte verringert, die auf die Wand ausgeübt werden. Ob es einen Zusammenhang zwischen dem von uns gefundenen niedrigeren p21^{Cip1} Spiegel der Kindergewebe, den höheren Spiegeln im Aortengewebe Erwachsener und den unterschiedlichen Scherkräften gibt, kann hier nur spekuliert werden.

Für p27^{Kip1} konnte gezeigt werden, dass es in vitro durch Statine stabilisiert wird. Es wurde postuliert, dass die inhibierende Wirkung der Statine auf das Fortschreiten vaskuloproliferativer Erkrankungen zumindest zum Teil durch diesen Effekt bedingt sein könnte [26; 78; 79]. Dies war nie in vivo bestätigt worden. Wir konnten zum ersten mal zeigen, dass sich der p27^{Kip1} Spiegel im Stenosegewebe der Koronarien von Patienten, die mit Statinen behandelt worden waren, nicht von demjenigen der Patienten, die nicht mit Statinen behandelt worden waren, unterschied. Auch in der Gruppe der Patienten mit In-Stent-Restenosen, die zu 100% Statine erhalten hatten, wurden ähnliche p27^{Kip1} Spiegel gemessen. Der günstige Effekt dieser Wirkstoffgruppe auf Atherosklerose und Restenose scheint somit nicht durch einen p27^{Kip1} stabilisierenden Effekt vermittelt zu sein. Auch auf p21^{Cip1} Spiegel hatten die Statine keinen Einfluß. Die proliferative Aktivität, gemessen an PCNA und Cdk2, war ebenfalls unverändert. Der Unterschied zu den Daten, die in den Zellstudien erhoben wurden, mag mit den bei in vitro Studien üblicherweise verwendeten hohen Dosen der Wirkstoffe zusammenhängen.

Bei der Diskussion über Zusammenhänge positiver und negativer Zellzyklusregulatoren und deren Bedeutung für die Wachstumsvorgänge im vaskulären Gewebe, ist die neuere Erkenntnis wichtig, dass p27^{Kip1}/p21^{Cip1} nicht nur inhibierende, sondern auch aktivierende Funktion im Zellzyklus besitzen. Geringe Mengen beider CKI stabilisieren Zyklin D und ermöglichen hierdurch die Aktivierung der G1-Phase Zyklin/Cdk Komplexe [53; 54; 110; 111]. Erst mehrere Moleküle der CKI's an jedem Zyklin/Cdk Komplex hemmen die Zellzyklusprogression. Dies betont erneut, dass das stöchiometrische Verhältnis und nicht die Absolutmengen, Bedeutung für Zellzyklusvorgänge haben. Für Restenosen würde sich bei hochreguliertem p21^{Cip1}-Gehalt, gleichbleibendem Cdk2- und PCNA-Gehalt, verglichen mit Primärgewebe, eine Verschiebung des Verhältnisses zur Zellzyklushemmung hin ergeben.

Im Tiermodell und humanen Geweben konnte gezeigt werden, dass die Neointima der primären atherosklerotischen Läsionen, der Restenosen nach Ballondilatation und der In-Stent-Restenosen neben zellulären Bestandteilen (glatte Gefäßmuskelzellen, Makrophagen), vor allem aus extrazellulärer Matrix besteht. Man geht sogar davon aus, dass das Hauptvolumen durch extrazelluläre Matrix und nur ein geringer Teil aus Zellen besteht [2; 5; 8; 9; 18; 81; 92; 112; 113]. Das Kollagen bildet dabei den größten Anteil der extrazellulären Matrix. Nach tierexperimenteller Angioplastie zeigte sich, dass trotz gesteigerter Kollagensynthese in den ersten beiden Wochen, der Kollagengehalt unverändert blieb und durch ein Ungleichgewicht zwischen Synthese und Degradation erst zwischen der 4. und 12. Woche zunahm [112; 114].

In unserer Arbeit fanden wir, bezüglich des Kollagen III Gehalts, keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Geweben. Auch die Restenosen unterschieden sich nicht wesentlich von Primärstenosegewebe. Selbst die Unterteilung in früh entstandene Restenosen und spät entstandene sowie die Unterteilung der Primärgewebe brachte keine Unterschiede. Die einzige Gewebegruppe, die unterschiedliche Kollagen III-Spiegel aufwies, war die der Kinderaorten mit signifikant niedrigeren Spiegeln als in der TEA. Das könnte auf eine erst allmähliche Zunahme der extrazellulären Matrix, im Speziellen des Kollagengehaltes durch im Laufe des Lebens zunehmende Verdickung der Intima mit Zellwachstum und Matrixdeposition hindeuten [90].

Wir konnten somit interessante Einblicke über den Gehalt verschiedener Zellzyklusproteine in unterschiedlichen humanen vaskulären Geweben gewinnen. Auch für die Zukunft bleibt der Zellzyklus, als Mittelpunkt der Proliferation, ein sinnvoller Angriffspunkt zur Verhinderung von Stenosen und Restenosen. Dies belegen viele Studien im Tiermodell aber auch bereits in der Klinik.

Es gelang zum Beispiel in einer Studie von Ohno et al. [115] mit Hilfe des Gentransfers der Herpesvirus-Thymidinkinase und der anschließenden Behandlung mit Ganciclovir, die frühe intimale Hyperplasie nach Ballonangioplastie beim Schwein zu limitieren. Auch gelang der Versuch, die Restenose nach Angioplastie der Arteria carotis der Ratte und der Femoralarterie des Schweins, mit Hilfe eines Adenovirus, das eine nicht phosphorylierbare Form eines aktiven Retinoblastomgens (RB) enthielt, zu vermindern [116]. Diese gentherapeutischen Ansätze könnten durch den Einsatz von Stents weiter erleichtert werden, weil durch das starke Trauma eine

Transfektion der medialen glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC= „vascular smooth muscle cell“) erleichtert wird [117]. Die systemische, pharmakologische Prophylaxe einer Restenose durch antiproliferative Substanzen, die eine frühe Proliferation verhindern soll, im Tierversuch erfolgversprechend, konnten beim Menschen bisher jedoch nicht bestätigt werden [118]. Das könnte auf bestehende Speziesunterschiede zurückzuführen sein oder auch mit den beim Menschen nicht ohne erhebliche Nebenwirkungen einsetzbaren, hohen Dosen zusammenhängen. Hier bietet der intravaskuläre Stent die Möglichkeit, lokal hohe Substanzkonzentrationen durch Verwendung sogenannter Hybridstents (Metallgerüst überzogen mit einem Polymer, welches eine aktive Substanz enthält) zu erreichen [117; 119; 120]. Ältere Studien zur lokalen Freisetzung antiproliferativer Substanzen wie Colchicin, Angiopeptin, Doxorubicin, Mitomycin C und Methotrexat, zeigten unterschiedliche, meist nicht eindeutige Ergebnisse [117]. Neuere Studien hingegen, überzeugen durch eine deutliche Verminderung der In-Stent-Restenoserate beim Einsatz der Hybridstents, verglichen mit den unbeschichteten Stents. Die eingesetzten Substanzen sind Rapamycin (= Sirolimus; makrozyklisches Antibiotikum), ein Zellzyklusinhibitor der Zellen in der G1 Phase arretiert [121; 122; 123] und Paclitaxel (= Taxol) ein Spindelgift, welches die Mitose verhindert [124; 125; 126; 127]. Eine weitere erfolgversprechende Methode ist die lokale Bestrahlung nach Ballondilatation, Stenteinsatz oder mittels radioaktiv beschichtetem Stent, die im Tiermodell gute Wirkung auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen zeigte [128; 129]. Trotz anfänglich gemischter Studienergebnisse [130; 131], zeigen die Ergebnisse neuerer Studien deutlich die inhibierende Wirkung auf das Entstehen einer Restenose. Vor allem zur Verhinderung der In-Stent-Restenosen ist die intrakoronare Brachytherapie klinisch etabliert [132; 133; 134; 135].

Dieser kleine Ausschnitt an möglichen Therapiestrategien wird ständig durch neue Ideen ergänzt und der Fortschritt in der Behandlung vaskuloproliferativer Erkrankungen wird auch weiterhin klinische Erfolge zu verzeichnen haben.

6. Zusammenfassung

Proliferation stellt einen integralen Bestandteil der primären Plaquentstehung und der Restenoseentstehung nach Angioplastie dar. Sie wird ermöglicht durch die Hochregulation und Aktivierung spezifischer Kinasen, den „cyclin-dependent“ Kinasen (Cdk), welche Komplexe mit ihren regulatorischen Untereinheiten, den Zyklinen, bilden. Zellzyklusprogression wird zudem von inhibitorischen Proteinen, wie dem p27^{Kip1} und dem p21^{Cip1} (CKI= „cyclin-dependent“ Kinase Inhibitoren) kontrolliert. Diese binden an die Cdk/Zyclin Komplexe und hemmen deren Aktivierung. Dies führt zum Zellzyklusarrest. Vice versa erlauben niedrige Spiegel die Proliferation. Bei vielen Malignomen des Menschen korrelieren niedrige Spiegel des p27^{Kip1} oder p21^{Cip1} mit einer schlechten Prognose. Ob diese Zellzyklusinhibitoren auch einer Regulation in neointimalem Gewebe unterliegen und ob sie eine prognostische Aussage für die Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen zulassen, war Gegenstand dieser Arbeit. Hierfür haben wir die Spiegel dieser beiden Zellzyklusinhibitoren in humanem koronaren Atherektomiegewebe von Primärläsionen (n= 15) und In-Stent Restenosen (n= 18) bestimmt und mit anderen vaskulären Geweben verglichen. Die Vergleichsgewebe waren Primärstenose der Arteria carotis interna, Aortengewebe von Kindern und Erwachsenen und Arteria mammaria interna. Die Ergebnisse haben wir mit klinischen Daten verglichen. Weiterhin haben wir die Spiegel des Kollagen III, als Hauptbestandteil extrazellulärer Matrix, in den Geweben untersucht. Mittels quantitativem Western Blot bestimmten wir signifikant niedrige p27^{Kip1} Spiegel sowohl im koronaren Primär- als auch Restenosegeweben verglichen mit allen anderen Geweben. Die p27^{Kip1} Spiegel hatten jedoch weder prognostischen Wert für die Entwicklung einer Restenose in Primärläsionen, noch unterschied sich schnell (<200 Tage) von langsam (>200 Tage) entstehendem restenotischen Gewebe im p27^{Kip1} Spiegel. Der Gehalt an p21^{Cip1} in den Restenosen war jedoch, verglichen mit Primärstenosen, signifikant hochreguliert. Dies könnte auf eine zuvor bestehende Proliferation hinweisen, die durch einen intakten negativen Feedback-Mechanismus in den Restenosen antagonisiert wird, um eine überschießende Proliferation zu verhindern. Hierin scheint sich vaskuläres Gewebe von Malignomen zu unterscheiden, die diesem Regulationsmechanismus nicht mehr unterliegen. Auch die p21^{Cip1} Spiegel

besaßen jedoch keinen prognostischen Wert für die Restenoseentwicklung in Primärläsionen.

Wir fanden weiterhin, daß die p27^{Kip1} Spiegel in den Atherektomiegeweben von Patienten, die mit Statinen behandelt wurden, nicht erhöht waren. Somit scheint der positive Effekt der Statine auf Atheroskleroseentwicklung beim Menschen nicht, wie in vitro gefunden, auf einer vermehrten p27^{Kip1} Expression zu beruhen [26; 78; 79].

Der Kollagen III Gehalt war in allen Geweben ähnlich. Lediglich das Aortengewebe der Kinder hatte signifikant niedrigere Spiegel. Dies könnte mit einer erst im Laufe des Lebens stattfindenden Matrixdeposition bei intimaler Verdickung der gesamten Gefäße des Menschen zusammen hängen [90].

Mit Hilfe der Proliferationsmarker PCNA und Cdk2 bestimmten wir in allen Gruppen ähnliche Spiegel, was insgesamt auf eine niedrige proliferative Aktivität, auch in den koronaren Atherektomiegeweben, hinweist. Proliferation muß jedoch zur Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen stattgefunden haben und sich so der Bestimmung in „alten“ Atherektomieproben entziehen. Antiproliferative Ansätze haben sich bereits in der Prävention vaskuloproliferativer Erkrankungen in Tiermodellen und in der Klinik etabliert.

Wir konnten in unserer Studie interessante Vergleiche verschiedener Zellzyklusaktivatoren und –inhibitoren in unterschiedlichen humanen vaskulären Geweben aufzeigen. Der Zellzyklus wird auch in Zukunft eine wichtige Schlüsselrolle für die Behandlung und vor allem die Verhinderung vaskuloproliferativer Erkrankungen des Menschen darstellen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Yutani C, Imakita M, Ishibashi-Ueda H, Tsukamoto Y, Nishida N, Ikeda Y: Coronary atherosclerosis and interventions: pathological sequences and restenosis. *Pathol. Int.* 49:273-290, 1999
- [2] Ross R: Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.* 57:791-804, 1995
- [3] Ross R: Atherosclerosis and inflammatory disease. *Am Heart J.* 138:419-420, 1999
- [4] Ross R, Glomset J, Harker L: Response to injury and atherogenesis. *Am. J. Pathol.* 86:675-684, 1977
- [5] Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM: Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab. Invest.* 49:208-215, 1983
- [6] Clowes AW, Clowes MM, Fingerle J, Reidy MA: Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery. *Cardiovasc. Pharmacol.* 6:12-15, 1989
- [7] Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM: Kinetics of cellular proliferation after arterial injury, I: smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab. Invest.* 49:327-333, 1983
- [8] Barnes MJ, Farndale RW: Collagens and Atherosclerosis. *Exp. Gerontol.* 34:513-525, 1999
- [9] Bode MK, Mosorin M, Satta J, Risteli L, Juvonen T, Risteli J: Complete processing of type III collagen in atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:1506-1511, 1999
- [10] Serruys PW, De Jaegere P, Kiemeneij G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, Belardi J, Sigwart V, Colombo A, Goy JJ, von den Heuvel P, Delcan J, Morel MA: A comparison of balloon-expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 331:489-495, 1994
- [11] Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Dzau VJ: Cell cycle progression: New therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation* 98:82-89, 1998
- [12] Clowes AW, Schwartz SM: Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ. Res.* 56:139-145, 1985

-
- [13] Eltchaninoff H: Curative treatment of restenosis. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 92:1589-1593, 1999
- [14] Dussailant GR, Mintz GS, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Popma JJ, Wong SC, Leon MB: Small stent size and intimal hyperplasia contribute to restenosis: a volumetric intravascular ultrasound analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 26:720-724, 1995
- [15] Fischman DL, Leon MB, Baim BS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M, Cleman M, Heuser R, Alomond D, Teirstein PS, Fish D, Colombo A, Brinker J, Moses J, Shankovich A, Hirshfeld J, Bailey S, Ellis S, Rake R, Goldberg S: A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 331:496-501, 1994
- [16] Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR: Restenosis and proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J. Am. Coll. Cardiol.* 19:267-274, 1992
- [17] Schwartz RS: The vessel wall reaction in restenosis. *Semin. Interv. Cardiol.* 2:83-88, 1997
- [18] Kearney M, Pieczek A, Haley L, Losordo DW, Andres V, Schainfeld R, Rosenfield K, Isner JM: Histopathology of In-Stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 95:1998-2002, 1997
- [19] Hoffmann R, Mintz GS, Dussailant GR, Popma JJ, Pichard AD, Satler JF, Kent KM, Griffin J, Leon MB: Patterns and mechanisms of In-Stent Restenosis: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 94:1247-1254, 1996
- [20] Miller DD, Karim MA, Edwards WD, Schwartz RS: Relationship of vascular thrombosis and inflammatory leucocytes infiltration to neointimal growth following porcine coronary artery stent placement. *Atherosclerosis* 124:145-155, 1996
- [21] Komatsu R, Ueda M, Kojima A: Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological and immunohistochemical analyses. *Circulation* 98:224-233, 1998
- [22] Elledge SJ: Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274:1664-1672, 1996, Review

-
- [23] Pardee AB: G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246:603-608, 1989
- [24] Pardee AB: Multiple molecular levels of cell cycle regulation. *J. Cell. Biochem.* 54:375-378, 1994
- [25] Sherr CJ: G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79:551-555, 1994
- [26] Sherr CJ, Roberts JM: Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Gen. Dev.* 9:1149-1163, 1995
- [27] Stillman B: Smart machines at the DNA replikation fork. *Cell* 78:725-728, 1994
- [28] Weinberg RA: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330, 1995
- [29] DeGregori J, Kowalik T, Nevins JR: Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol. Cell Biol.* 15:4215-4224, 1995
- [30] Hunter T: Oncoprotein networks. *Cell* 88:333-346, 1997
- [31] Phuchareon J, Tokuhisa T: Deregulated c-Fos/AP-1 modulates expression of the cyclin and the cdk gene in splenic B cells stimulated with lipopolysaccharid. *Cancer Lett.* 92:203-208, 1995
- [32] Kelly K, Cochran BH, Stiles CD, Leder P: Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogenes and platelet-derived growth factor. *Cell* 35:603-610, 1983
- [33] Shichiri M, Hanson KD, Sedivy JM: Effects of c-myc expression on proliferation , quiescence, and the G0 to G1 transition in nontransformed cells. *Cell Growth Differ.* 4:93-104, 1993
- [34] Daksis JI, Lu RY, Facchini LM, Marhin WW, Penn LJ: Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* 9:3635-3645, 1994
- [35] Steiner P, Philipp A, Lukas J, Godden-Kent D, Pagano M, Mittnacht S, Bartek J, Eilers M: Identifikation of a myc-Dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *The EMBO Journal* 14:4814-4826, 1995
- [36] Hanson KD, Shichiri M, Follansbee MR, Sedivy JM: Effects of c-myc expression on cell cycle progression. *Mol. Cell Biol.* 14:5748-5755, 1994
- [37] Avruch J, Zhang XF, Kyriakis JM: Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem. Sci.* 19:279-283, 1994

-
- [38] Dobrowolski S, Harter M, Stacey DW: Cellular ras activity is required for passage through multiple points of the G0/G1 phase in BALB/c 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* 14:5441-5449, 1994
- [39] Liu JJ, Chao JR, Jiang MC, Ng SY, Yen JJ, Yang-Yen HF: Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* 15:3654-3663, 1995
- [40] Leon G, DeGregori J, Sears R, Jakoi L, Nevins JR: Mac and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* 387:422-425, 1997
- [41] Marhamati DJ, Sonenshein GE: B-Myb expression in vascular smooth muscle cells occurs in a cell cycle-dependent fashion and downregulates promoter activity of type I collagen genes. *J. Biol. Chem.* 271:3359-3365, 1996
- [42] Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331, 1997
- [43] el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825, 1993
- [44] Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B: The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369:574-577, 1994
- [45] Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne B, Jacks T: p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362:847-849, 1993
- [46] Cross SM, Sanchez CA, Morgan CA, Schimke MK, Ramel S, Idzera RL, Rasking WH, Reid BJ: A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 267:1353-1356, 1995
- [47] Del Sal GD, Ruaro EM, Utrera R, Cole CN, Levine AJ, Schneider C: Ras 1-induced growth suppression requires transactivation-independent p53 function. *Mol. Cell Biol.* 15:7152-7160, 1995
- [48] Gorski DH, Patel CV, Walsh K: Homeobox transcription factor regulation in the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc. Med.* 3:184-190, 1993
- [49] Gorski DH, Le Page DF, Patel CV, Copeland NG, Jenkins NA, Walsh K: Molecular cloning of a diverged homeobox gene that is rapidly down-regulated during the G0/G1 transition in vascular smooth muscle cells. *Mol. Cell Biol.* 13:3722-3733, 1993

-
- [50] King RW, Jackson PK, Kirschner MW: Mitosis in transition. *Cell* 79:563-571, 1994
- [51] King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW: How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274:1652-1658, 1996
- [52] Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Dzau VJ: Cell cycle progression. *Circulation* 98:82-89, 1998
- [53] Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ: The p21^{Cip1} and p27^{Kip1} CDK „inhibitors“ are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *The EMBO Journal* 18:1571-11583, 1999
- [54] Sherr CJ, Roberts JM: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Gen. Dev.* 13:1501-1512, 1999
- [55] Braun-Dullaeus RC, von der Leyen HE, Mann MJ, Zhang L, Morris RE, Dzau VJ: Loss of p27^{Kip1} and Induction of Cdk1 in rat carotid artery following ballon catheter injury. *FASEB J.* 11:A153, 1997
- [56] Yang ZY, Simari RD, Perkins ND, San H, Gordon D, Nabel JG, Nabel EG: Role of the p21 cyclin-dependent kinase inhibitor in limiting intimal cell proliferation in response to arterial injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:7905-7910, 1996
- [57] Catzavelos C, Tsao MS, DeBoer G, Bhattacharya N, Shepherd FA, Slingerland JM: Reduced expression of the cell cycle inhibitor p27^{Kip1} in non-small cell lung carcinoma: a prognostic factor independent of Ras. *Cancer Res.* 59:684-688, 1999
- [58] Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM: Expression of cell-cycle regulators p27^{Kip1} and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat. Med.* 3:222-225, 1997
- [59] Tan P, Cady B, Wanner M, Worland P, Cukor B, Magi-Galluzzi C, Lavin P, Draetta G, Pagano M, Loda M: The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res.* 57:1259-1263, 1997
- [60] Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M: Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-

- dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat. Med.* 3:231-234, 1997
- [61] Palmqvist R, Stenling R, Oberg A, Landberg G: Prognostic significance of p27(Kip1) expression in colorectal cancer: a clinico-pathological characterization. *J. Pathol.* 188:18-23, 1999
- [62] Cheng JD, Werness BA, Babb JS, Meropol NJ: Paradoxical correlation of cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1 and p27kip1 in metastatic colorectal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 5:1057-1062, 1999
- [63] Fan GK, Fujieda S, Sunaga H, Tsuzuki H, Ito N, Saito H: Expression of protein p27 is associated with progression and prognosis in laryngeal cancer. *Laryngoscope* 109:815-820, 1999
- [64] Takano Y, Kato Y, van Diest PJ, Masuda M, Mitomi H, Okayasu I: Cyclin D2 overexpression and lack of p27 correlate positively and cyclin E inversely with a poor prognosis in gastric cancer cases. *Am. J. Pathol.* 156:585-594, 2000
- [65] Kwon OJ, Kang HS, Suh JS, Chang MS, Jang JJ, Chung JK: The loss of p27 protein has an independent prognostic significance in gastric cancer. *Anticancer Res.* 19:4215-4220, 1999
- [66] Jang SJ, Park YW, Park MH, Lee JD, Lee YY, Jung TJ, Kim IS, Choi IY, Ki M, Choi BY: Expression of cell-cycle regulators , cyclin E and p21WAF1/CIP1, potential prognostic markers for gastric cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 25:157-163, 1999
- [67] Yang RM, Naitoh J, Murphy M, Wang HJ, Phillipson J, deKernion JB, Loda M, Reiter RE: Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. *J. Urol.* 159:941-945, 1998
- [68] Tsihlias J, Kapusta LR, DeBoer G, Morava-Protzner I, Zbieranowski I, Bhattachary N, Catzavelos GC, Klotz LH, Slingerland JM: Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} is an novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res.* 58:542-548, 1998
- [69] Newcomb EW, Sosnow M, Demopoulos RI, Zeleniuch-Jacquotte A, Sorich J, Speyer JL: Expression of the cell cycle inhibitor p27^{Kip1} is a new prognostic marker associated with survival in epithelial ovarian tumors. *Am. J. Pathol.* 154:119-125, 1999

-
- [70] Migita T, Oda Y, Naito S, Tsuneyoshi M: Low expression of p27 (KIP1) is associated with tumor size and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 94:973-979, 2002
- [71] Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K: Increased proliferative activity caused by loss of p21 (WAF1/CIP1) expression and its clinical significance in patients with early-stage gastric carcinoma. *Cancer* 94:2107-2112, 2002
- [72] Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Hatano K, Kitayama J, Tsuruo T, Domene CE, Muto T: p21Waf1/Cip1 expression is a prognostic marker in curatively resected esophageal squamous cell carcinoma, but not p27Kip1, p53 or Rb. *Ann. Surg. Oncol.* 6:481-488, 1999
- [73] Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Buffa R, Di Finizio D, Cesana BM, Neri A: Clinical relevance of expression of CIP/KIP cell-cycle inhibitors p21 and p27 in laryngeal cancer. *J. Clin. Oncol.* 17:3150-3159, 1999
- [74] Groves HM, Kinlough-Rathbone RL, Richardson M, Jorgensen L, Moore S, Mustard JF: Thrombin generation and fibrin formation following injury to rabbit neointima: studies of vessel wall reactivity and platelet survival. *Lab. Invest.* 40:605-612, 1982
- [75] Kurki P, Ogata K, Tan EM: Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and cytometry. *J. Immunol. Methods* 109:49-59, 1988
- [76] Celis JE, Celis A: Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S-Phase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:3262-3266, 1985
- [77] Koyama H, Raines EW, Bornfeldt KE, Roberts JM, Ross R: Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors. *Cell* 87:1069-1078, 1996
- [78] Rao S, Lowe M, Herliczek TW, Keyomarsi K: Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of Cdk2 activity and redistribution of p21 and p27, independent of p53. *Oncogene* 17:2393-2402, 1998
- [79] Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by

- preventing rho GTPase-induced downregulation of p27^{Kip1}. *J. Biol. Chem.* 274:21926-21931, 1999
- [80] Haberbosch W, Bohle RM, Franke FE, Danilov S, Alhenc-Gelas F, Braun-Dullaeus R, Hölschermann H, Waas W, Tillmanns H, Gardemann A: The expression of angiotensin-I converting enzyme in human atherosclerotic plaques is not related to the deletion/insertion polymorphism but to the risk of restenosis after coronary interventions. *Atherosclerosis* 130:203-213, 1997
- [81] Strauss BH, Umans VA, van Suylen RJ, de Feyter PJ, Marco J, Robertson GC, Renkin J, Heyndrickx G, Vuzevski VD, Bosman FT: Directional atherectomy for treatment of restenosis within coronary stents : clinical, angiographic and histologic results. *J. Am. Coll. Cardiol.* 20:1465-1473, 1992
- [82] Garratt KN, Edwards WD, Kaufmann UP, Vlietstra RE, Holmes DR Jr.: Differential histopathology of primary atherosclerotic and restenotic lesions in coronary arteries and saphenous vein bypass grafts: analysis of tissue obtained from 73 patients by directional atherectomy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 17:442-448, 1990
- [83] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275, 1951
- [84] Peterson GL: Review of the Folin Phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randell. *Analytic Biochemistry* 100:201220, 1979
- [85] Bornstein P, Sage H: Structurally distinct collagen types. *Ann. Rev. Biochem.* 49:957-1003, 1980
- [86] Romanic AM, Adachi E, Kadler KE, Hojima Y, Prockop DJ: Copolymerisation of pNcollagen III and collagen I. pNcollagen III decreases the rate of incorporation of collagen I into fibrils, the amount of collagen I incorporated and the diameter of the fibrils formed. *J. Biol. Chem.* 266: 12703-12709, 1991
- [87] Pickering JG, Weir L, Jekanowski J, Kearney MA, Isner MJ: Proliferative activity in peripheral and coronary atherosclerotic plaque among patients undergoing percutaneous revascularisation. *J. Clin. Invest.* 91:1469-1480, 1993

-
- [88] Wei GL, Krasinski K, Kearney M, Isner JM, Walsh K, Andres V: Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty. *Circ. Res.* 80:418-426, 1997
- [89] Tanner FC, Yang ZY, Duckers E, Gordon D, Nabel GJ, Nabel EG: Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in vascular disease. *Circ. Res.* 82:396-403, 1998
- [90] Sims FH, Gavin JB, Vanderwee MA: The intima of human coronary arteries. *Am. Heart J.* 118:32-38, 1989
- [91] Sims FH: A comparison of coronary and internal mammary arteries and implications of the results in the etiology of arteriosclerosis. *Am. Heart J.* 105:560-566, 1983
- [92] Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM: Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:4600-4604, 1990
- [93] Schwartz SM, Murry CE : Proliferation and the monoclonal origins of atherosclerotic lesions. *Annu. Rev. Med.* 49:437-460, 1998
- [94] Schwartz SM, Heimark RL, Majesky MW: Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Phys. Rev.* 70:1177-1209, 1990
- [95] Reed SI, Bailly E, Dulic V, Hengst L, Resnitzky D, Slingerland J: G1 control in mammalian cells. *J. Cell Sci. Suppl.* 18:69-73, 1994
- [96] Ihling C, Technau K, Gross V, Schulte-Monting J, Zeiher AM, Schaefer HE: Concordant upregulation of type II-TGF-beta-receptor, the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} and cyclin E in human atherosclerotic tissue: implications for lesion cellularity. *Atherosclerosis* 144:7-14, 1999
- [97] Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehulsing M, Eckel HE: Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral. Oncol.* 35:583-589, 1999
- [98] Ahmed R, Soomro IN, Aziz SA, Hasan SH: p53 and PCNA expression in benign, atypical and malignant meningiomas. *JPMA J. Pak. Med. Assoc.* 49:241-243, 1999
- [99] O'Brien ER, Alpers CE, Stewart DK, Ferguson M, Tran N, Gordon David, Benditt EP, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM: Proliferation in Primary and Restenotic Coronary Atherectomy Tissue. *Circ. Res.* 73:223-231, 1993
- [100] Brown BG, Lin JT, Kelsey S, Passamani ER, Levy RI, Dodge HAT, Detre KM: Progression of coronary atherosclerosis in patients with probable

- familial hypercholesteolemia. Quantitativ arteriographic assessment of patients in NHLBI type II study. *Arteriosclerosis* 9:181-190, 1989
- [101] Roederer GO, Langlois YE, Jager KA, Primozich JF, Beach KW, Phillips DJ, Strandness DE: The natural history of carotid arterial disease in asymptomatic patients with cervical bruits. *Stroke* 15:605-613, 1984
- [102] Weiser-Evans MC, Quinn BE, Burkard MR, Stenmark KR: Transient reexpression of an embryonic autonomous growth phenotype by adult carotid artery smooth muscle cells after vascular injury. *J. Cell Physiol.* 182: 12-23, 2000
- [103] Baas IO, Offerhaus JA, El-Deiry WS, Wu TC, Hutchins GM, Kasper EK, Baughman KL, Baumgartner WA, Chiou CJ, Hayward GS, Hruban RH: The WAF 1-mediated p53 growth suppressor pathway is intact in coronary arteries of heart transplant recipients. *Hum. Pathol.* 27:324-329, 1996
- [104] Akimoto S, Mitsumata M, Sasaguri T, Yoshida Y: Laminar shear stress inhibits vascular endothelial cell proliferation by inducing cyclin-dependent kinase inhibitor p21Cip1. *Circulation Res.* 86:185-190, 2000
- [105] Shaaban AM, Duerinckx AJ: Wall shear stress and early atherosclerosis: a review. *Roentgenol.* 174:1657-1665, 2000
- [106] Chapman GB, Durante W, Hellums JD, Schafer AI: Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 278:748-754, 2000
- [107] Lin K, Hsu PP, Chen BP, Yuan S, Usami, S, Shyy JY, Li Ys, Chien S: Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:9385-9389, 2000
- [108] Schmidt RF, Thews G: „Physiologie des Menschen“. 26. Auflage: Kapitel V/24, 1995
- [109] Liu Y, Lai Y, Nagaraj A, Kane B, Hamilton A, Greene R, McPherson DD, Chandran KB: Pulsatile flow simulation in arterial vascular segments with intravascular ultrasound images. *Med. Eng. Phys.* 23:583-595, 2001
- [110] Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ: Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 11:957-972, 1997

-
- [111] LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E: New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 11:847-862, 1997
- [112] Strauss HB, Chisholm RJ, Keeley FW, Gotlieb AI, Logan RA, Armstrong PW: Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. *Circulation Research* 75:650-658, 1994
- [113] Wang H, Li Z, Moore S, Alavi MZ: Collagen biosynthesis by neointimal smooth muscle cells cultured from rabbit aortic explants 15 weeks after de-endothelialization. *Int. J. Exp. Pathol.* 79:47-53, 1998
- [114] Guarda E, Katwa LC, Campbell SE, Tanner MA, Webel MA, Laughlin H, Jenkins S, Myers PR: Extracellular matrix collagen synthesis and degradation following coronary balloon angioplasty. *J. Mol. Cell Cardiol.* 28:699-706, 1996
- [115] Ohno T, Gordon D, San H, Pompili VJ, Imperiale MJ, Nabel GJ, Nabel EG: Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science* 265:781-784, 1994
- [116] Chang MW, Barr E, Seltzer J, Jiang Y-Q, Nabel GJ, Nabel EG, Parmacek MS, Leiden JM: Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product. *Science* 267:518-522, 1995
- [117] Baily SR: Local Drug Delivery: current Applications. *Progress in Cardiovascular Diseases* 40:183-204, 1997
- [118] Herrman JP, Hermans WR, Vos J, Serruys PW: Pharmacological approaches to the prevention of restenosis following angioplasty. The search for the Holy Grail? (Part I and II), *Drugs* 46:18-52, 249-262, 1993
- [119] Fischell TA: Polymer coating for stents. Can we judge a stent by it's cover. *Circulation* 94:1494-1495, 1996
- [120] van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, van Bensekom HM, Serruys PW, Holmes DR jr., Ellis SG, Topol EJ: Marked inflammatory sequelae to implantations of biodegradable a nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation* 94:1690-1697, 1996
- [121] Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R: A

- randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N. Engl. J. Med.* 346:1773-1780, 2002
- [122] Rensing BJ, Vos J, Smits PC, Foley DP, van den Brand MJ, van der Giessen WJ, de Feijter PJ, Serruys PW: Coronary restenosis elimination with a sirolimus eluting stent: first European human experience with 6-month angiographic and intravascular ultrasonic follow-up. *Eur. Heart J.* 22:2054-2057, 2001
- [123] Sousa JE, Costa MA, Abizaid A: Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation* 103:192-195, 2001
- [124] Hong MK, Kornowski R, Bramwell O, Ragheb AO, Leon MB: Paclitaxel-coated Gianturco-Roubin II (GRII) stents reduce neointimal hyperplasia in a porcine coronary in-stent restenosis model. *Coron. Artery Dis.* 12:513-515, 2001
- [125] Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kim DW, Ware M jr., Nater C, Hruban RH, Rezai B, Abella BS, Bunge KE, Kinsella JL, Sollott SJ, Lakatta EG, Brinker JA, Hunter WL, Froehlich JP: Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. *Circulation* 103:2289-2295, 2001
- [126] Axel DI, Kunert W, Goggelmann C et al: Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery. *Circulation* 96:636-645, 1997
- [127] Liistro F, Stancovic G, Di Mario C, Takagi T, Chieffo A, Moshiri S, Montorfano M, Carlino M, Briguori C, Pagnotta A, Albiero R, Corvaja N, Colombo A: First clinical experience with a paclitaxel derivate- eluting polymer stent system implantation for in-stent restenosis: immediate and long-term clinical and angiographic outcome. *Circulation* 105:1883-1886, 2002
- [128] King SB: Intravascular radiation for restenosis prevention: could it be the holy grail? *Heart* 17:99-100, 1996
- [129] Hehrlein C, Gollan C, Dönges K, Metz J, Riessen R, Fehsenfeld P, van Hodenberg E, Kübler W: Low-dose radioactive endovascular stents prevent

smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia in rabbits.

Circulation 92:1570-1575, 1995

- [130] Popowsky Y, Verin V, Urban P: Endovascular beta-irradiation after percutaneous transluminal coronary ballon angioplasty. *Int. J. Radiat. Oncol.* 36:841-845, 1994
- [131] Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mitz GS, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Morris NB, Leon MB, Tripuraneri P: Catheter-based radiotherapie to inhibit restenosis after coronary stenting. *N. Eng. J. Med.* 336:1697-1703, 1997
- [132] Ajani AE, Waksman R, Kim HS, Satler LF, Pichard AD, Kent KM, Porrazzo M, White RL, Pinnow EE, Lindsay JR: Excimer laser coronary angioplasty and intracoronary radiation for in-stent restenosis: six-month angiographic and clinical outcomes. *Cardiovasc. Radiat. Med.* 2:191-196, 2001
- [133] Suntharalingam M, Lakey W, Lansky AJ, Waksman R, White L, Teirstien P, Massullo V, Rutherford B, Elman A, Kuntz RE, Popma JJ, Bonan R: Clinical and angiographic outcomes after use of 90 Strontium/90 Yttrium beta radiation for the treatment of in-stent restenosis : results from the Stents and Radiation Therapy 40 (START 40) registry. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 52:1075-1082, 2002
- [134] Silber S: Intracoronary radiation therapy in controlled and open clinical trials with afterloading systems and „hot“ balloon catheters. Analysis of 6.692 patients. *Herz* 27:30-55, 2002
- [135] Baumgart D, Sauerwein W, Naber C, Kaiser CA, Meusers P, Quast U, Langner I, Flühs D, Stuschke M, Erbel R: Strahlentherapie der Herzkranzgefäße. *Dtsch Arztebl.* 99:A 2252-2256, 2002

8. Abbildungsverzeichnis

Abb.1:

Vereinfachtes Schema des Zellzyklus mit den verschiedenen Signaltransduktionssystemen aus [8] 9

Abb. 2:

Verlauf von Zellzyklusregulatoren wie p27^{Kip1} und p21^{Cip1} nach Ballonangioplastie der A. carotis interna der Ratte aus [8] 11

Abb. 3:

Standardkurve mit p27^{Kip1}-Standardprotein und exemplarische Western Blot Banden 34

Abb. 4:

p27^{Kip1} Gehalt in ng/mg der verschiedenen vaskulären Gewebe, Fehlerbalken : ±Standardfehler. Exemplarische Western Blots mit je drei Proben (1. Blot: TEA; Aorta jung; Aorta alt; 2. Blot LIMA; ps; rs) und der anschließenden Standardreihe 0,1 ng; 0,2 ng; 0,4 ng; 0,6 ng; 0,8 ng; 1,0 ng 36

Abb. 5:

p27^{Kip1} Gehalt der Primärstenosen ohne/mit Restenose 37

Abb. 6:

p27^{Kip1} Gehalt in ng/mg in frühen/späten Restenosen 38

Abb. 7:

p21^{Cip1} Gehalt der verschiedenen vaskulären Gewebe in % des TEA-Gewebes (Thrombendarteriektomie der Arteria carotis interna). Exemplarischer Western Blot mit den unterschiedlichen Geweben 39

Abb. 8:

p21^{Cip1} Gehalt in % der TEA in Primärstenosen ohne/mit Restenose 40

Abb. 9:

p21^{Cip1} Gehalt in % der TEA in frühen/späten Restenosen 41

Abb. 10:

Vergleich des p27^{Kip1} Gehalts in ng/mg in den Primärgeweben statinbehandelter Patienten mit solchen unbehandelter Patienten. Vergleich mit Restenosegewebe statinbehandelter Patienten 42

Abb. 11:

Vergleich des p21^{Cip1} Gehalts in % des TEA-Gewebes in den Primärgeweben
 statinbehandelter Patienten mit solchen unbehandelter Patienten. Vergleich mit
 Restenosegewebe statinbehandelter Patienten 43

Abb. 12:

Gehalt der Proliferationsmarker PCNA und Cdk2 in % der TEA in den
 verschiedenen vaskulären Geweben 44

Abb. 13:

PCNA/Cdk2 Gehalt in % der TEA in Primärstenosen ohne/mit
 Restenoseentwicklung..... 44

Abb. 14:

PCNA/Cdk2 Gehalt in % der TEA in frühen/späten Restenosen 44

Abb. 15:

Vergleich der Proliferationsmarker PCNA/CDk2 in % von TEA in den
 Primärgeweben statinbehandelter Patienten mit solchen unbehandelter Patienten.
 Vergleich mit Restenosegewebe statinbehandelter Patienten..... 45

Abb. 16:

Kollagen III Gehalt in % von TEA der verschiedenen vaskulären Gewebe..... 46

Abb. 17:

Kollagen III Gehalt in % von TEA in Primärstenosen ohne/mit
 Restenoseentwicklung..... 46

Abb. 18:

Kollagen III Gehalt in % von TEA in frühen/späten Restenosen..... 46

9. Publikationen

9.1 Originalarbeiten

1. Ruediger C.Braun-Dullaues, Michael J.Mann, Almut Ziegler, Heiko E. von der Leyen, Victor J.Dzau:

„A novel role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell hypertrophy.“

J. Clin. Invest. 104:815-823 (1999)

2. R.C.Braun-Dullaues, A.Ziegler, Rainer M. Bohle, Erwin Bauer, Stefan Hein, Harald Tillmanns, Werner Haberbosch:

„Quantification of the cell cycle inhibitors p27^{Kip1} and p21^{Cip1} in human atherectomy specimens: Primary stenosis versus Restenosis.“

J. of Laboratory and Clinical Medicine 2003; 141:179-189

9.2 Abstracts

1. Braun-Dullaues RC, Ziegler A, Bohle RM, Bauer E, Hein S, Tillmanns H, Haberbosch W:

„Quantifizierung des Zellzyklusinhibitors p27^{Kip1} in humanem Atherektomiegewebe: Primäre Stenose vs. Re-Stenose.“

Z. f. Kardiologie 2000; 89 (Suppl.5):5.

2. A.Ziegler, M.Grebe, F.R.Matthias, R.M.Bohle, H.Tillmanns, W.Haberbosch, R.C.Braun- Dullaues:

„Quantifizierung des Zellzyklusinhibitors p27^{Kip1} in humanem Atherektomiegewebe: Primäre Stenose vs. Re-Stenose.“

Posterpräsentation 29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Angiologie-
Gesellschaft für Gefäßmedizin e.V. 10.-13. September 2000 in Frankfurt/Main

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Almut Barbara Ziegler

Geburtstag: 31.10.75

Geburtsort: Neunkirchen/Saar

Status: Ledig

Nationalität: Deutsch

Schulausbildung:

1982-86: Grundschule Medelsheim

1986-95: Von-der-Leyen Gymnasium Blieskastel

Juni 95: Abitur

Universitätsausbildung:

Oktober 1995: Beginn des Studiums der Medizin an der Justus-Liebig-Universität, Gießen

August 1997: Physikum (Ärztliche Vorprüfung)

August 1998: Erstes Staatsexamen

Oktober 1998- August 2000: Experimenteller Teil der Dissertation im Molekularkardiologischen Labor der Abteilung Innere Medizin der Universität Gießen Innere.

März 2001: Zweites Staatsexamen

Mai 2001-Mai 2002: Praktisches Jahrs

1.Tertial: Innere Medizin Poliklinik der Universität Gießen
Innere Medizin Gastroenterologie Royal Prince Alfred Hospital der Universität Sydney, Australien

2.Tertial: Chirurgie an der Semmelweiss Universität Budapest, Ungarn

3. Tertial: Frauenklinik der Universität Gießen

Mai 2002:

Drittes Staatsexamen

Juni 2002-September 2002: Klinisches Praktikum im Hervey Bay Krankenhaus

Queensland/Australien

Seit November 2002:

Tätigkeit als Ärztin im Praktikum in der Medizinischen
Poliklinik der Universitätsklinik Gießen

11. Danksagung

Ich möchte insbesondere meinen Eltern für die Unterstützung auf diesem oft steinigen Weg danken. Weiterhin danke ich meiner Großmutter für wertvolle Ratschläge in jeder Lebenslage. Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Rüdiger Braun-Dullaes, der mich sehr freundschaftlich und voller Begeisterung durch diesen großen Teil meines Studiums begleitet hat. Herzlichen Dank auch an die Kollegen der Abteilung der kardiovaskulären Chirurgie und der Herzkatheterabteilung für die Gewebeprobe.

Danken möchte ich auch Giovanni Ettore, der mir in allen Belangen mit Rat und Tat zur Seite stand.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.“