

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Interdisziplinäre Intensivstation
Leitender Oberarzt: Professor Dr. R. Riessen**

**Effekte von Rapamycin auf die Expression von
Arteriosklerose- und Restenose- assoziierten Genen in
humanen vaskulären glatten Muskelzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Claudius Fischer

aus

Sindelfingen

2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Riessen

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Oßwald

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	Pathogenese der Arteriosklerose	4
1.2	PTCA, Stentimplantation	4
1.3	Pathogenese der Restenose	5
1.4	Beschichtete Stents.....	6
1.5	Rapamycin	9
1.5.1	Entdeckung, Historisches	9
1.5.2	Chemische Struktur	9
1.5.3	Wirkprofil und In Vitro und In Vivo Effekte auf die Zellproliferation .	10
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	12
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Gewinnung der glatten Muskelzellen.....	14
2.2	Zellzählung und MTT-Test.....	15
2.2.1	Zellzählung	15
2.2.2	MTT-Test.....	16
2.3	Expressionsanalyse.....	16
2.3.1	Versuchsbedingungen.....	16
2.3.2	RNA-Isolierung	17
2.3.3	Gene-Array.....	17
2.4	Nachweis der Hitzeschockproteine auf Proteinebene	18
2.4.1	Versuche	18
2.4.2	Proteinisolierung aus glatten Muskelzellen.....	20
2.4.3	Western Blots	21
2.4.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Blot.....	21
2.4.3.2	Entwicklung	22
2.4.3.3	Densitometrische Auswertung von Western Blots.....	24
2.5	Nachweis von HSP-70 auf RNA-Ebene.....	24
2.5.1	Versuche	24
2.5.2	RNA-Isolierung	24
2.5.3	Reverse-Transkriptase-PCR	25

2.5.3.1	Reverse Transkription:	25
2.5.3.2	PCR (Amplifikation):	26
2.5.3.3	Gelelektrophorese und Bildgewinnung	28
2.6	Puffer und Lösungen	29
3	Ergebnisse	31
3.1	Gene-Arrays	31
3.1.1	Kurzzeitige Wachstumsstimulation zuvor wachstumsarretierter Zellen.....	31
3.1.2	Kontinuierliche Inkubation Serum-stimulierter Zellen.....	31
3.2	Western Blot Analysen	34
3.2.1	Erste Versuche	34
3.2.2	Abschließende Versuche.....	35
3.2.2.1	6 h Inkubation	36
3.2.2.2	12 h Inkubation.....	36
3.2.2.3	24 h Inkubation	37
3.2.2.4	48 h Inkubation.....	38
3.2.2.5	Ergebnisse der densitometrischen Auswertung.....	40
3.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Western Blots	45
3.3	Ergebnisse der PCR für HSP-70	45
4	Diskussion	48
4.1	Ergebnisse der Gene-Arrays	48
4.2	Hitzeschockproteine	48
4.3	Expression anderer Gene.....	54
5	Zusammenfassung.....	56
6	Quellenverzeichnis	58
7	Abkürzungsverzeichnis.....	70
8	Anhang.....	72

1 Einleitung

1.1 Pathogenese der Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist ein Prozeß, der wahrscheinlich schon früh im Leben eines Menschen beginnt, und von vielen verschiedenen Faktoren initiiert und beeinflusst wird.

Einige biologische Prozesse gelten als die Hauptfaktoren, deren Zusammenspiel als Erklärungsmodell für die Pathogenese der Arteriosklerose anerkannt ist:

(1) Endothelzellschädigung und endotheliale Dysfunktion¹, (2) Dysregulation der Biosynthese von Cholesterin und Triglyzeriden², (3) Stimulation der Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen, (4) Aktivierung der Thrombose und (5) Aktivierung von Entzündungszellen (Monozyten und Makrophagen)³.

Insgesamt handelt es sich wohl um einen chronisch-inflammatorischen Prozeß, der die Grundlage für die Gefäßwandschädigung und Plaqueentstehung schafft.^{4:5} Entzündungsmarker wie hsCRP zeigen eine positive Korrelation mit dem Risiko für eine Koronare Herzkrankheit oder Arteriosklerose der Karotiden.⁶⁻⁸

Als Kofaktoren für die Entstehung von Arteriosklerose, die sich aus der Genetik und aus dem Lebensstil der Menschen ergeben, gelten Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Rauchen und Hyperhomocysteinämie^{9:10}.

Auch infektiöse Erreger (z.B. Chlamydia pneumoniae) werden als Kofaktor diskutiert.¹¹

1.2 PTCA, Stentimplantation

Die erste Koronarangioplastie zur Behandlung von arteriosklerotischen Koronarstenosen wurde 1977 von Andreas Grüntzig¹² durchgeführt. Er schätzte damals, dass ungefähr 10 bis 15 Prozent der Kandidaten für eine Bypass-Operation für diese alternative Prozedur in Frage kommen.

Mittlerweile werden in Deutschland jährlich weit mehr als 100000 PTCA durchgeföhrt, was die Zahl der Bypass-Operationen deutlich übersteigt.

Sigwart und Mitarbeiter führten 1987 die erste Stentimplantation durch.¹³

Dadurch konnte die Restenoserate nach Koronarangioplastie im Vergleich zur Ballondilatation gesenkt werden. Je nach Studie beträgt die Restenoserate beim Einsatz von unbeschichteten Stents 8% bis 40% und damit teilweise sehr hoch.^{14;15} Durch die Einführung von Stents, die mit antiproliferativen Substanzen beschichtet sind, konnte die Restenoserate unter 10% gesenkt werden.¹⁶

1.3 Pathogenese der Restenose

Die Entstehung der Restenose beruht vor allem auf einer Hyperplasie von glatten Muskelzellen in der Intima der Gefäße und, in weit geringerem Ausmaß, auf wandständiger Thrombenbildung.¹⁷⁻²²

Die Verletzung der Gefäßwand durch den aufgeblasenen intrakoronaren Ballon und durch den Stent initiiert diese Vorgänge auf zellulärer und molekularer Ebene. Makrophagen und neutrophile Granulozyten werden dazu angeregt, an den Ort der Verletzung zu kommen, wo sie dann Chemokine ausschütten.^{20;21;23-26} Diese Chemokine stimulieren die Expression von Matrix-Metalloproteinasen, was zu einem Umbau (remodeling) der extrazellulären Matrix führt und die Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Neointima unterstützt. Die glatten Muskelzellen werden zudem dazu angeregt, Gene, die für die Zellteilung mit verantwortlich sind, vermehrt zu exprimieren.²⁷⁻²⁹

Die Interaktion der oben genannten Prozesse führt zur neointimalen Hyperplasie und In-Stent-Restenose. Die histologische Untersuchung von Atherektomieproben zeigt bei der In-Stent-Restenose eine im Vergleich zur Restenose nach herkömmlicher PTCA vermehrte zelluläre und proliferative Reaktion.³⁰ Die Restenose nach Ballondilatation wird dagegen zu einem größeren Anteil durch eine Schrumpfung des Gefäßdiameters, das sog. Remodeling, ausgelöst.

1.4 Beschichtete Stents

Mit dem Einsatz von beschichteten Stents werden die Ziele verfolgt, die Thromboserate und die Rate der In-Stent-Restenose (ISR) zu senken. Hierbei kamen bisher zum Einsatz die Elemente Kohlenstoff und Gold, biokompatible Materialien wie Siliziumkarbid und Phosphorylcholin, Heparin als Antikoagulanz und antiproliferativ wirkende Substanzen wie Paclitaxel und Rapamycin.

Im Fall von Kohlenstoff (Carbostent) nahm man an, dass es eine weniger thrombogene Oberfläche herstellt und antiinflammatorisch wirkt. Die antiinflammatorische Wirkung konnte jedoch weitgehend widerlegt werden.³¹⁻³³

Erste Studien mit dem Carbostent deuteten eine geringere Rate von ISR an, die sich in kontrollierten, randomisierten Studien jedoch nicht bestätigte.³⁴

Gold wird aufgrund seiner antiinflammatorischen Wirkung in der Therapie der rheumatoiden und psoriatischen Arthritis eingesetzt. Im Vergleich zu unbeschichteten Metallstents zeigte sich aber eine stärkere neointimale Proliferation und eine höhere ISR-Rate.^{35;36}

Der Einsatz von Stents die mit den Biopolymeren Siliziumkarbid oder Phosphorylcholin beschichtet sind zeigte keine signifikante Senkung der Häufigkeit der ISR.^{37;38} Insbesondere Phosphorylcholin eignet sich jedoch als Vehikel für die lokale Freisetzung einer Substanz.^{39;40}

Die derzeit vielversprechendsten Ergebnisse lieferten bisher Stents, die mit antiproliferativen Substanzen beschichtet sind. Für den klinischen Gebrauch zugelassen sind heute der mit Paclitaxel beschichtete TAXUS[®]-Stent von Boston Scientific und der mit Rapamycin (Sirolimus) beschichtete Cypher[™]-Stent von Cordis (Johnson&Johnson).

Die TAXUS-Studien sind klinische Studien, in denen der Einfluß von Paclitaxel-beschichteten Stents auf die ISR untersucht wurde.

Die TAXUS-I-Studie war eine randomisierte, doppelblinde Multicenterstudie an der 61 Patienten teilnahmen, wobei 31 einen TAXUS[®]-Stent und 30 einen Kontrollstent erhielten. Es traten keine Stent-Thrombosen nach 1, 6, 9 und 12 Monaten auf. Nach sechs Monaten betrug die angiographisch beurteilte Restenoserate 0% für die TAXUS-Gruppe und 10% für die Kontrollgruppe. Es

zeigten sich signifikante Unterschiede zum Beispiel in der Stenose der mittleren Durchmesser nach sechs Monaten: 13,6% in der TAXUS-Gruppe gegenüber 27,2% in der Kontrollgruppe.⁴¹

Bei der TAXUS-II-Studie handelte es sich um eine randomisierte, doppelblinde Studie mit 536 Patienten. Es wurden zwei Patientenkohorten, eine mit slow-release (131 Patienten) und eine mit moderate-release (135 Patienten) Paclitaxel-eluting Stents, mit jeweils einer Kontrollgruppe (insgesamt 270 Patienten) verglichen. Die ISR-Rate betrug ungefähr 20% in den beiden Kontrollgruppen und ungefähr 8% in den beiden TAXUS-Gruppen. Das Ausmaß der Stenose wurde durch intravaskulären Ultraschall (IVUS) beurteilt.⁴²

Im Rahmen der TAXUS-III-Studie erhielten 28 Patienten mit ISR eine Nachbehandlung mit bis zu zwei TAXUS[®]-Stents (slow release). 25 davon unterliefen eine Kontroll-Angiographie, wobei vier der 25 (ca. 16%) eine erneute Restenose aufwiesen.⁴³

TAXUS-IV war eine prospektive, randomisierte Multicenter-Studie mit 1314 Patienten mit einzelnen de-novo-Koronarläsionen, von denen 662 einen TAXUS[®]-Stent und 652 einen Kontrollstent erhielten. In einer Kontrollangiographie nach neun Monaten bei 559 Patienten war die Restenoserate bei der TAXUS-Gruppe 7,9% im Vergleich zu 26,6% bei der Kontrollgruppe.⁴⁴

TAXUS-V war ebenfalls eine prospektive, randomisierte Multicenter-Studie mit 396 Patienten, die eine ISR in einem zuvor eingesetzten unbeschichteten Metallstent aufwiesen. Die Patienten wurden randomisiert zwei Gruppen zugewiesen. Eine Gruppe erhielt eine Angioplastie mit anschließender vaskulärer Brachytherapie (VBT) mit einem Beta-Strahler (201 Patienten), die andere Gruppe erhielt einen TAXUS[®]-Stent (195 Patienten). Kontrollangiographien nach neun Monaten ergaben eine Restenoserate von 14,5% in der TAXUS-Gruppe gegenüber 31,2% in der VBT-Gruppe, außerdem traten im Kontrollzeitraum weniger kardiale Zwischenfälle in der TAXUS-Gruppe (11,5%) als in der VBT-Gruppe (20,1%) auf.⁴⁵

Die FIM-Studie (First In Man) war die erste klinische Studie mit Rapamycin-beschichteten Stents. 30 Patienten bekamen einen mit Rapamycin beschichteten Stent implantiert, davon unterzogen sich 28 einer Kontroll-Angiographie nach zwei Jahren. Kein Patient hatte eine Restenose entwickelt.

Bei der RAVEL-Studie handelte es sich um eine randomisierte, doppelblinde Studie an 19 Zentren, die 238 Patienten umfasste. 120 bekamen einen Rapamycin-beschichteten Stent, 118 einen unbeschichteten Kontroll-Stent. Nach sechs Monaten hatten 26,6% der Kontrolle-Gruppe und 0% der Rapamycin-Gruppe eine Restenose $\geq 50\%$ des Lumen-Durchmessers. Es waren keine Stent-Thrombosen aufgetreten.⁴⁶

Die darauffolgende SIRIUS-Studie sollte prüfen, ob sich die Ergebnisse aus den bisherigen kleineren Studien auch für einen Zeitraum von zwölf Monaten bestätigen lassen. Außerdem sollte die klinische Effizienz von Rapamycin-beschichteten Stents für Patienten mit einem hohen Risiko für Restenose getestet werden, wobei das erhöhte Risiko durch Gefäßgröße, Länge der Läsion und Komorbidität mit Diabetes mellitus definiert wurde.

1058 Patienten die sich einer Koronarangioplastie unterzogen, bekamen randomisiert einen Rapamycin-Stent (533) oder einen Kontroll-Stent (525).

Nach neun Monaten betrug die ISR-Rate 4,1% in der Rapamycin-Gruppe gegenüber 16,6% in der Kontroll-Gruppe. Nach zwölf Monaten waren es 4,9% gegenüber 20%. Bei den Hochrisikopatienten fand sich nach zwölf Monaten eine relative Reduktion der Restenoserate von 70 bis 80% bei den Rapamycin-Stents im Vergleich zu den Kontroll-Stents.⁴⁷

Neueste Studien wie die SCANDSTENT-Studie bestätigen diese Ergebnisse.

In der SCANDSTENT-Studie wurden 322 Patienten mit stabiler oder instabiler Angina pectoris oder einem NSTEMI und komplexen Koronarläsionen randomisiert mit Rapamycin-beschichteten Stents (Cypher™; 163) und Kontrollstents (159) versehen. Nach sechs Monaten betrug die angiographische Restenoserate bei den Patienten mit Cypher™-Stents 2,0%, bei denen mit Kontrollstents 31,9%. Kardiale Zwischenfälle traten in 4,3% in der Cypher-Gruppe auf gegenüber 29,3% in der Kontrollgruppe.⁴⁸

In aktuellen Studien wurden der Cypher™-Stent und der TAXUS®-Stent miteinander verglichen.

Die SIRTAX-Studie war eine randomisierte Single-Center-Studie bei der 503 Patienten einen Rapamycin-beschichteten Stent und 509 Patienten eine Paclitaxel-beschichteten Stent erhielten. Nach neun Monaten betrug die relative ISR-Rate 3,2% bei Patienten mit Cypher™-Stents und 7,6% bei Patienten mit TAXUS®-Stents. Die relative Häufigkeit von Restenosen innerhalb der Läsion betrug 6,6% in der Cypher-Gruppe und 11,7% in der Taxus-Gruppe. Stent-Thrombosen waren in 2,0% bei der Cypher-Gruppe und in 1,6% bei der Taxus-Gruppe aufgetreten.⁴⁹

Im Rahmen der REALITY-Studie wurden 1353 Patienten mit insgesamt 1911 Koronarläsionen prospektiv, randomisiert an mehreren Zentren untersucht. 684 Patienten (970 Läsionen) erhielten einen Cypher™-Stent und 669 Patienten (941 Läsionen) erhielten einen Taxus®-Stent. Nach acht Monaten betrugen die relativen Häufigkeiten von Restenose In-Stent 7,0% bei Cypher™-Stents und 8,3% bei Taxus®-Stents, innerhalb der Läsion gelegen waren es 9,6% bei Cypher™-Stents und 11,1% bei Taxus®-Stents. Stent-Thrombosen traten in 0,4% bei Patienten mit Cypher™-Stents und in 1,8% bei Patienten mit Taxus®-Stents auf.⁵⁰

1.5 Rapamycin

1.5.1 Entdeckung, Historisches

Rapamycin wurde in den Siebziger Jahren in einer Bodenprobe auf Rapa Nui (Osterinsel) im Rahmen einer Suche nach neuen Antimykotika durch die Canadian Medical Commission mit Unterstützung der CDC entdeckt.^{51;52} Im Jahr 1995 bekam es die USAN-Bezeichnung „Sirolimus“ und den Markennamen „Rapamune®“.⁵³

1.5.2 Chemische Struktur

Es handelt sich bei Rapamycin um ein Makrolid-Antibiotikum, das von dem Aktinomyzeten „Streptomyces hygroscopicus“ produziert wird. Die Summenformel lautet $C_{51}H_{79}NO_{13}$.⁵²

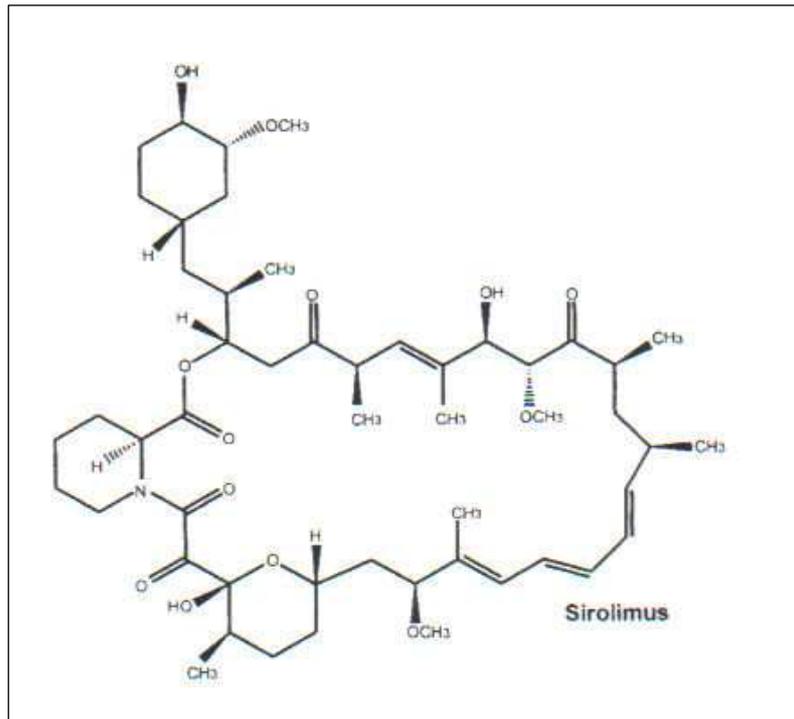


Abb. 1: Strukturformel von Sirolimus (Rapamycin). Quelle: Napoli KL, Taylor PJ. From beach to bedside: history of the development of sirolimus. *Ther Drug Monit.* 2001;23:559-586.

1.5.3 Wirkprofil und In Vitro und In Vivo Effekte auf die Zellproliferation

Rapamycin besitzt eine schwache antibiotische und eine antimykotische Wirkung, die durch die immunsuppressive Wirkung (s.u.) allerdings limitiert ist.

Seine antiproliferative Wirkung erzielt Rapamycin durch eine Hemmung von Signaltransduktionswegen im Zellzyklus, was zu einer Blockierung der Zellzyklusprogression beim Übergang von der G1- in die S-Phase führt.

Wachstumsstimulierte T- und B-Zellen ließen sich über Ca^{2+} -abhängige und Ca^{2+} -unabhängige Transduktionswege hemmen.⁵⁴

Auch die zytokininduzierte Proliferation von Mastzellen⁵⁵, die spontane und die FGF-beta-stimulierte Proliferation von Endothelzellen und Fibroblasten⁵⁶ und die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC)⁵⁷⁻⁵⁹ wird durch Rapamycin gehemmt.

Rapamycin bindet an den intrazellulären Rezeptor FKBP12 (FK506 binding protein). Der Rapamycin/FKBP12-Komplex stellt einen spezifischen Inhibitor des „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) dar. Bei mTOR handelt es sich

um eine evolutionär konservierte Phosphatidylinositolkinase, die an der Regulation der Protein-Translation, Zellzyklusprogression und Zellproliferation beteiligt ist. Eine Verletzung der arteriellen Gefäßwand führt zu einer durch Wachstumsfaktoren vermittelten Aktivierung der Zellen. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der Kinase mTOR über verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege. Durch mTOR werden weitere Faktoren phosphoryliert, deren wichtigste Vertreter die p70 S6 Kinase und das 4EBP-1 (4E binding protein-1) sind, und die beide zu einer Steigerung der Protein-Translation führen. Die Hemmung von mTOR durch Rapamycin führt also zu einer Hemmung der Translation.⁶⁰

Die Aktivierung der Zellen durch Wachstumsfaktoren führt auch zu einer Herunterregulation von cdk_i (cyclin dependent kinase inhibitor) p27, also indirekt zu einer Heraufregulation von cdk-Proteinen (cyclin dependent kinase), vor allem von cdk2 und cdk4. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Expression von Cyclinen, vor allem Cyclin D und E. Durch diese Enzyme kommt es zu einer Inaktivierung (Phosphorylierung) des Retinoblastom-Proteins (RB), was den Zellen den Übergang von der G1- in die S-Phase ermöglicht. Rapamycin verhindert die Herunterregulation von cdk_i p27 in wachstumsstimulierten Lymphocyten. In VSMCs verhindert es die Phosphorylierung des Retinoblastom-Genprodukts, und es gibt auch Hinweise, dass die Herunterregulation von p27 verhindert wird, was zu einer Aktivitätsverminderung von cdk2 und cdk4 führt. Somit bleibt die Inaktivierung von RB aus und es kommt zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase.⁶⁰⁻⁶³

Des Weiteren hat Rapamycin einen inhibierenden Effekt auf die Migration von vaskulären glatten Muskelzellen und auf das Wachstum der Zellen. Die Hemmung der Migration wird eventuell auch über p27 vermittelt, da sich gezeigt hat, dass p27-defiziente Zellen gegen die Wirkung von Rapamycin mehr oder weniger resistent sind.⁶⁴⁻⁶⁶

Das Wachstum der Zellen wird auch über die mTOR-Signalkaskade vermittelt, indem die Synthese von vor allem ribosomalen Proteinen für den Proteinsyntheseapparat und von transmembranären Zelloberflächenproteinen für den Transport von z.B. Glukose und Aminosäuren in die Zelle hinein über

diesen Weg gefördert wird.^{67;68} Eine Inhibition von mTOR durch Rapamycin führt so zu vermindertem Zellwachstum.

Auch die Synthese von Zellmatrix und Extrazellulärmatrix, die wie oben erwähnt an der Entstehung von Restenose mitbeteiligt sind, werden durch Rapamycin gehemmt.⁶⁹

Eine Zusammenfassung dieser Beeinflussung zellulärer Vorgänge durch Rapamycin findet sich auf der folgenden Seite in Abbildung 2.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

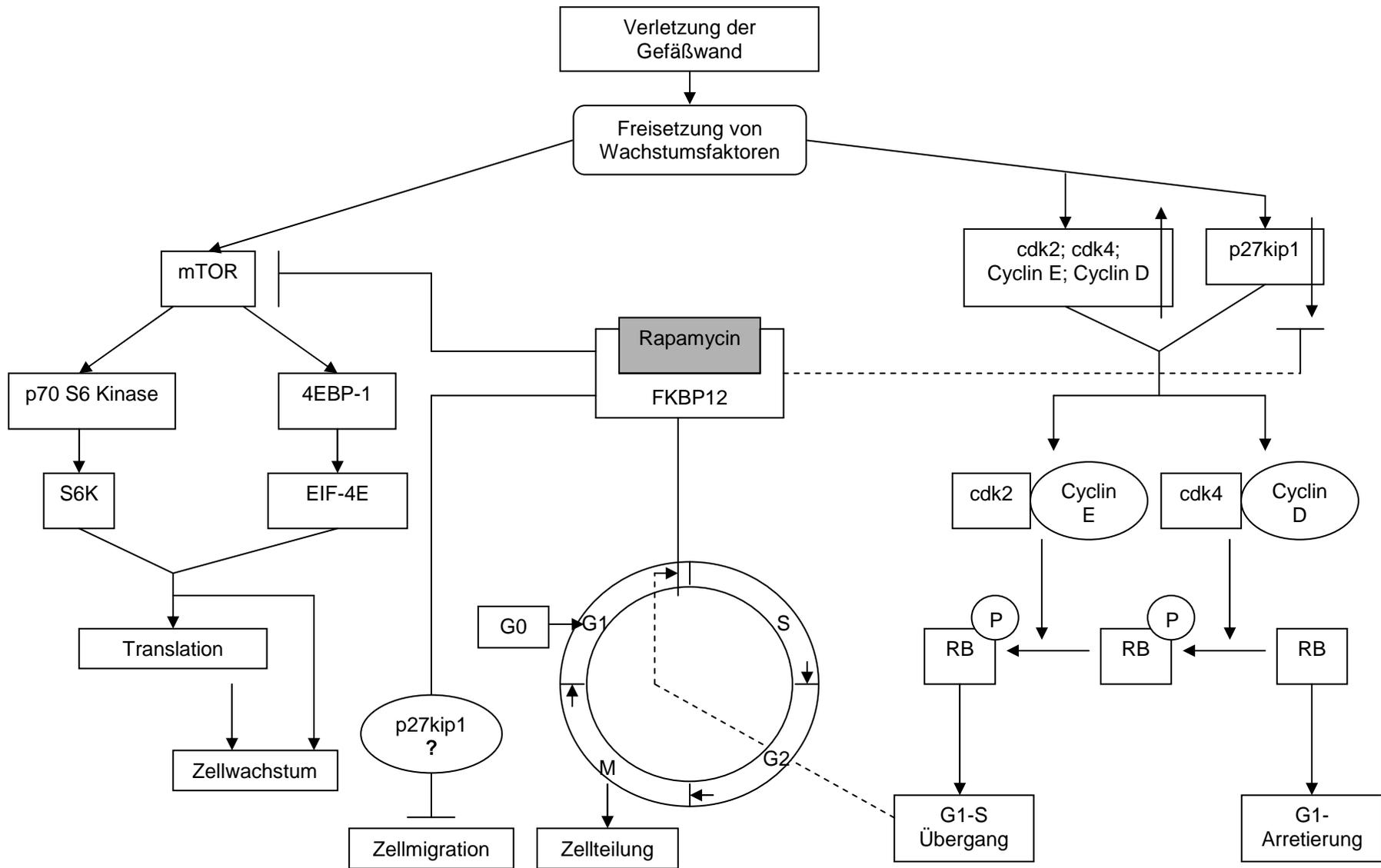
Wir führten einen Gene-Array durch, um Gene die durch Rapamycin in humanen vaskulären glatten Muskelzellen signifikant beeinflusst werden, zu identifizieren.

Im Anschluß wurde die Expression ausgewählter Gene bzw. Proteine genauer untersucht, die im Gene-Array durch Rapamycin reguliert wurden und die mit der Pathogenese der Arteriosklerose und Restenose in Verbindung gebracht werden können. Die Studie konzentrierte sich dabei auf Gene aus der Gruppe der Hitzeschockproteine.

Abb. 2: Siehe folgende Seite. Der Rapamycin/FKBP12-Komplex hemmt die Kinase mTOR und verhindert dadurch die Phosphorylierung (Aktivierung) von Faktoren die zu einer Steigerung von Translation und Zellwachstum führen. Die Hemmung der Herunterregulation von p27kip1 (cdki) führt zu einer Aktivitätsminderung der Cycline, wodurch die Phosphorylierung (Inaktivierung) von RB ausbleibt. Dadurch kommt es zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase.

Die Zellmigration, die eventuell auch über p27kip1 vermittelt wird, wird durch Rapamycin ebenfalls gehemmt.

Abkürzungen: mTOR = mammalian target or rapamycin, 4EBP-1 = 4E binding protein-1, EIF-4E = eukaryotic initiation factor 4E, FKBP12 = FK506 binding protein, cdk = cyclin dependent kinase, RB = Retinoblastom-Protein, P = Phosphat. Bei p27kip1 handelt es sich um einen Zellzyklus-Inhibitor.



2 Material und Methoden

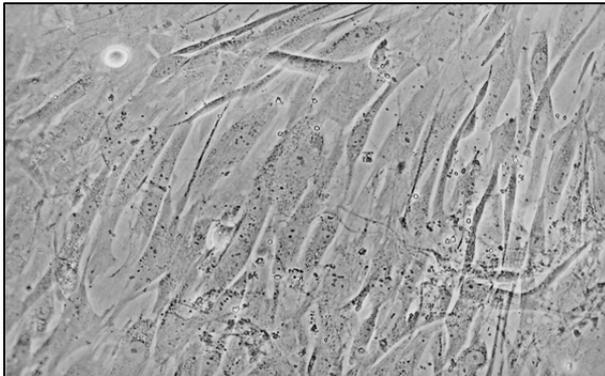
2.1 Gewinnung der glatten Muskelzellen

Humane glatte Muskelzellen wurden aus Aa. iliaca von Spendern bei Lebertransplantationen isoliert und kultiviert. Die Verwendung dieser Gefäßstücke war von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt worden. Die Präparation der Gefäßstücke erfolgte unter der Sterilbank. Dazu wurden die Gefäßstücke in einer Präparierschale an den Enden mit Stecknadeln fixiert, und überschüssiges Fett und Bindegewebe entfernt. Sie wurden der Länge nach aufgeschnitten und dann aufgeklappt, so daß die Intima nach oben zeigte, und dann das aufgeklappte Stück an den Ecken wieder mit Stecknadeln fixiert. Damit die Gefäßstücke nicht austrockneten, wurde Vollmedium (siehe unten) in die Präparierschale gegeben.

Um die glatten Muskelzellen aus der Tunica media zu gewinnen, mußte zunächst die Endothelschicht entfernt werden. Dies geschah mit Wattestäbchen, die über das Gefäßstück gerollt wurden. Dann wurde die Media schachbrettartig eingeritzt, um kleinere Mediastückchen mit der Pinzette von der Adventitia und dem restlichen Bindegewebe abzureißen. Diese Stückchen wurden dann in Zellkulturschalen (Falcon) ausgesät, und nach einer dreistündigen Antrockenphase mit Vollmedium versorgt. Die Schalen wurden in einem Brutschrank (Kendro) bei 37°C und 5% CO₂-Anteil im Luftgemisch aufbewahrt, und alle zwei bis drei Tage mit Vollmedium versorgt. Nach ca. acht bis zehn Tagen fingen die glatten Muskelzellen an, aus den Mediastückchen auszuwachsen und konnten nach ca. drei Wochen in Zellkulturflaschen (Corning Incorporated) weiter subkultiviert werden.

Zur Passagierung wurde das Vollmedium abgesaugt, und die Zellen dann mit PBS (GIBCO®) gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA (GIBCO®) wurden die Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis sie sich vom Flaschenboden abgelöst hatten. Daraufhin konnte die Zellsuspension in Vollmedium aufgenommen werden, und die Zellen auf mehrere Flaschen oder Kulturschalen verteilt werden.

Die glatten Muskelzellen zeigten das charakteristische „Berg- und Tal“-Wachstumsmuster und in dichtbesiedelten Flaschen ein typisches „Sternmu-



ster“. Des weiteren war die Immunfärbung mit monoklonalem Antikörper gegen glattmuskuläres α -Aktin (Progen) (Zweitantikörper: goat anti-mouse, FITC-markiert, Dako) positiv.

Abb. 3: Mikroskopische Aufnahme humaner vaskulärer glatter Muskelzellen in Kultur

2.2 Zellzählung und MTT-Test

Um eine Zytotoxizität von Rapamycin zu detektieren, wurden eine Zellzählung und ein MTT-Test zu den unter 2.4.1 genannten Versuchsbedingungen durchgeführt.

2.2.1 Zellzählung

Hierfür wurde das Zellzählsystem CASY[®] von Schärfe Systems verwendet. Die Zellen wurden in 6-Loch-Schalen (Greiner BioOne) ausgesät, und nach einer 24-stündigen Anheftungsphase erfolgte der Versuch. Nach 6 h Vorinkubation wurde der Ausgangswert bestimmt. Die weiteren Zellzahlbestimmungen erfolgten nach 6, 12, 24 und 48 h zu den in 2.4 beschriebenen Versuchsbedingungen.

Für die Zählung wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst, und dann in Medium aufgenommen. 100 μ l der Zellsuspension wurden mit 9,9 ml Casyton[®] verdünnt. Anschließend erfolgte die automatische Messung im CASY[®]-Zellzähler. Dabei erfolgten für jede Bedingung 3 Messungen, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Als Grenzwerte für die Zellvitalität wurden eine Zellgröße zwischen 6,6 und 100 μ m vorgegeben.

2.2.2 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein quantitatives kolorimetrisches Verfahren, mit dem eine Aussage über Zytotoxizität und Zellproliferation getroffen werden kann. Das Tetrazoliumsalz MTT wird von Enzymen, die nur in lebenden Zellen aktiv sind, zu einem blauen Formazan reduziert, was eine photometrische Analyse ermöglicht.^{70;71}

Wir säten die Zellen in einer 96-well Mikrotiterplatte (Corning Incorporated) aus. Nach einer Anheftungsphase (24 h bei 37°C) erfolgte der Versuch nach der in 2.4 beschriebenen Versuchsanordnung, wobei für jede Bedingung 6 wells behandelt wurden. Als Leerwert wurden wells ohne Zellen nur mit Medium gefüllt. Sechs Stunden vor Abbruch wurden 25 µl MTT-Reagenz (Sigma) in jedes well gegeben. Bei Versuchsende wurden 100 µl SDS 10% (Roth) pro well zugegeben. Dieser Schritt dient der Lyse der Zellen. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur für 24 h in Dunkelheit inkubiert, und dann der Gehalt an Formazan in einem ELISA-Reader (BioRad) bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt, und der Mittelwert aus den jeweils 6 Werten gebildet.

2.3 Expressionsanalyse

Die Gen-Expressionsanalyse wurde zusammen mit der „IZKF Microarray Facility Tübingen“ durchgeführt, dabei wurden Genchips der Firma Affymetrix verwendet.

Es wurden zwei Versuche gemacht, und dabei humane vaskuläre glatte Muskelzellen der 3. und 4. Passage verwendet.

2.3.1 Versuchsbedingungen

Versuch 1)

Im Vorfeld wurden die Zellen mit Vollmedium alle zwei Tage versorgt, und bis zu 80% Konfluenz kultiviert.

Im Versuch wurden die Zellen mit serumfreiem Medium (Vollmedium ohne FCS) für 24 Stunden im Wachstum arretiert und dann für sechs Stunden mit serumfreiem Medium präinkubiert, welches Rapamycin (Sigma) 100 nM

enthielt. Anschließend erfolgte eine maximale Wachstumsstimulation mit Endothelzellmedium (EBM-2, Cambrex Bioscience) und Rapamycin 100 nM für weitere sechs Stunden. Die Kontrollzellen erfuhren eine Stimulation mit Endothelzellmedium ohne Rapamycin.

Versuch 2)

Die Zellen wurden mit Vollmedium alle zwei Tage versorgt und bis zu 80% Konfluenz kultiviert.

Im Versuch wurden die weiterhin proliferierenden Zellen mit Vollmedium und Rapamycin 100 nM für 48 Stunden inkubiert, wobei Kontrollen ohne Rapamycin mitgeführt wurden.

2.3.2 RNA-Isolierung

Bei Versuchsende wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA von den Zellkulturflaschen abgelöst, und dann jeweils in 10 ml Vollmedium aufgenommen, und bei 300g für 5 min zentrifugiert (Zentrifuge: Kendro). Nach dem Abkippen des Überstandes wurden die Zellpellets mit Lysepuffer (350 µl RLT-Lysepuffer, Qiagen + 3,5 µl Mercaptoethanol, Applichem) resuspendiert.

Das so gewonnene Zell-Lysat wurde durch einen QiaShredder® (Qiagen) zentrifugiert und homogenisiert, und die RNA anschließend mit dem RNeasy MiniKit® (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.3.3 Gene-Array

Microarrays werden benutzt, um die relativen Expressionsniveaus mehrerer Tausend bekannter Gene im Vergleich zu messen. Die Affymetrix Genchips sind vorgefertigte Oligonukleotid-Microarrays, es kann also nur die Expression von Genen, die auf dem Chip in Form von Oligonukleotiden repräsentiert sind, gemessen werden. Es handelt sich um ein sehr sensitives Verfahren, welches den Nachweis von mRNAs noch in einer Konzentration von 1 pro 10^5 Transkripten erlaubt.⁷²

Die Proben enthalten die gesamte RNA der Zellen. In einer in-vitro-Transkriptionsreaktion wird mit Hilfe einer T7 RNA Polymerase und Biotin-CTP die mRNA amplifiziert und markiert. Die markierte RNA wird an die

Oligonukleotide auf den Genchips hybridisiert. Nachdem die Genchips gewaschen und angefärbt wurden, erfolgte die Analyse mit einem Laser-Scanner.

Es wurden drei Genchips pro Ansatz eingesetzt mit insgesamt neun vergleichenden Bestimmungen pro Versuchsgruppe.

Als signifikant wurde ein Effekt nur gewertet, wenn er in allen neun Bestimmungen nachweisbar war und die Signal Log Ratio (SLR) $> 0,4$ bzw. $< -0,4$ betrug.

Die SLR ist ein Näherungswert für das Ausmaß und die Richtung der Änderung der Expression eines Transkriptes, der sich aus dem Vergleich jedes Wertes eines experimentellen Arrays gegenüber einem Vergleichsarray (baseline array) ergibt. Der Wert wird als logarithmisches Verhältnis mit der Basis 2 angegeben. Daraus ergibt sich, dass eine SLR von 1,0 einer zweifachen Steigerung der Expression entspricht, und eine SLR von -1,0 einer zweifachen Verminderung.

2.4 Nachweis der Hitzeschockproteine auf Proteinebene

2.4.1 Versuche

Humane glatte Muskelzellen wurden in Zellkulturschalen (Falcon) bis zu 80% Konfluenz kultiviert und dabei mit Vollmedium alle zwei Tage versorgt.

Im Versuch wurden die Zellen zunächst mit serumfreiem Medium für 24 h im Wachstum arretiert. Im Anschluß daran folgte eine Präinkubation mit serumfreiem Medium und Rapamycin 100 nM für 6 h, wobei die Kontrollzellen nur serumfreies Medium erhielten. Nach der Präinkubation wurde das serumfreie Medium abgesaugt, und um die Zellen zur Synthese von Hitzeschockproteinen anzuregen, wurden sie dann verschiedenen Stressfaktoren (H_2O_2 , Wachstumsstimulation durch Endothelzellmedium, Hitzeschock) ausgesetzt. Dabei gab es immer eine Kontrollschale, die die Stressbehandlung nur in Anwesenheit von Vollmedium erfuhr, und eine Schale, die sie in Anwesenheit von Vollmedium und Rapamycin 100 nM erfuhr.

Rapamycin:

Rapamycin-Trockensubstanz (Sigma) wurde bei $-70^{\circ}C$ aufbewahrt.

Durch Auflösen von 1 mg in 547 µl DMSO (Roth) wurde eine 2 mM Stocklösung hergestellt, die ebenfalls bei -70°C aufbewahrt wurde.

Zur Herstellung der Gebrauchslösung vor einem Versuch wurde die Stocklösung zunächst im Verhältnis 1:100 mit serumfreiem Medium verdünnt. Bei Zugabe zu der jeweiligen Versuchslösung (Vollmedium, Vollmedium + H_2O_2 oder Endothelzellmedium) erfolgte eine weitere Verdünnung um den Faktor 1:200. So lag Rapamycin im Versuch letztendlich in einer Konzentration von 100 nMol/l vor. Bei der Herstellung der Lösungen und während dem Versuch wurden Gefäße, die Rapamycin enthielten, mit Aluminiumfolie ummantelt, da Rapamycin lichtempfindlich ist.

Stressfaktoren:

H_2O_2 :

Unter der Sterilbank wurde eine 0,2 M Stocklösung hergestellt. Dazu wurde H_2O_2 -Trockensubstanz (30% w/w; Molekulargewicht: 34,01, Merck) in sterilem Ampuwa[®] (Fresenius) gelöst. 22,67 g der Trockensubstanz in 1000 ml Ampuwa[®] ergibt eine 0,2 M Lösung. Für den Versuch wurde die entsprechende Menge der Stocklösung mit Vollmedium 1:1000 verdünnt, so dass eine 0,2 mM Gebrauchslösung entstand. Nach der Präinkubation wurden die Zellen mit der Gebrauchslösung versorgt und kamen dann in den Brutschrank bei 37°C .

Endothelzellmedium:

Durch die Zugabe von Endothelzellmedium, welches Wachstumsfaktoren wie FGF (fibroblast growth factor) und IGF (insulin-like growth factor) enthält, sollte der Wachstumsreiz den Stressfaktor für die Zellen darstellen. Nach der Präinkubation wurden die Zellen mit dem Endothelzellmedium versorgt, und kamen dann in den Brutschrank bei 37°C . Für die Versuche wurde das Medium EBM-2 von Cambrex Bioscience verwendet.

Hitzeschock:

Hierbei wurden die Zellen nach der Präinkubation wieder mit Vollmedium versorgt und bekamen dann eine Wärmebehandlung für 2 h bei 40°C oder 30 min bei 42°C.

Das Vollmedium wurde im Vorhinein in einem Wasserbad auf 40°C bzw. 42°C erwärmt, damit die gewünschte Temperatur von Beginn an bestand.

Nach der Wärmebehandlung wurden die Zellen einmal mit Vollmedium gewaschen und neu versorgt, und kamen dann ebenfalls bis zum Ablauf der Gesamtinkubationszeit in den Brutschrank bei 37°C.

Es wurden Versuche mit Inkubationszeiten von drei, sechs, neun, zwölf, 24 und 48 Stunden nach der sechsstündigen Präinkubation durchgeführt. Bis auf die Wärmebehandlung wurden alle Inkubationszeiten (auch die Präinkubation) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Anteil im Luftgemisch durchgeführt.

Für die Versuche wurden Zellen der dritten bis fünften Passage verwendet.

2.4.2 Proteinisolierung aus glatten Muskelzellen

Am Ende des Versuchs wurde das Medium von den Zellkulturschalen abgekippt und die Schalen dann zweimal mit PBS gewaschen. Wichtig war hierbei, alle Schalen möglichst zügig hintereinander abzukippen, um die gleiche Abbruchzeit zu haben.

Mit 300 µl TE-Puffer (Cambrex) wurden die Zellen vom Boden der Schale abgelöst und dann abgeschabt und in einem Eppendorfcup, das auf Eis bereit stand, gesammelt.

Dann wurden die Eppendorfcups bei 4°C für 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert, und der Überstand mit der Pipette abgehoben. Am Boden der Cups zeigte sich nun ein Zellpellet. Das Pellet wurde dann mit 200 µl Lysepuffer durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert, und diese zellhaltige Lösung für 2 h auf Eis gehalten und immer wieder geschüttelt.

Im Anschluß folgte noch ein Zentrifugationsschritt bei 4°C für 10 min bei 13000 U/min. Der Überstand enthielt die Proteine. Die Proben wurden portioniert und bei -70°C aufbewahrt.

2.4.3 Western Blots

Nach dem Auftauen wurden die Proben gevortext und zentrifugiert.

Die Proben wurden mit Probenpuffer (s.u.) reduziert: Nach Zugabe des Probenpuffers wurden die Proben anzentrifugiert und dann für zehn Minuten im Wasserbad gekocht. Danach wurden sie auf Eis gelegt, und schließlich nochmals anzentrifugiert. Um zu gewährleisten, dass in jede Tasche die gleiche Menge an Protein eingefüllt werden konnte, wurde eine Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford-Reagenz: BioRad) durchgeführt, wobei die Werte in einem ELISA-Reader (BioRad) mit dem Programm Microplate Manager[®] (BioRad) ermittelt wurden. Dabei wurde zur Kontrolle eine Verdünnungsreihe mit γ -Globulin (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 μ g/ml, Sigma) mitgeführt.

Je nach Konzentration wurden 30-70 μ g Protein eingesetzt. Die Mengen werden bei den dargestellten Ergebnissen angegeben.

2.4.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Blot

Als erstes wurde ein 10%-iges Acrylamid-Laufgel (s.u.) zwischen zwei aufrecht stehende Glasplatten gegossen, die zuvor mit Methanol entfettet worden waren. Nach einer Stunde zum Aushärten des Gels wurde darüber das Sammelgel (s.u.) gegossen.

In das Sammelgel wurde ein Kamm eingesetzt, der die Taschen für die Proben schaffte. Nachdem das Sammelgel ausgehärtet war, wurden die reduzierten Proben mit einer Hamilton-Spritze (Hamilton Syringes) in die Taschen eingefüllt, und dann in 1-fach Laufpuffer bei 80 V aufgetrennt.

Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das sogenannte „Blot-Sandwich“ gebaut. Dazu wurde das Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond C und Hybond ECL, Amersham) und zwischen Filterpapiere (Whatman-Paper), Filz und Plastikrahmen gelegt. In einer mit 1-fach Blotpuffer gefüllten Blotkammer wurden dann die Proteine bei 22 W für 1 h auf die Membran transferiert.

Es wurden Gelgießstände, Elektrophorese- und Blotkammern sowohl von Keutz als auch von BioRad verwendet.

Als Größenstandard wurde der Rainbow™ coloured molecular weight marker (Amersham) verwendet.

2.4.3.2 Entwicklung

Bei Entwicklung am nächsten Tag wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Blotten über Nacht in PBST (s.u.) und 5% w/v Magermilchpulver (milupa) bei 4°C geblockt. Bei kompletter Entwicklung (Erst- und Zweitantikörper) am gleichen Tag oder Inkubation mit Erstantikörper über Nacht (bei 4°C) wurden die Membranen zuvor mindestens eine Stunde bei 4°C geblockt und anschließend mit PBST gewaschen.

Nach dem Blocken erfolgte die Inkubation mit Erstantikörper (verdünnt in PBST und 5% w/v Magermilchpulver) bei Raumtemperatur bzw. bei 4°C bei Inkubation über Nacht. Die Inkubationszeiten und Verdünnungen sind unten bei der Auflistung der Antikörper angegeben. Danach folgte ein Waschschrift von mindestens 30 min, wobei das PBST dreimal gewechselt wurde.

Im Anschluß wurden die Membranen mit Zweitantikörper (verdünnt in PBST und 5% w/v Magermilchpulver) für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnungen sind unten angegeben.

Nach der Inkubation mit Zweitantikörper wurde die Membran mindestens eine Stunde gewaschen, wobei das PBST mehrmals gewechselt wurde, um überschüssigen Antikörper zu entfernen.

Schließlich wurden die spezifischen Banden mittels Chemolumineszenz detektiert (ECL Western blotting detection reagents, Amersham), und auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham) sichtbar gemacht.

Verwendete Antikörper:

HSP70: Erstantikörper: anti-Hsp70 goat polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnologies), 1:125 für 3 h bei Raumtemperatur (RT)

Zweitantikörper: donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz), 1:4000 für 1 h bei RT

und

Erstantikörper: anti-Hsp70 mouse monoclonal (Stressgen), 1:1000 für 3 h bei RT

Zweitantikörper: anti-mouse IgG, HRP-linked whole antibody from sheep (Amersham), 1:1000 für 1 h bei RT

HSP40: Erstantikörper: anti-Hsp40 goat polyclonal IgG (Santa Cruz), 1:125 für 3 h bei RT

Zweitantikörper: donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz), 1:4000 für 1 h bei RT

und

Erstantikörper: anti-Hsp40 mouse monoclonal (Stressgen), 1:600 für 3 h bei RT

Zweitantikörper: anti-mouse IgG-HRP (Amersham), 1:600 für 1 h bei RT

HSP60: Erstantikörper: anti-Hsp60 goat polyclonal IgG (Santa Cruz), 1:10000 für 2 h bei RT

Zweitantikörper: donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz), 1:10000 für 1 h bei RT

HSP47: Erstantikörper: anti-Hsp47 goat polyclonal IgG (Santa Cruz), 1:125 für 3 h bei RT

Zweitantikörper: donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz), 1:4000 für 1 h bei RT

Beta-Aktin: Erstantikörper: anti-Beta-Aktin mouse (Sigma), 1:1000 für 2 h bei RT

Zweitantikörper: anti-mouse IgG-HRP (Amersham), 1:1000 für 1 h bei RT

GAPDH: Erstantikörper: anti-GAPDH mouse (Biotrend), 1:10000 für 2 h bei RT

Zweitantikörper: anti-mouse IgG-HRP (Amersham), 1:1000 für 1 h bei RT

2.4.3.3 Densitometrische Auswertung von Western Blots

Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm Quantity One Version 4.3.0 von BioRad.

Die relativen, vergleichbaren Intensitäten wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{(\text{Rohwert} / \text{Rohwert } \beta\text{-Aktin})}{(\text{Kontrolle} / \text{Kontrolle } \beta\text{-Aktin})}$$

Dann wurde aus drei Relativwerten der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Standardabweichung ist natürlich bei nur drei Werten ein mit Vorsicht zu geniessender Wert, da schon ein einzelner stark abweichender Wert zu einer recht großen Standardabweichung führt.

Sinnvoller ist die Angabe von minimalem und maximalem Wert, oder sogar allen drei Werten zusätzlich zur Angabe des Mittelwerts.

2.5 Nachweis von HSP-70 auf RNA-Ebene

2.5.1 Versuche

Humane glatte Muskelzellen wurden in Zellkulturflaschen (Corning) bis zu 80% Konfluenz kultiviert und dabei mit Vollmedium alle zwei Tage versorgt.

Der Versuchsablauf und die Stressfaktoren waren den in 2.4.1 beschriebenen gleich.

Es wurden Versuche mit Inkubationszeiten von eineinhalb, zwei, drei, sechs, neun, zwölf, 24 und 48 h durchgeführt.

2.5.2 RNA-Isolierung

Bei Versuchsende wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA von den Zellkulturflaschen abgelöst, und dann jeweils in 10 ml Vollmedium aufgenommen, und bei 300g für 5 min zentrifugiert. Nach dem Abkippen des Überstandes wurden die Zellpellets mit Lysepuffer (350 µl RLT-Lysepuffer (Qiagen) + 3,5 µl Mercaptoethanol) resuspendiert.

Das so gewonnene Zell-Lysat wurde durch einen QiaShredder® (Qiagen) zentrifugiert und homogenisiert, und die RNA anschließend mit dem RNeasy MiniKit® (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Danach wurde eine RNA-Konzentrationsmessung bei einer Extinktion von 260 nm im Photometer (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) durchgeführt. Durch die Bestimmung der Ratio E_{260} / E_{280} wurde eine Verunreinigung mit Proteinen ausgeschlossen. Bei einem Wert von $>1,7$ wurde keine Verunreinigung angenommen.

2.5.3 Reverse-Transkriptase-PCR

2.5.3.1 Reverse Transkription:

Die RNA musste zunächst in komplementäre cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurde die sogenannte „random-priming method“ verwendet, eine nicht Gen-spezifische Methode. Nach dem Zufallsprinzip lagern sich Hexamere (kurze Oligonukleotide bestehend aus 6 Nukleotiden), die alle möglichen Nukleotide in jeder Position tragen, an die RNA-Moleküle an. Eine RNA-abhängige DNA-Polymerase kann sie dann als Primer für die cDNA-Synthese verwenden.

Zunächst wurde ein Master Mix in genügender Menge für alle Proben hergestellt, der alle nötigen Komponenten für die DNA-Synthese enthielt. Der Master Mix wurde dann auf die benötigte Anzahl von Eppendorf-Cups portioniert, und die weiteren Komponenten in folgender Reihenfolge dazugegeben:

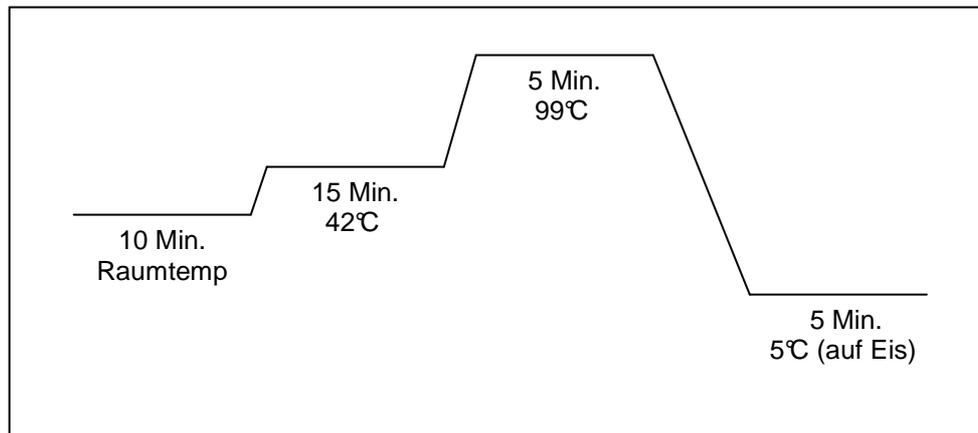
- 1) 15 µl Master Mix mit folgender Zusammensetzung:

Komponente	Volumen (einfach)	Endkonzentration
MgCl ₂ (25mM)	4 µl	5 mM
10X PCR Buffer II	2 µl	1X
dGTP	2 µl	1 mM
dCTP	2 µl	1 mM
dATP	2 µl	1 mM
dTTP	2 µl	1 mM
RNase Inhibitor (20U/µl)	1 µl	1 U/µl

- 2) 1 μ l Random Hexamers (Endkonzentration 2,5 μ M)
- 3) 1 μ g RNA und entsprechende Menge an Wasser (DEPC-behandelt).
Das Volumen von RNA und Wasser ergeben sich aus den RNA-Konzentrationen der einzelnen Proben, Gesamtvolumen 3 μ l
- 4) 1 μ l Reverse Transkriptase (50 U/ μ l), Endkonzentration: 2,5 U/ μ l

Gesamtvolumen einer Probe: 20 μ l

Dann wurden die Proben gut gevortext, anzentrifugiert und durchliefen folgende Temperaturabfolge:



2.5.3.2 PCR (Amplifikation):

Nach der Reversen Transkription enthalten die Proben cDNA, und es können Gene mit spezifischen Primer-Paaren amplifiziert werden.

Es wurde das Primer-Paar Human HSP-70A (HSP-70-1) der Firma Biozol verwendet:

Sense Primer: 5'TGTTCCGTTTCCAGCCCCCAA3'

Antisense Primer: 5'GGGCTTGTCTCCGTCGTTGAT3'

Bei Amplifikation von zytoplasmatischer RNA mit diesen Primern wird ein Produkt der Größe 360 bp erwartet.

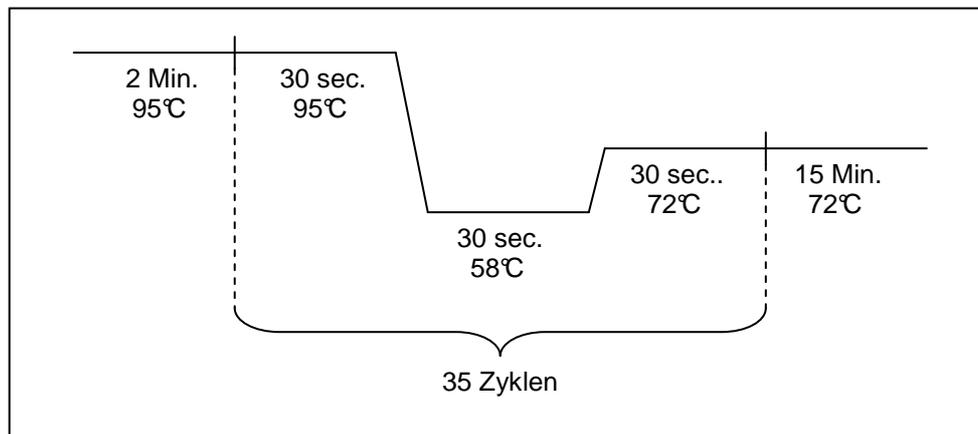
Die Proben für die PCR wurden in folgender Reihenfolge zusammenpipettiert:

- 1) 10 µl cDNA (Produkt der Reversen Transkription)
- 2) 1 µl Primer Mix HSP-70 (jeder Primer 7,5 µM)
- 3) 39 µl Master Mix folgender Zusammensetzung:

Komponente	Volumen (einfach)	Endkonzentration
MgCl ₂ (25mM)	2 µl	1 mM
10X PCR Buffer II	5 µl	1X
Steriles Wasser (DEPC)	31,75 µl	---
Taq Polymerase (5U/µl)	0,25 µl	0,025 U/µl

Gesamtvolumen einer Probe: 50 µl

Die Proben durchliefen dann folgendes Amplifikationsprotokoll:



Für den Master Mix und die anderen Komponenten der Probenansätze wurde das GeneAmp® RNA PCR Kit (Applied Biosystems) verwendet. Bei der Reversen Transkription und der DNA-Amplifikation wurden die Angaben des Herstellers der HSP-70 Primer (Biozol) beachtet.

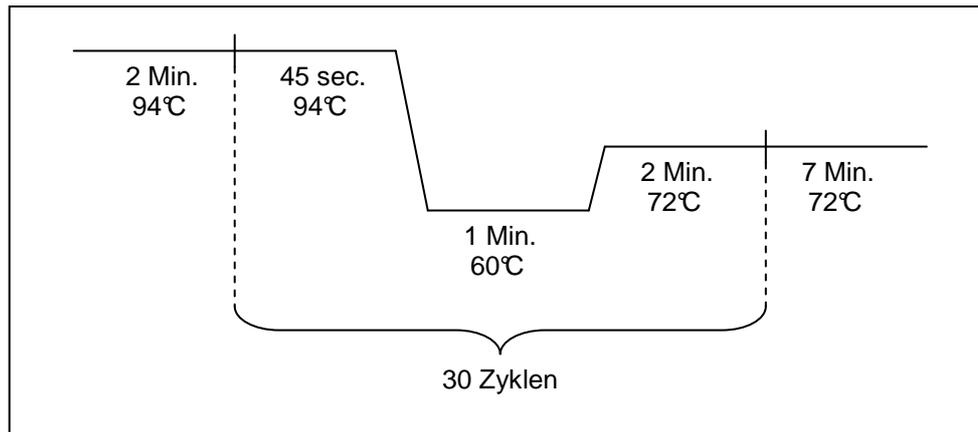
Als Kontrolle (Housekeeping Gene) wurde aus der cDNA noch das Gen für β-Aktin amplifiziert. Dazu wurden Primer (human β-Actin, 838 bp) der Firma Clontech und ein vorgefertigter Master Mix (Clontech) verwendet, und die Proben in folgender Reihenfolge zusammenpipettiert:

- 1) 22 µl Steriles Wasser (DEPC)
- 2) 25 µl Master Mix

- 3) je 0,5 µl Primer β-Aktin
- 4) 2 µl cDNA

Gesamtvolumen einer Probe: 50 µl

Die Proben durchliefen folgendes Amplifikationsprotokoll:



Die PCR wurde in einem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) durchgeführt.

2.5.3.3 Gelelektrophorese und Bildgewinnung

Die Proben aus der PCR wurden in einem 2%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurden 100 ml 1-fach TBE (s.u.) mit 2 g Agarose (GIBCO®) aufgekocht. Zur Anfärbung der DNA wurden ca. 5×10^{-3} % Ethidiumbromid (Biorad) zugesetzt. Daraufhin wurde das Gel in eine Gelkammer (GIBCO®) gegossen und ausgehärtet.

Jeweils 5 µl aus jeder Probe wurden mit 2 µl Probenpuffer (Blue/Orange 6X Loading Dye, Promega) versetzt und bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Als Größenstandard wurde ein Marker (DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche) mit aufgetrennt.

Im Anschluß wurden die Banden auf einem UV-Leuchttisch (TFX-20M, GIBCO®) sichtbar gemacht, und mit einer Kamera (Kodak) abphotographiert und in digitaler Form gespeichert.

2.6 Puffer und Lösungen

Vollmedium:

Unter der Sterilbank wurden Waymouth's MB 752/1 und Ham's Nutrient Mixture F12 (beides GIBCO®) im Verhältnis 1:1 gemischt. Dann wurden 10% Fetales Kälberserum (FCS, PAA Laboratories GmbH), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (beides GIBCO®) hinzugefügt.

PBS:

1 Tablette PBS (GIBCO®) wurde in 500 ml Ampuwa® (Fresenius) gelöst und die Lösung anschließend autoklaviert.

PBST:

In 1000 ml Aqua bidest. wurden zwei Tabletten PBS (GIBCO®) gelöst. Dann wurden 0,5 ml Tween 20 (Sigma) dazugemischt.

Lysepuffer für die Proteinisolierung:

Stammlösung: 25 ml Tris/HCl pH 8,0, 2 ml EDTA pH 8,0, 4,4 g NaCl und 2,5 ml NP-40 wurden mit Aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt.

Gebrauchslösung: Zur Stammlösung wurden 2 µg/ml Leupeptin und PMSF, sodass es 1 mM vorlag, dazugegeben (alle Komponenten von Sigma).

Tris/HCl 0,75 M pH 8,8:

90,86 g Tris (Sigma) wurden in 900 ml Aqua bidest. gelöst, der pH mit HCl auf 8,8 eingestellt und mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt.

Tris/HCl 0,625 M pH 6,8:

75,71 g Tris wurden in 800 ml Aqua bidest. gelöst, der pH mit HCl auf 6,8 eingestellt und mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt.

Probenpuffer (Western Blot):

2,5 ml SDS 20% (Applichem), 1 ml Glycerin (Applichem), 1 ml Tris 0,625 M pH 6,8, 2,5 µl PMSF (Sigma), 1,8 g Harnstoff und 1 Spatelspitze Bromphenolblau (beides Applichem) wurden vermischt, und 111 µl Mercaptoethanol (Applichem) pro ml Probenpuffer hinzugesetzt.

Laufgel:

4,0 ml Aqua bidest.; 2,5 ml 0,75 M Tris/HCl-Lösung pH 8,8; 25 µl SDS 20%; 3,4 ml Acrylamid/Bis 30% (Sigma); 5 µl TEMED (GIBCO®); 50 µl Ammoniumpersulfat 10%.

Sammelgel:

3,0 ml Aqua bidest.; 1,25 ml 0,625 M Tris/HCl-Lösung pH 6,8; 25 µl SDS 20%; 0,65 ml Acrylamid; 5 µl TEMED; 25 µl Ammoniumpersulfat 10%.

Laufpuffer:

10-fach: 30 g Tris, 144 g Glycerin und 10 g SDS wurden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst.

1-fach: 50 ml 10-fach Laufpuffer wurden mit 350 ml Aqua bidest. verdünnt.

Blotpuffer:

10-fach: 24,2 g Tris und 112,6 g Glycerin wurden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst.

1-fach: 100 ml des 10-fach Blotpuffers wurden mit 100 ml Methanol (Merck) und 800 ml Aqua bidest. vermischt.

TBE:

100 ml 10-fach TBE (Cambrex) wurden mit 900 ml Aqua bidest. verdünnt.

3 Ergebnisse

3.1 Gene-Arrays

3.1.1 Kurzzeitige Wachstumsstimulation zuvor wachstumsarretierter Zellen

Nach 24-stündiger Wachstumsarretierung (serumfreies Medium) und sechsständiger Präinkubation (serumfreies Medium + Rapamycin 100 nM) erfolgte eine maximale Wachstumsstimulation mit Endothelzellmedium und Rapamycin 100 nM (Kontrollen mit Endothelzellmedium ohne Rapamycin) für sechs Stunden. Unter dieser Bedingung fand sich eine Beeinflussung der Genexpression zahlreicher Gene. Eine signifikante Heraufregulierung fand sich bei 133 mRNAs, darunter VEGF, MMP-12, Endothelin-1, IL-6, -8, und -11, Hyaluronan-Synthase 1 und BMP-2 und -6.

148 Gene wurden signifikant herunterreguliert, unter anderem das HSP-70-related protein, HSP-40, HSJ-2, heat shock cognate protein 54 (heat shock 70kD protein 8), heat shock 60kD protein (chaperonin).

Das HSP-70-1B wurde nicht eindeutig gehemmt (nur 7 von 9 Bestimmungen eindeutig).

Aufgrund dieser Daten entschieden wir uns, die Expression der Heat-shock-Proteine genauer zu untersuchen.

3.1.2 Kontinuierliche Inkubation Serum-stimulierter Zellen

Hierbei erfolgte eine kontinuierliche Wachstumsstimulation mit Vollmedium und Rapamycin 100 nM (Kontrollen mit Vollmedium ohne Rapamycin) für 48 Stunden. Hierbei zeigte sich eine Stimulation von 32 Genen, wie zum Beispiel COMP (Tsp-5), BMP-6, IL-8 und Smooth muscle alpha-2 actin. Bei 28 mRNAs zeigte sich eine Hemmung der Expression, darunter beispielsweise Tenascin XB und Kollagen Typ VI, Integrin alpha-7 und Truncated Tenascin XB.

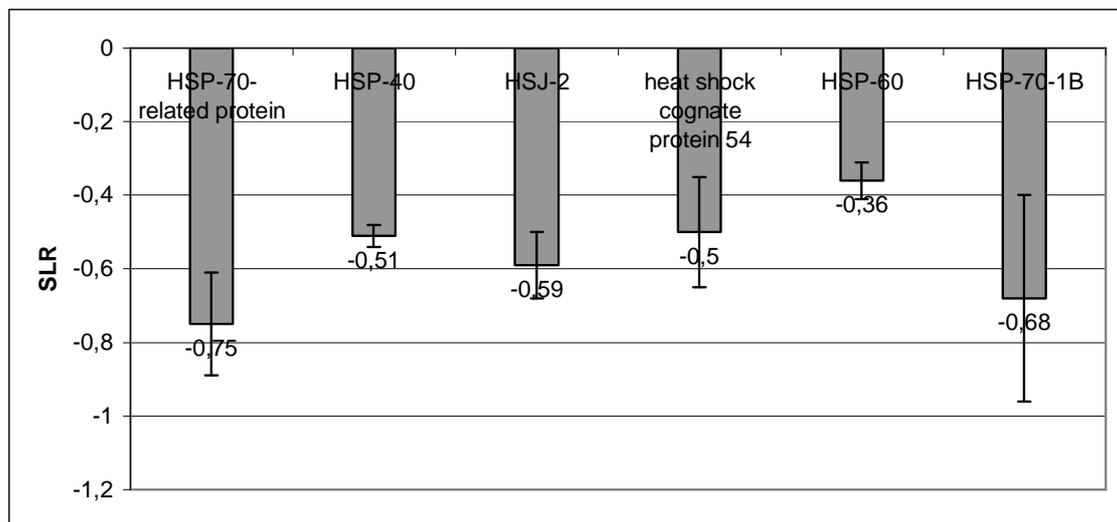
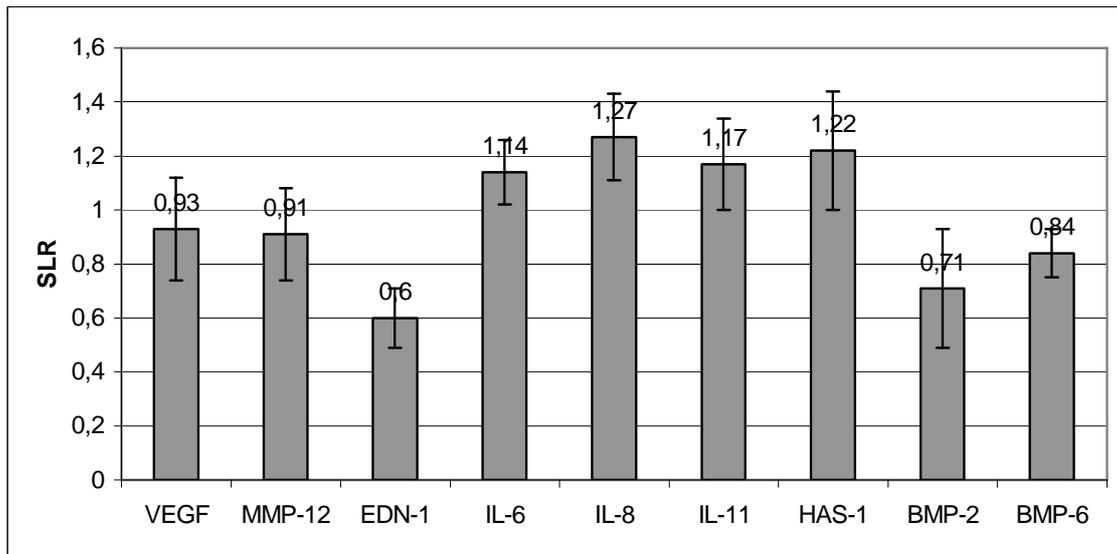


Abb. 4: Darstellung einiger Gene unter anderem aus der Gruppe der Hitzeschockproteine, die nach 24h Wachstumsarretierung und anschließender kurzzeitiger Wachstumsstimulation unter Einfluß von Rapamycin (100 nM) herauf- bzw. herunterreguliert wurden.

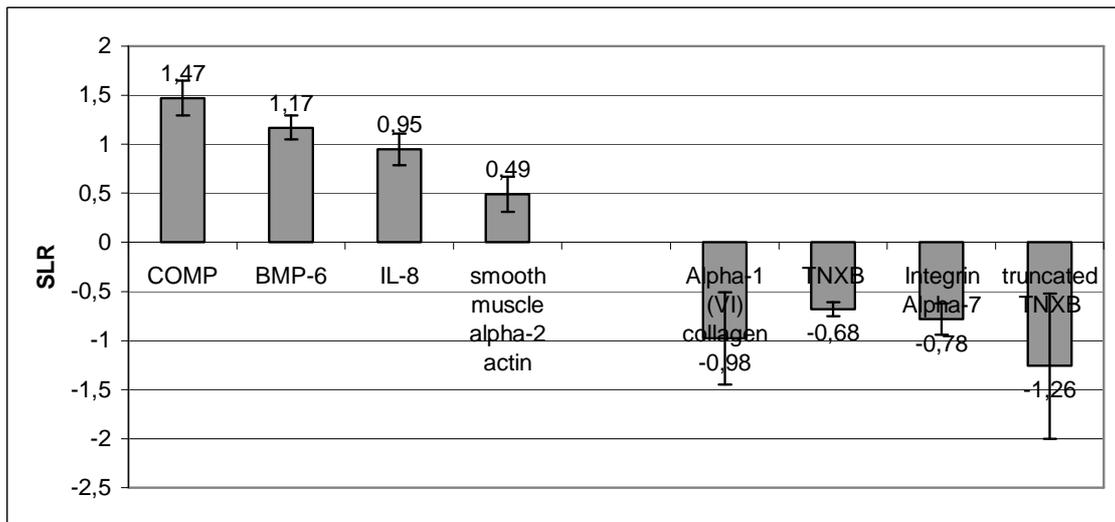


Abb. 5: Darstellung einiger Gene, die unter Einfluß von Rapamycin (100 nM) in kontinuierlich wachsenden glatten Muskelzellen herauf- bzw. herunterreguliert wurden.

Eine vollständige Auflistung der Gene, die in den Gene-Arrays signifikant beeinflusst wurden, findet sich im Anhang.

3.2 Western Blot Analysen

3.2.1 Erste Versuche

In den ersten Versuchen zeigte sich, dass die Expression von HSP-40 und HSP-70 durch Wärmebehandlung für 2 h bei 40°C als Stressfaktor gesteigert werden kann. In einem Teil der Versuche konnte diese gesteigerte Expression durch Inkubation mit Rapamycin für zwölf bzw. für 24 Stunden gehemmt werden. Bei HSP-60 zeigte sich dieser Effekt nicht.

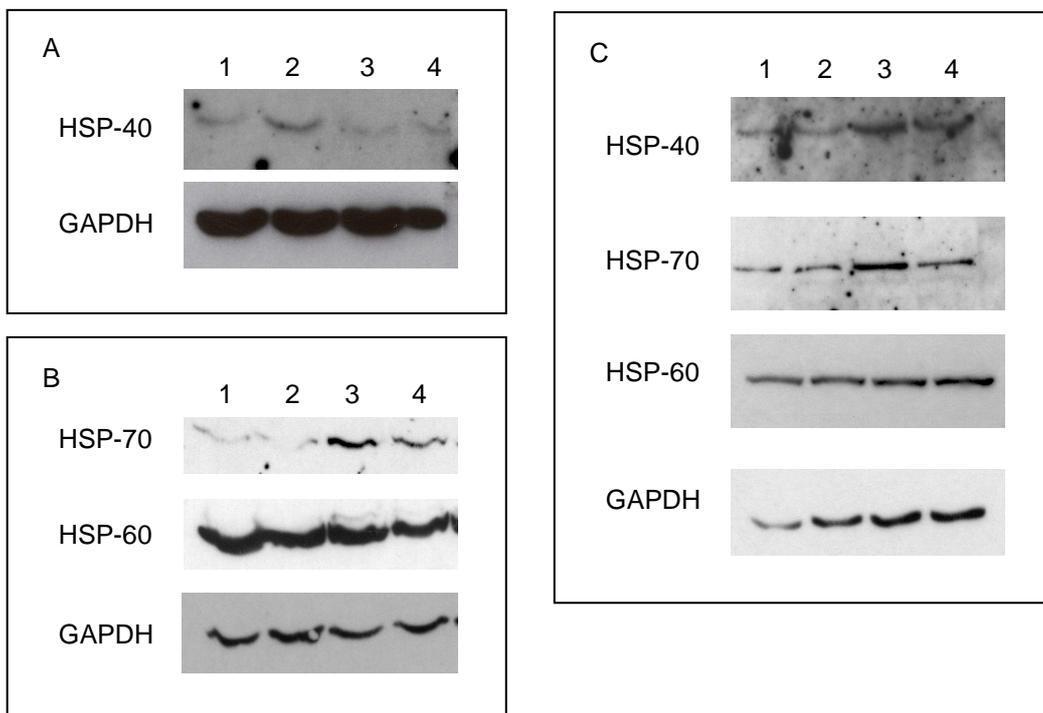


Abb. 6: Western Blots, die den Einfluss von Hitzeschock (2 h bei 40°C) und Inkubation mit Rapamycin (100 nM) auf die Expression von HSP-40, HSP-70 und HSP-60 zeigen. **A:** 12 h Inkubation; 1 = Vollmedium (Kontrolle); 2 = Hitzeschock 3 = Vollmedium + Rapamycin (Kontrolle); 4 = Hitzeschock + Rapamycin. Es wurden 30 µg Protein je Probe eingesetzt. **B:** 12 h Inkubation; 1 = Vollmedium (Kontrolle); 2 = Vollmedium + Rapamycin (Kontrolle); 3 = Hitzeschock; 4 = Hitzeschock + Rapamycin. Es wurden 70 µg Protein je Probe eingesetzt. **C:** 24 h Inkubation; 1 = Vollmedium (Kontrolle); 2 = Vollmedium + Rapamycin (Kontrolle); 3 = Hitzeschock 4 = Hitzeschock + Rapamycin. Es wurden 30 µg Protein je Probe eingesetzt.

Die hier dargestellten Ergebnisse aus diesen Versuchen konnten jedoch in insgesamt vier Versuchen nicht durchgängig reproduziert werden.

In weiteren Versuchen zeigte sich eine Steigerung der Expression von HSP-40 durch Wärmebehandlung für 2 h bei 40°C, Inkubation mit H₂O₂ 0,2 mM und Inkubation mit Endothelzellmedium als verschiedene Stressfaktoren. Durch Inkubation mit Rapamycin für 12 h konnte diese gesteigerte Expression gehemmt werden.

Die Expression von HSP-70 konnte durch Wärmebehandlung für 2 h bei 40°C gesteigert werden, durch Inkubation mit Rapamycin aber nicht gehemmt werden.

Die Inkubation mit H₂O₂ und mit Endothelzellmedium führte zu keiner nennenswerten Steigerung der Expression von HSP-70 im Vergleich zur Kontrolle. Ein hemmender Effekt durch Rapamycin konnte nur in einem von drei Versuchen nachgewiesen werden, und muß wahrscheinlich als Artefakt gewertet werden.

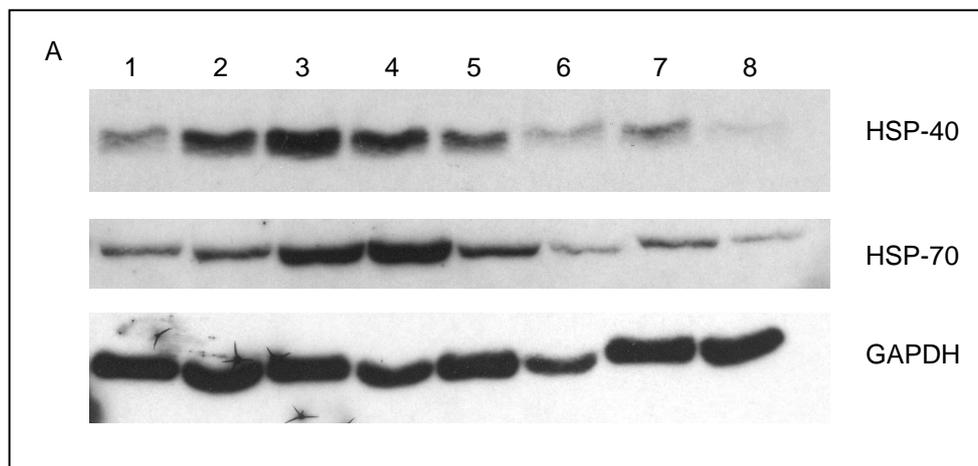


Abb. 7: Western Blot, der den Einfluß von Rapamycin (100 nM) auf die Expression von HSP-40 und HSP-70 in vaskulären glatten Muskelzellen nach Einwirken von verschiedenen Stressfaktoren und 12 h Inkubation zeigt.

A: 1 = Vollmedium (Kontrolle), 2 = Vollmedium + Rapamycin (Kontrolle), 3 = Hitzeschock (2 h 40°C), 4 = Hitzeschock + Rapamycin, 5 = H₂O₂, 6 = H₂O₂ + Rapamycin, 7 = Endothelzellmedium, 8 = Endothelzellmedium + Rapamycin. Es wurden 70 µg Protein je Probe eingesetzt.

Repräsentatives Ergebnis aus einer Reihe von drei unabhängigen Versuchen.

3.2.2 Abschließende Versuche

Da die Ergebnisse aus den vorangegangenen Versuchen zum Teil Effekte von Rapamycin auf die Expression von Hitzeschockproteinen zeigten, die jedoch

nicht durchgängig reproduzierbar waren, entschlossen wir uns, drei weitere Versuche zu machen. Bei diesen Versuchen wurden vier verschiedene Inkubationszeiten (6, 12, 24 und 48 h) verwendet, und als Stressfaktor kam die Wärmebehandlung mit 42°C für 30 Minuten hinzu. Außerdem wurde nun β -Aktin als Housekeeping-Gen verwendet, da sich in der Literatur ein Hinweis fand, dass Rapamycin die Genexpression von GAPDH herunterreguliert.⁷³

Für HSP-47 konnten nur im ersten Versuch verwertbare Bilder hergestellt werden, da danach durch ein ungeklärtes, vermutlich durch den Antikörper bedingtes technisches Problem die Banden nicht mehr spezifisch gefärbt wurden.

Ein Teil der Ergebnisse aus diesen Versuchen wurde densitometrisch ausgewertet.

3.2.2.1 6 h Inkubation

Nach sechs Stunden Inkubation zeigten sich keine nennenswerten Effekte. Vereinzelt Schwankungen müssen als Artefakte gewertet werden.

3.2.2.2 12 h Inkubation

Für HSP-40 zeigte sich wiederum eine Steigerung der Expression durch in-vitro-Stress, vor allem durch Hitzeschock für 2 h bei 40°C. Das Ergebnis aus den ersten Versuchen mit zwölf Stunden Inkubationszeit (siehe 3.2.1), bei denen sich eine Hemmung dieser gesteigerten Expression unter Einfluß von Rapamycin andeutete, konnte jedoch nur in einem von drei Versuchen reproduziert werden.

Die Expression von HSP-70 konnte durch Wärmebehandlung für 2 h bei 40°C gesteigert werden. Die in den vorherigen Versuchen angedeutete Hemmung durch Rapamycin konnte allerdings nicht mehr reproduziert werden. Auch bei den anderen Stressfaktoren zeigte sich in keinem Versuch eine Hemmung von HSP-70 durch Rapamycin.

Bei HSP-60 und HSP-47 zeigte sich wiederum kein Effekt.

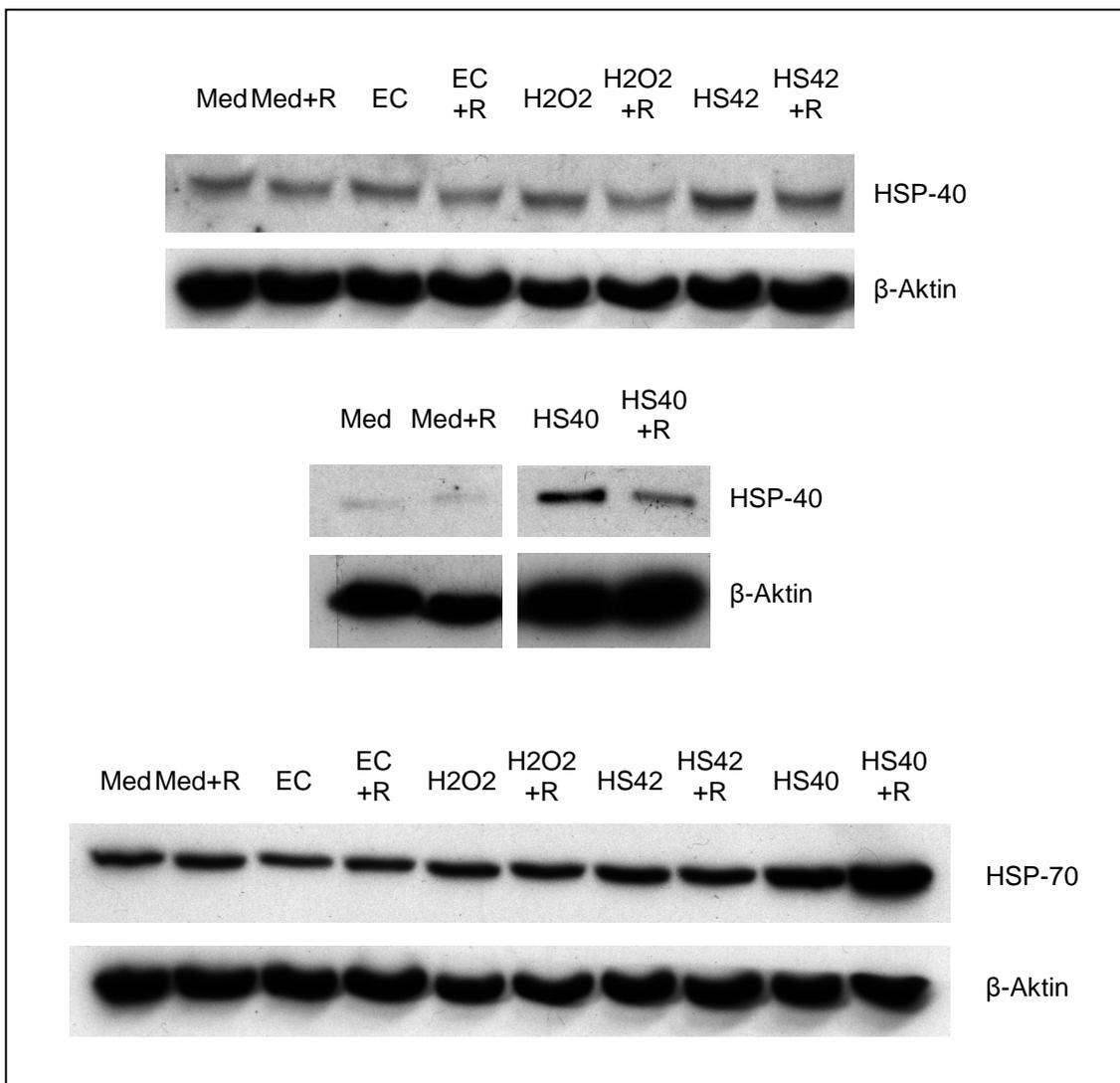


Abb. 8: Western Blots, die den Einfluß von Stressfaktoren und Rapamycin (100 nM) auf die Expression von Hitzeschockproteinen zeigen. Inkubationszeit 12 h. Med = Vollmedium, EC = Endothelzellmedium, H₂O₂ = H₂O₂ 0,2 mM, HS40 = Hitzeschock für 2 h bei 40°C, HS42 = Hitzeschock für 30 min bei 42° C, R = Rapamycin 100 nM
HSP-40 oben: Es wurden 40 µg Protein je Probe eingesetzt. HSP-40 Mitte: Es wurden 35 µg Protein je Probe eingesetzt. HSP-70: Es wurden 40 µg Protein je Probe eingesetzt.
Repräsentatives Ergebnis aus einer Reihe von drei unabhängigen Versuchen.

3.2.2.3 24 h Inkubation

Die Expression von HSP-40 und HSP-70 konnte vor allem durch Wärmebehandlung für 2 h bei 40°C und für 30 min bei 42°C gesteigert werden, teilweise auch durch Inkubation mit Endothelzellmedium und mit H₂O₂ 0,2 mM.

HSP-40 wurde nach Wärmebehandlung für 30 min bei 42°C durch Rapamycin nur in einem von drei Versuchen gehemmt, bei den anderen Stressfaktoren nur in ein bis zwei von drei Versuchen.

HSP-70 wurde unter dieser Bedingung in zwei von drei Versuchen gehemmt. Bei den anderen Stressfaktoren trat kein nennenswerter Effekt auf.

Bei HSP-60 und HSP-47 zeigte sich kein Effekt.

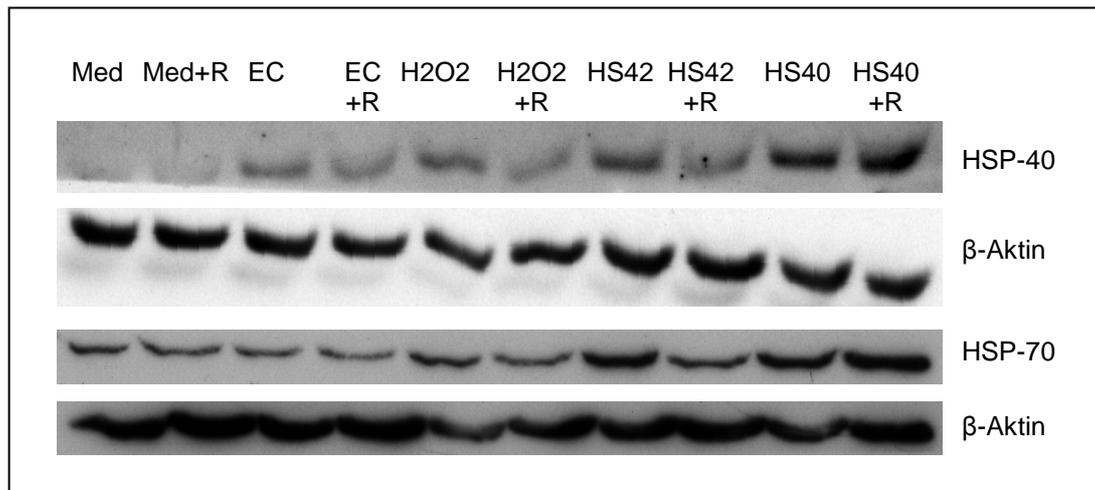


Abb. 9: Western Blots, die den Einfluß von Stressfaktoren und Rapamycin (100 nM) auf die Expression von Hitzeschockproteinen zeigen. Inkubationszeit 24 h.

Abkürzungen wie bei Abb. 8

HSP-40: Es wurden 40 µg Protein je Probe eingesetzt. HSP-70: Es wurden 30 µg Protein je Probe eingesetzt.

Repräsentatives Ergebnis aus einer Reihe von drei unabhängigen Versuchen.

3.2.2.4 48 h Inkubation

Die Expression von HSP-40 und HSP-70 wurde durch die Stressfaktoren in ähnlicher Weise wie bei 24 h Inkubation gesteigert.

Eine Hemmung der Expression zeigte sich für HSP-40 und HSP-70 in allen drei Versuchen nach Wärmebehandlung für 30 min bei 42°C in Anwesenheit von Rapamycin 100 nM.

Bei den anderen Stressfaktoren konnte eine Hemmung von HSP-40 und HSP-70 durch Rapamycin nur in ein bis zwei von drei Versuchen nachgewiesen werden.

Für HSP-60 und HSP-47 zeigte sich kein Effekt.

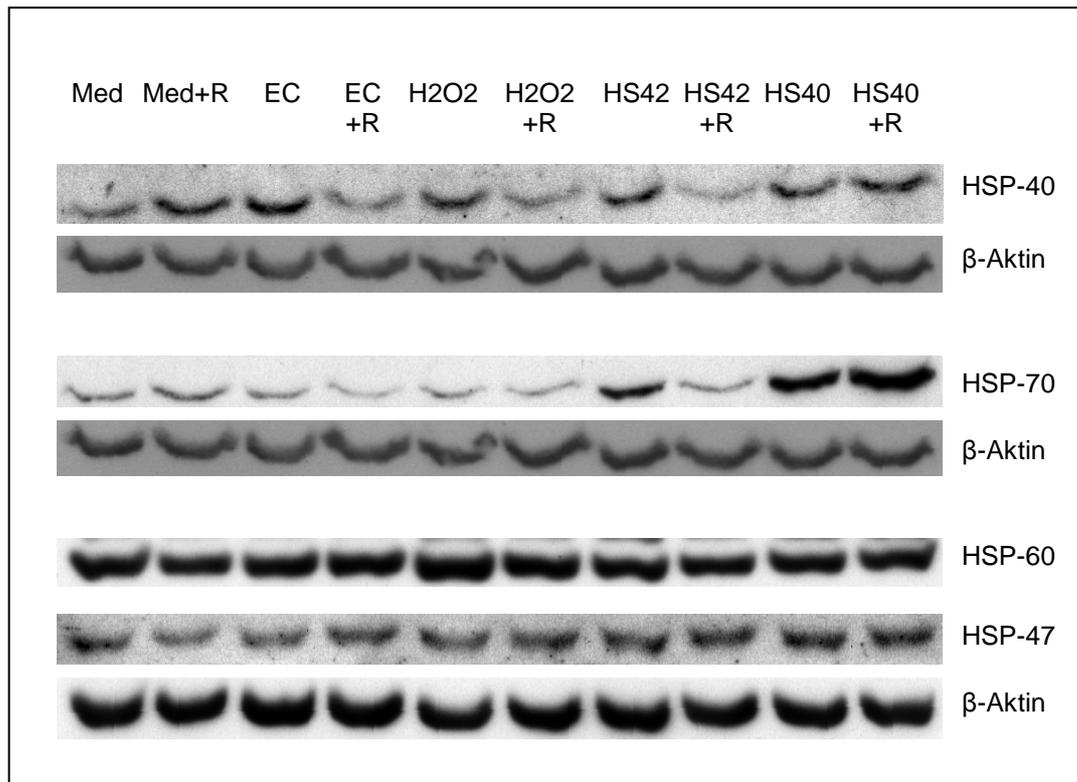


Abb. 10: Western Blots, die den Einfluß von Stressfaktoren und Rapamycin (100 nM) auf die Expression von Hitzeschockproteinen zeigen. Inkubationszeit 48 h.

Abkürzungen wie bei Abb. 8

HSP-40 und HSP-70: Es wurden 30 µg Protein je Probe eingesetzt. HSP-60 und HSP-47: Es wurden 40 µg Protein je Probe eingesetzt.

Repräsentatives Ergebnis aus einer Reihe von drei unabhängigen Versuchen.

3.2.2.5 Ergebnisse der densitometrischen Auswertung

Die densitometrische Auswertung führte nicht zu einem anderen als dem bisher beschriebenen Ergebnis.

Ausgewertet wurden Ergebnisse aus den Versuchen unter 3.2.2, und zwar die Versuche mit den Inkubationszeiten 12, 24 und 48 Stunden. Auf die Auswertung der Ergebnisse mit 6 Stunden Inkubationszeit wurde verzichtet. Da Ergebnisse für HSP-47, wie schon oben beschrieben, nur für den ersten Versuch vorliegen, wurde auch hier auf eine densitometrische Auswertung verzichtet.

Im folgenden wird eine Tabelle aufgeführt, die die relativen Intensitäten zu den genannten Versuchsbedingungen aus allen drei Versuchen in Prozent, sowie deren Mittelwert und Standardabweichung aufführt.

Tabelle 1: Ergebnisse der densitometrischen Auswertung für HSP-40, HSP-70 und HSP-60. Med = Vollmedium, EC = Endothelzellmedium, H₂O₂ = H₂O₂ 0,2 mM, HS40 = Hitzeschock für 2 h bei 40°C, HS42 = Hitzeschock für 30 min bei 42° C, R = Rapamycin 100 nM Mittelw. = Mittelwert, St.abw. = Standardabweichung

		Med	Med +R	EC	EC +R	H2O2	H2O2 +R	HS42	HS42 +R	HS40	HS40 +R
12h	HSP 40	100%	100%	94%	99%	111%	109%	110%	108%	139%	188%
		100%	100%	105%	96%	103%	104%	106%	100%	148%	127%
		100%	100%	89%	74%	95%	125%	117%	125%	164%	151%
	Mittelw.	100%	100%	96%	90%	103%	113%	111%	111%	150%	155%
	St.abw.	0%	0%	4%	7%	4%	5%	3%	6%	6%	14%
12h	HSP 70	100%	100%	84%	92%	121%	121%	126%	119%	153%	180%
		100%	100%	118%	102%	114%	106%	118%	98%	143%	120%
		100%	100%	91%	85%	89%	99%	110%	106%	104%	105%
	Mittelw.	100%	100%	98%	93%	108%	109%	118%	108%	133%	135%
	St.abw.	0%	0%	8%	4%	8%	5%	4%	5%	12%	19%
12h	HSP 60	100%	100%	97%	103%	95%	100%	91%	101%	92%	105%
		100%	100%	101%	88%	103%	105%	85%	96%	95%	83%
		100%	100%	100%	90%	88%	92%	93%	89%	88%	85%
	Mittelw.	100%	100%	99%	93%	95%	99%	89%	95%	92%	91%
	St.abw.	0%	0%	1%	4%	3%	3%	2%	3%	2%	6%
24h	HSP 40	100%	100%	121%	138%	159%	140%	160%	143%	202%	232%
		100%	100%	68%	95%	66%	84%	65%	87%	66%	97%
		100%	100%	87%	98%	99%	95%	98%	97%	107%	110%
			Med	Med +R	EC	EC +R	H2O2	H2O2 +R	HS42	HS42 +R	HS40

	Mittelw.	100%	100%	92%	110%	108%	106%	108%	109%	125%	147%
	St.abw.	0%	0%	13%	11%	22%	14%	23%	14%	33%	35%
24h	HSP 70	100%	100%	91%	96%	169%	128%	171%	138%	199%	210%
		100%	100%	106%	104%	107%	91%	93%	97%	113%	126%
		100%	100%	94%	105%	102%	112%	138%	107%	152%	142%
	Mittelw.	100%	100%	97%	102%	126%	111%	134%	114%	155%	159%
	St.abw.	0%	0%	4%	2%	17%	9%	18%	10%	20%	21%
24h	HSP 60	100%	100%	123%	94%	108%	77%	83%	69%	91%	79%
		100%	100%	86%	93%	88%	86%	81%	92%	75%	90%
		100%	100%	85%	94%	81%	95%	86%	99%	96%	102%
	Mittelw.	100%	100%	98%	94%	92%	86%	83%	87%	87%	90%
	St.abw.	0%	0%	10%	0%	7%	4%	1%	8%	5%	6%
		Med	Med +R	EC	EC +R	H2O2	H2O2 +R	HS42	HS42 +R	HS40	HS40 +R
48h	HSP 40	100%	100%	114%	88%	112%	88%	102%	80%	97%	90%
		100%	100%	90%	91%	81%	92%	98%	97%	97%	123%
		100%	100%	104%	97%	91%	100%	91%	109%	98%	122%
	Mittelw.	100%	100%	103%	92%	95%	93%	97%	95%	97%	112%
	St.abw.	0%	0%	6%	2%	8%	3%	3%	7%	0%	9%
48h	HSP 70	100%	100%	92%	74%	98%	80%	142%	82%	180%	198%
		100%	100%	124%	139%	116%	150%	154%	135%	177%	187%
		100%	100%	75%	73%	86%	83%	95%	111%	157%	151%
	Mittelw.	100%	100%	97%	95%	100%	105%	131%	109%	171%	179%
	St.abw.	0%	0%	12%	18%	7%	19%	15%	12%	6%	12%
48h	HSP 60	100%	100%	86%	102%	122%	110%	91%	103%	97%	104%
		100%	100%	89%	91%	93%	96%	96%	93%	89%	93%
		100%	100%	88%	100%	91%	96%	100%	95%	95%	105%
	Mittelw.	100%	100%	88%	98%	102%	100%	95%	97%	94%	101%
	St.abw.	0%	0%	1%	3%	8%	4%	2%	3%	2%	3%

Des weiteren werden aus den vorliegenden Daten einige Beispiele zusammen mit repräsentativen Western-Blots dargestellt.

In den folgenden Beispielen sieht man deutlich die vermehrte Expression von HSP-40 und HSP-70 durch Einwirkung von Hitzeschock. Unter gleichzeitiger Inkubation mit Rapamycin zeigt sich andeutungsweise eine Hemmung der Expressionssteigerung bei Hitzeschock für 30 min bei 42°C. Auch bei den anderen Stressfaktoren findet sich vereinzelt dieser Effekt.

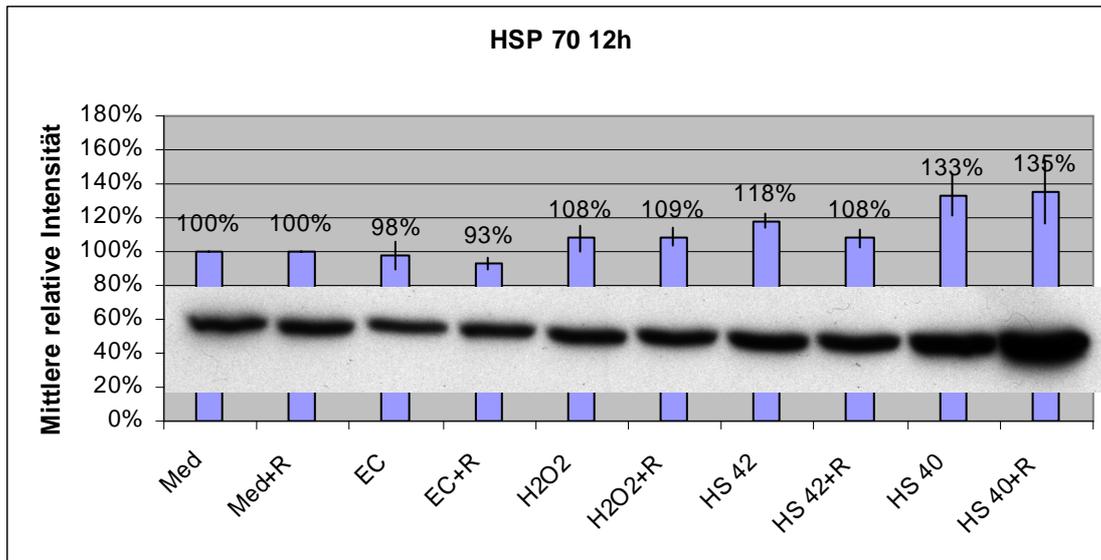
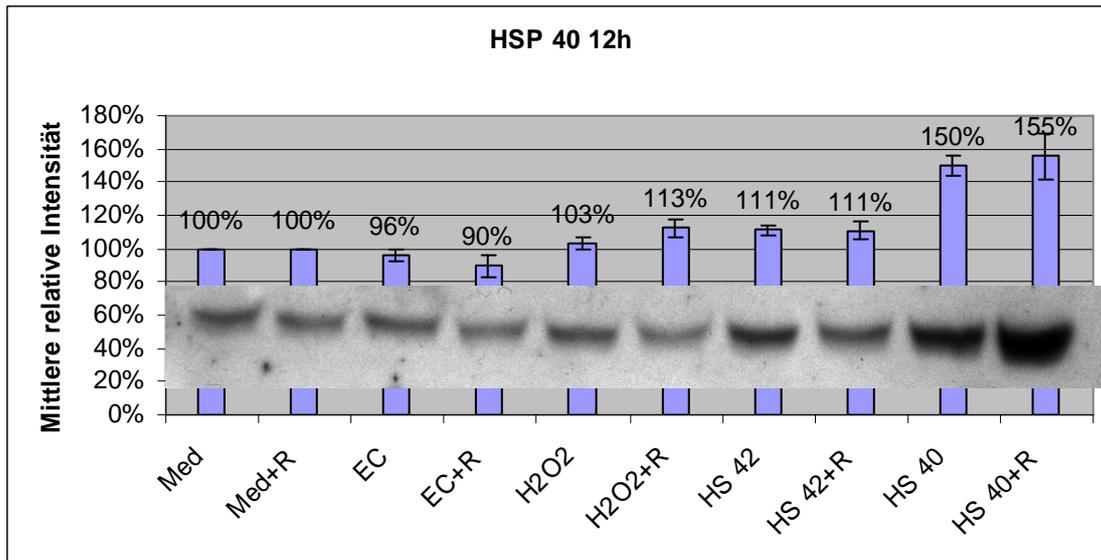


Abb. 11: Mittlere relative Intensitäten und Western Blots zu HSP-40 und HSP-70 zu den genannten Versuchsbedingungen bei Gesamtinkubationszeit 12 h. Med = Vollmedium, EC = Endothelzellmedium, H₂O₂ = H₂O₂ 0,2 mM, HS40 = Hitzeschock für 2 h bei 40°C, HS42 = Hitzeschock für 30 min bei 42° C, R = Rapamycin 100 nM

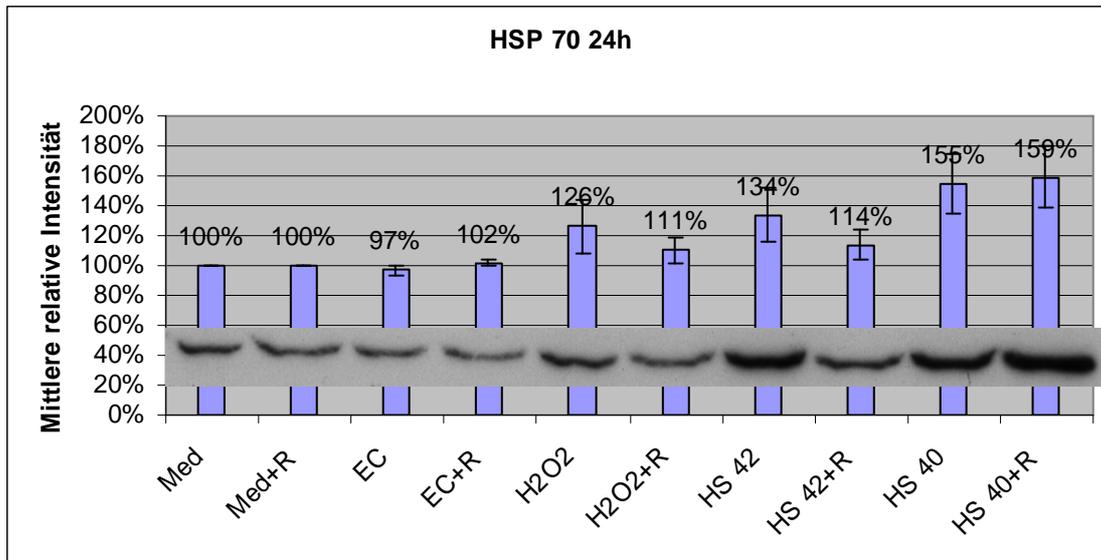
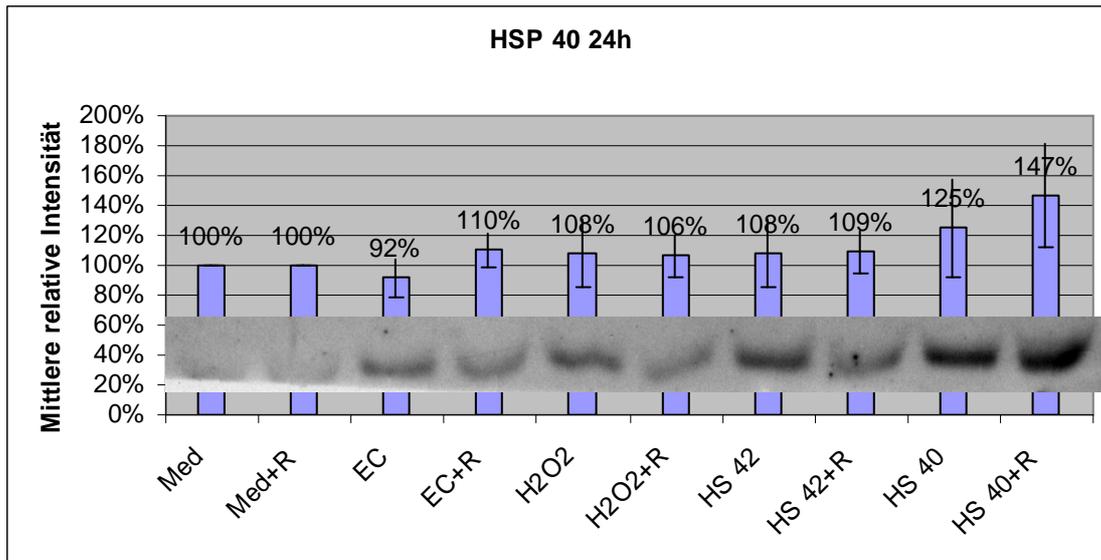


Abb. 12: Mittlere relative Intensitäten und Western Blots zu HSP-40 und HSP-70 zu den genannten Versuchsbedingungen bei Gesamtinkubationszeit 24 h. Med = Vollmedium, EC = Endothelzellmedium, H₂O₂ = H₂O₂ 0,2 mM, HS40 = Hitzeschock für 2 h bei 40°C, HS42 = Hitzeschock für 30 min bei 42°C, R = Rapamycin 100 nM

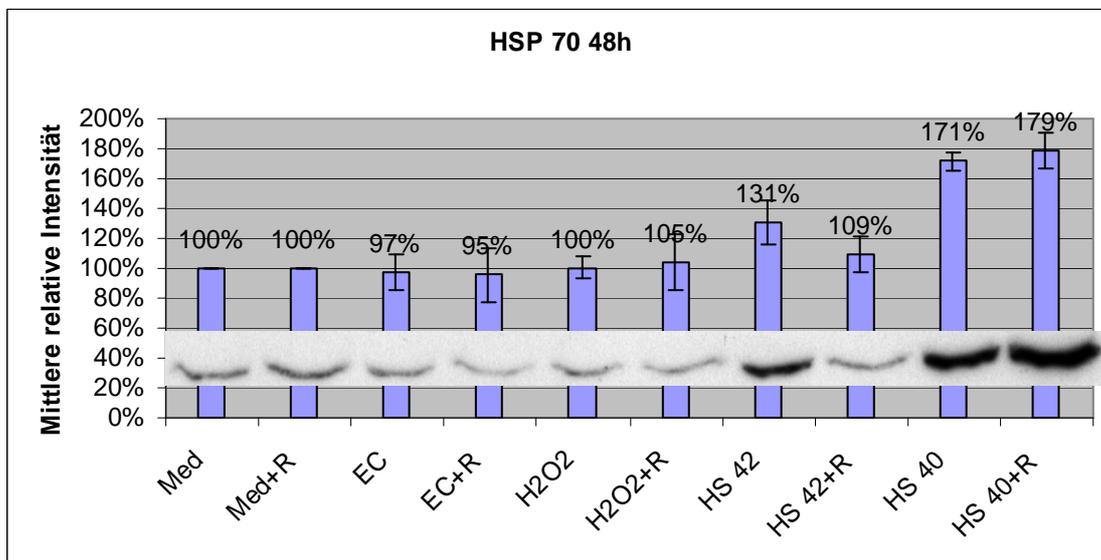
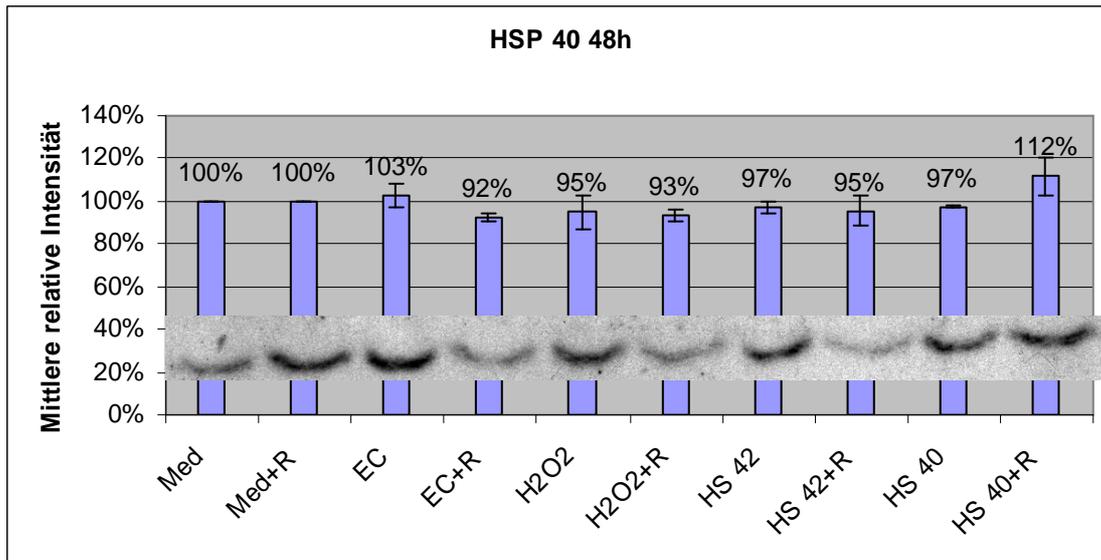


Abb. 13: Mittlere relative Intensitäten und Western Blots zu HSP-40 und HSP-70 zu den genannten Versuchsbedingungen bei Gesamtkubationszeit 48 h. Med = Vollmedium, EC = Endothelzellmedium, H₂O₂ = H₂O₂ 0,2 mM, HS40 = Hitzeschock für 2 h bei 40°C, HS42 = Hitzeschock für 30 min bei 42° C, R = Rapamycin 100 nM

3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Western Blots

Eine Steigerung der Expression von HSP-40 und HSP-70 durch Hitzeschock konnte durchgängig beobachtet werden, durch die anderen Stressfaktoren nicht so ausgeprägt.

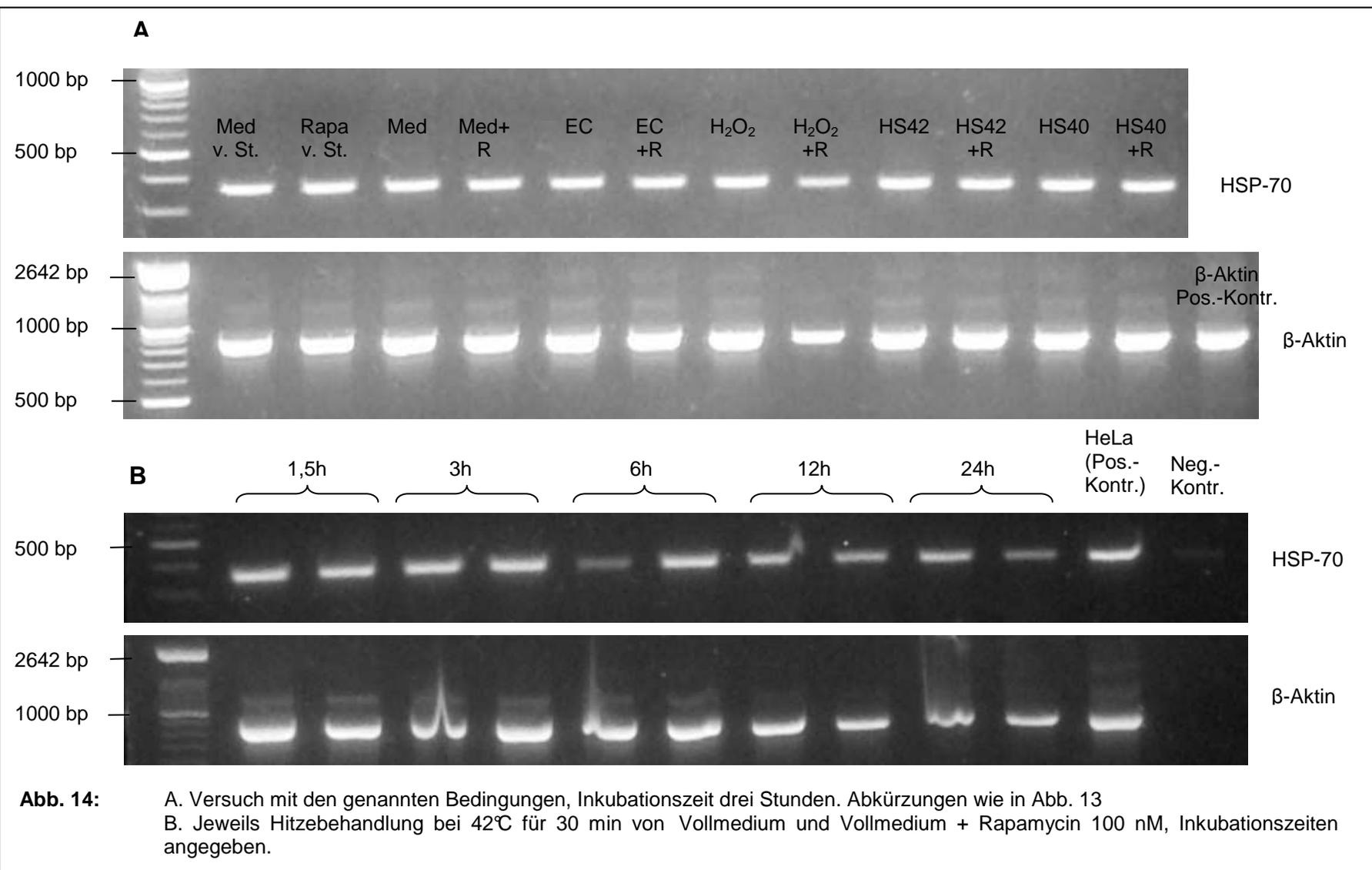
Eine Hemmung der Expression von HSP-40 und HSP-70 durch Rapamycin bei Applikation der Stressfaktoren konnte, wie oben demonstriert, nur vereinzelt beobachtet werden. Auch sind die einzelnen Intensitätsunterschiede zum Teil so schwach, dass deren Relevanz als Teil des Wirkmechanismus von Rapamycin nicht eindeutig angenommen werden kann.

Eine Hemmung der Expression von HSP-60 und HSP-47 durch Rapamycin unter den oben beschriebenen Bedingungen kann weitgehend ausgeschlossen werden.

3.3 Ergebnisse der PCR für HSP-70

Im Folgenden werden einige repräsentative Bilder aus den in 2.5 erläuterten Versuchen dargestellt. Eine zusammenfassende Ergebnisdarstellung ist aufgrund der Uneinheitlichkeit der Versuche nicht möglich.

Die Hemmung von HSP-70 auf RNA-Ebene, die sich im Gene-Array andeutete, konnte durch Reverse-Transkriptase-PCR nicht bestätigt werden.



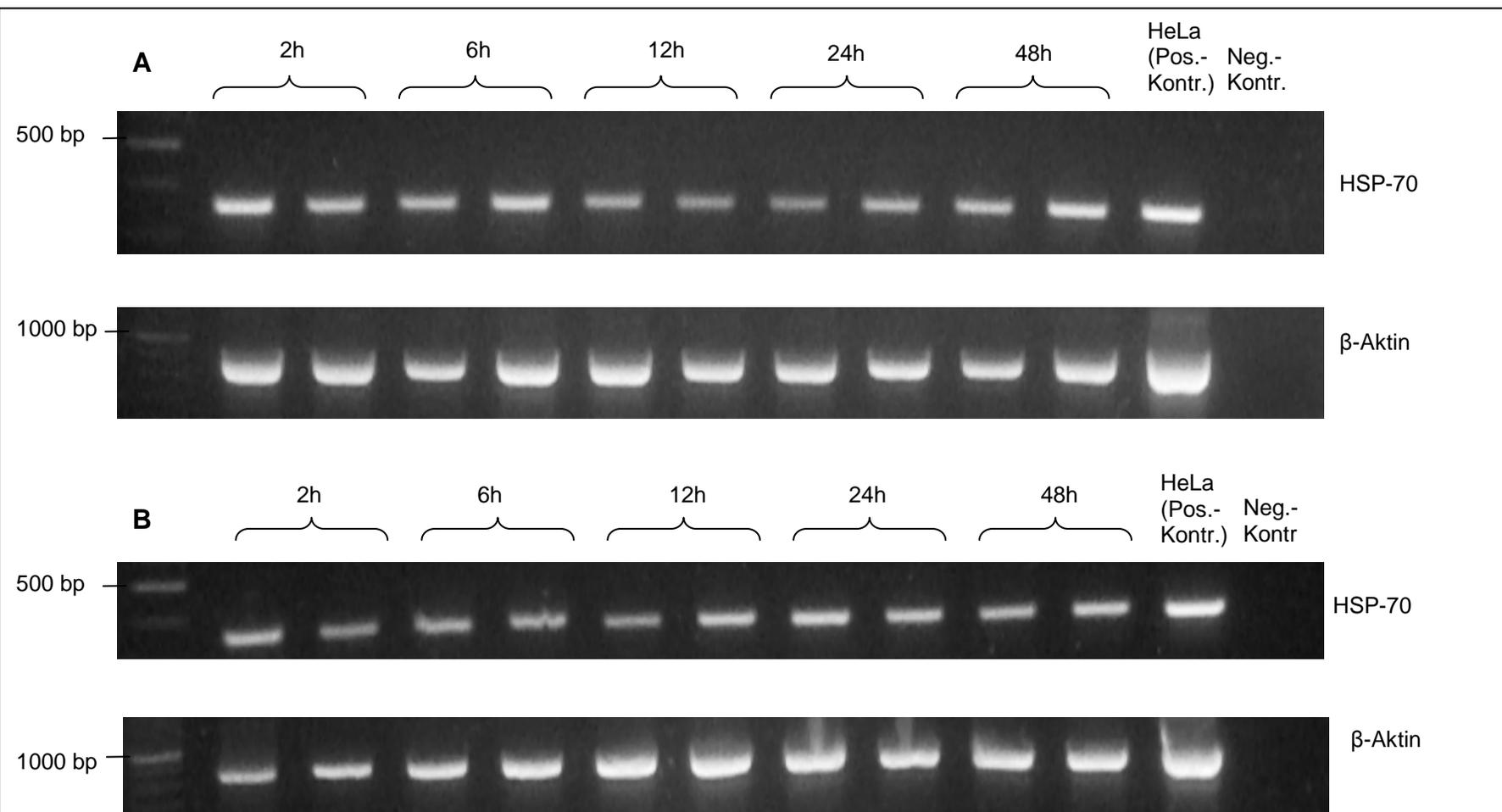


Abb. 15: A. Jeweils Hitzebehandlung bei 42°C für 30 min von Vollmedium und Vollmedium + Rapamycin 100 nM, Inkubationszeiten angegeben.
 B. Jeweils Endothelzellmedium und Endothelzellmedium + Rapamycin 100 nM, Inkubationszeiten angegeben.

4 Diskussion

4.1 Ergebnisse der Gene-Arrays

Die Gene-Arrays zeigten einen Einfluß von Rapamycin auf die Regulation zahlreicher Gene (siehe Ergebnisteil). Man kann einen Gene-Array als eine Art Screening-Test verstehen. Aus dieser Fülle von Ergebnissen wählten wir gezielt die Hitzeschockproteine zur genaueren Untersuchung aus, da sie, wie unten näher erläutert wird, schon vielfach in Zusammenhang mit der Pathogenese der Arteriosklerose und Restenose gebracht wurden.

4.2 Hitzeschockproteine

Bei den Hitzeschockproteinen handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die in den meisten Zellarten vorkommen, und evolutionär hochkonserviert sind. Sie sind sowohl an dem Zusammenbau, der korrekten Faltung (daher auch der Name „molekulare Chaperone“) und dem Transport von zellulären und extrazellulären Proteinen als auch der Bindung derer an ihre Rezeptoren beteiligt. Bei Beschädigung von Zellen durch Stress-Stimuli üben sie eine Schutzfunktion aus. In letzter Zeit häufen sich jedoch die Hinweise, dass Hitzeschockproteine eine Rolle bei der Pathogenese von Krankheiten spielen, zum Beispiel auch bei der Arteriosklerose. Hitzeschockproteine sind in arteriosklerotischen Plaques stark exprimiert.⁷⁴ Die Risikofaktoren für Arteriosklerose wie Infektionen, oxidiertes LDL, Hypertension und oxidativer und biomechanischer Stress an der Gefäßwand rufen eine verstärkte Expression von Hitzeschockproteinen in Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen über die Aktivierung sogenannter heat shock transcription factors (HSFs) hervor.⁷⁵

Die Aktivierung des Immunsystems im Rahmen der entzündlichen Entstehung von arteriosklerotischen Plaques wird auch in Zusammenhang mit HSPs gesehen. Dabei geht man von einer proinflammatorischen Reaktion und einer autoimmunen Reaktion der Zellen der Gefäßwand auf HSPs aus, welche an der Initiierung und weiteren Ausbildung von arteriosklerotischen Läsionen beteiligt

sind. Auch gibt es Hinweise auf eine Aktivierung von spezifischen T-Zellen durch im Serum gelöste HSPs.^{76;77}

Experimentell konnte in in-vitro-Modellen die Expression von Hitzeschockproteinen durch Faktoren wie Hitzeschock, oxidativen Stress (H_2O_2 , reaktive Sauerstoffmoleküle), NO, Einwirkung von Zytokinen (z.B. TNF-alpha) gesteigert werden.⁷⁸⁻⁸⁰

Die Hitzeschockproteine werden je nach Molekulargewicht in Unterfamilien eingeteilt, z.B. die HSP-40-Familie, die HSP-60-Familie und die HSP-70-Familie.

Proteine der HSP-40-Familie sind an der Faltung, Bindung und dem Transport von Kollagen beteiligt.

Ohtsuka et. al. fanden 1990 ein neues Hitzeschockprotein (p40) mit dem Molekulargewicht 40 kDa, das sich durch Hitzeschock und andere Stressfaktoren in HeLa-Zellen zusätzlich zu den bisher bekannten Hitzeschockproteinen der Molekulargewichte 110, 90, 70 und 47 kDa induzieren ließ.⁸¹

In Atherektomieproben von arteriosklerotischen Carotis-Arterien wurde mRNA von HDJ-2, einem Protein der HSP-40-Familie, signifikant erhöht nachgewiesen. Bei dieser Untersuchung zeigte sich auch eine positive Korrelation zwischen dem Gehalt an HDJ-2-mRNA in ulzerierten arteriosklerotischen Plaques und dem Grad der luminalen Stenose der Arterie.⁸² HSP-40 gilt heutzutage als Ko-Chaperon für HSP-70, indem es eine regulatorische Funktion was die Aktivität dieses Chaperons angeht übernimmt. Dies geschieht über eine Stimulation der ATPase-Aktivität von HSP-70, was zur Hydrolyse von ATP und die stabile Bindung von Peptid-Substraten an HSP-70 führt. In Abwesenheit von HSP-40 bindet ATP an HSP-70 und Substrat wird freigegeben. Es wird von einer sogenannten HSP-70/HSP-40-Chaperon-Maschinerie ausgegangen, welche die schon weiter oben beschriebenen Funktionen in vielen zellulären Kompartimenten innehat: Faltung von Proteinen

(neue sowie fehlgefaltete), Translokation von Proteinen über Membranen hinweg, Bindung von Proteinen an Rezeptoren. Dies beinhaltet auch die Funktion, zelluläre Proteine unter Stressbedingungen, wie z.B. Arteriosklerose oder Stentimplantation, zu reparieren.⁸³⁻⁸⁹

Unsere Gene-Array-Untersuchung zeigte eine Herunterregulierung der Genexpression von zwei Genen, die für Proteine der HSP-40-Familie codieren, nämlich HSJ-2 (heat shock protein DNAJ-like 2) und HSPF1 (heat shock 40kD protein 1), unter Einfluß von Rapamycin.

Mit Western Blots ließ sich eine gesteigerte Produktion von HSP-40 durch Einfluß von Stressfaktoren nachweisen, welche durch Rapamycin andeutungsweise gehemmt werden konnte. Unsere Ergebnisse lassen es aber nicht zu, dies als wahrscheinlichen Wirkmechanismus anzunehmen, über den Rapamycin Restenose verhindert.

HSP-47 hat wahrscheinlich eine Funktion als Hilfsprotein bei der intrazellulären Prozessierung von Prokollagen.⁹⁰ In Tierversuchen mit Ratten wurde eine erhöhte Expression von HSP-47 in der Arterienwand nach Ballonangioplastie gefunden.

Bauriedel et. al. wiesen eine neointimale Zellakkumulation assoziiert mit maximaler HSP-47-Expression bereits vier Tage nach Angioplastie nach. Ihre Untersuchungen ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine transmurale Migration von Zellen sondern für eine Neointimaformierung durch luminale Zellrekrutierung.⁹¹

Nach Verletzung der Arterienwand von Rattenkarotiden durch Ballonangioplastie zeigte sich eine verstärkte Expression von HSP-47 in der Neointima und den inneren Schichten der Media. Die HSP-47-Expression korrelierte mit der Expression von Prokollagen Typ 1, welches in der unverletzten Arterie nicht nachweisbar war. Mit dem Auftreten von Kollagenfibrillen in der Extrazellulärmatrix zeigte sich ein Rückgang der HSP-47-Expression. Die gesteigerte Expression von HSP-47 und Prokollagen Typ I scheint Teil der Neointimaformierung im Rahmen des arteriellen

Reparaturprozesses zu sein, und wird durch das Auftreten von extrazellulärem Kollagen in einer Art Feedback-Mechanismus limitiert.⁹²

Eine gesteigerte Expression von HSP-47 und eine Hemmung durch Rapamycin konnte durch unsere Versuche nicht gezeigt werden. Eine Hemmung der Bildung von HSP-47 und damit auch von Prokollagen bietet jedoch einen Ansatzpunkt, den überschießenden Aufbau der Neointima einzuschränken.

Die Proteine der HSP-70-Familie haben die Funktion, fehlgefaltete Proteine wieder in die richtige Form zu bringen. Zusätzlich spielen sie eine Rolle als Hilfsmoleküle bei der Faltung von neutranslatierten Proteinen, Translokation von Proteinen über Organellenmembranen hinweg, Abbau von Oligomeren und Proteolyse von instabilen Proteinen.⁹³⁻⁹⁵

Die Expression von HSP-70 konnte experimentell durch Faktoren wie NO, reaktive Sauerstoffmoleküle (H₂O₂), Hitzeschock, biomechanischen Stress (Scherkraft) und oxidiertes LDL in vaskulären glatten Muskelzellen gesteigert werden.^{78;79;96;97}

In arteriosklerotischen Läsionen wurde HSP-70 vermehrt vor allem um Nekroseherde und Orte der Lipidakkumulation nachgewiesen.^{74;98}

George et. al. angioplastierten Karotiden von Ratten, die zuvor mit HSP-70 immunisiert wurden. Gegen HSP-70 immunisierte Tiere zeigten dabei eine stärkere Intimaverdickung als die Kontrolltiere.⁹⁹ Eine solche Immunantwort könnte auch die schon früher postulierte beschleunigte Intimaverdickung im Zusammenhang mit infektiösen Erregern erklären, die eventuell durch eine Kreuzreaktion gegen die humanen HSPs und die HSPs im Erreger hervorgerufen wird.^{100;101}

In unseren Versuchen konnten wir die Steigerung von HSP-70 in vitro durch Stressfaktoren mit Western Blots bestätigen, wobei der Effekt am deutlichsten bei Behandlung der Zellen mit Hitzeschock zu sehen war. Die Daten aus dem Gene-Array zeigten, dass mehrere Mitglieder der HSP-70-Familie auf mRNA-

Ebene durch Rapamycin herunterreguliert wurden, nämlich das heat shock protein hsp-70 related protein, das heat shock 70kD protein 1B und das heat shock cognate protein 54, einer Variante von HSC-70.¹⁰² Durch Western Blots konnten wir diese Hemmung nach vorheriger Induktion der Produktion von HSP-70 durch Stressfaktoren nicht eindeutig bestätigen, in der PCR fand sich gar kein Effekt. Eine Hemmung der stressinduzierten Produktion von HSP-70 in vaskulären glatten Muskelzellen durch Rapamycin lies sich daher in unseren Versuchen nicht eindeutig postulieren.

Ein weiteres Hitzeschockprotein, nämlich das HSP-60 (Chaperonin), wird in Zusammenhang mit der Entstehung von Arteriosklerose gebracht. Eine gesteigerte Expression konnte in allen wichtigen Zellarten, die in menschlichen arteriosklerotischen Läsionen vorkommen, nachgewiesen werden, nämlich in Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Makrophagen und T-Lymphozyten. Die Intensität der HSP-60-Expression korrelierte dabei positiv mit dem Schweregrad der Arteriosklerose.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Von besonderem Interesse ist eine Studie, bei der die Expression von HSP-60 (und HSP-70) im Zusammenhang mit der Entwicklung von arteriosklerotischen Läsionen in der Aorta von Apolipoprotein E-defizienten Mäusen untersucht wurde. Die Studie ergab Hinweise darauf, dass die beiden Proteine in Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Makrophagen und CD3+-Lymphozyten während der Atherogenese temporär exprimiert werden.¹⁰⁶

Wie schon eingangs erwähnt, werden auch infektiöse Mikroorganismen als ein Faktor bei der Entstehung von Arteriosklerose diskutiert, darunter vor allem Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori und auch Herpesviren.¹⁰⁷⁻¹¹⁰

Während einer chronischen Infektion mit Chlamydia pneumoniae, welches intrazellulär persistiert und nicht repliziert, wird von den Chlamydien HSP-60 in großer Menge produziert. Eine Untersuchung ergab, dass humanes HSP-60 und Chlamydien-HSP-60 in Makrophagen in arteriosklerotischen Läsionen gleichzeitig vorkam.^{111;112}

In einer anderen Untersuchung wurden erhöhte Mengen von HSP-60 in Endothelzellen von Ratten als Reaktion auf Escherichia coli LPS gefunden, und durch in-vitro-Versuche durch Applikation des LPS an Endothelzellen bestätigt.

Diese Ergebnisse deuten an, dass HSPs eine mögliche Verbindung zwischen Infektionen und der Atherogenese herstellen.^{113;114}

In einer Populationsstudie mit 826 Individuen zeigten Xu et. al., dass im Serum gelöstes HSP-60 (sHSP-60) signifikant erhöht war bei Individuen mit Arteriosklerose der Karotiden, und unabhängig von Alter, Geschlecht und anderen Risikofaktoren mit der Dicke der Intima und Media korrelierte. Gleichzeitig zeigte sich eine Korrelation mit Entzündungsmarkern und anti-Chlamydien und anti-HSP-60 Antikörpern.¹¹⁵

Pockley et. al. fanden erhöhte Serumspiegel von sHSP-60 bei Patienten mit grenzwertig erhöhtem Blutdruck, welcher mit einer erhöhten Dicke von Intima und Media und Arteriosklerose im Frühstadium in Zusammenhang gebracht wird.¹¹⁶

Es gibt Belege dafür, dass sowohl humanes als auch Chlamydien-HSP-60 humane Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen aktiviert, und dazu anregt, proinflammatorische Substanzen wie z.B. IL-6 zu produzieren. Weiterhin wurde herausgefunden, dass HSP-60 die Anheftung von Monozyten an Endothelzellen durch CD-14 begünstigt. Beides legt nahe, dass HSP-60 das angeborene, unspezifische Immunsystem aktiviert, und proinflammatorische Reaktionen in der Gefäßwand hervorruft.¹¹⁷⁻¹²⁰

Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass sHSPs spezifisch an den TLR4/CD14-Komplex binden, und dadurch verschiedene Signalkaskaden anstoßen können. In humanen glatten Muskelzellen wird durch humanes und Chlamydien-sHSP-60 ERK42/44 stimuliert, welches der Beginn einer Signalkaskade ist, die durch Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren durch MAPK zu Zellwachstum und –ausdifferenzierung führt. Möglicherweise induziert also sHSP-60 die Proliferation von humanen glatten Muskelzellen.¹²¹⁻¹²⁹

Des Weiteren fanden mehrere Forschungsgruppen erhöhte Antikörperspiegel gegen HSP-60 und HSP-65 bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkt, Apoplex, Bluthochdruck und Restenose nach Angioplastie, was eine Rolle von erhöhtem HSP-60-Antikörperspiegel als Risikofaktor für Arteriosklerose nahe legt.¹³⁰⁻¹⁴¹

Die Entdeckung, dass sHSP-60 die Proliferation von T-Zellen in arteriosklerotischen Läsionen induziert, lässt vermuten, dass es sich um spezifische T-Zellen handelt, die HSP-60 (oder auch noch andere HSPs) als Antigen erkennen.^{104;142} Dadurch werden sie aktiviert und tragen so möglicherweise zur Entstehung der Arteriosklerose bei.

Eine autoimmune Komponente bei der Atherogenese wird wegen der hohen Sequenzhomologie¹⁴³ zwischen bakteriellen und menschlichen HSPs diskutiert. Mehrere Untersuchungen, bei denen herausgefunden wurde, dass Serumantikörper und T-Zellen nicht nur mit bakteriellem HSP-65 interagieren, sondern auch mit menschlichem HSP-60 in Gefäßwandzellen, stützen diese Hypothese.¹⁴⁴⁻¹⁴⁸

Unsere Untersuchungen zeigten eine Herunterregulierung der mRNA von heat shock 60kD protein 1 (Chaperonin) unter Einfluss von Rapamycin im Gene-Array.

Eine Steigerung der Expression von HSP-60 durch die genannten Stressfaktoren konnten wir mit Western Blots nicht nachweisen, und eine Hemmung durch die gleichzeitige Inkubation mit Rapamycin ebenfalls nicht.

In Anbetracht der vielen Hinweise einer Beteiligung von HSP-60 bei der Entstehung von Arteriosklerose durch Aktivierung des Immunsystems und von Gefäßwandzellen, wäre die Inhibition von HSP-60 ein effektiver Mechanismus, über den Rapamycin Faktoren, die zu Arteriosklerose und Restenose beitragen, unterdrücken könnte. Unsere Ergebnisse bieten jedoch keine sicheren Hinweise, einen solchen Mechanismus zu vermuten.

4.3 Expression anderer Gene

Auch bei einigen anderen Genen, die im Gene-Array signifikant beeinflusst wurden, hätte sich eine weitere Untersuchung gelohnt. Davon zu erwähnen sind besonders die Proteine BMP-2 und BMP-6, und Proteine der Extrazellulärmatrix, wie MMP-12 und Typ-VI-Kollagen.

Die BMPs gehören zur TGF- β -Superfamilie und sind sekretorische Signalmoleküle im Ossifikationsprozess des Knochengewebes. Eine Expression von BMPs fand sich in arteriosklerotischen Plaques, besonders im

Fälle von kalzifizierten Plaques, und man nimmt eine Rolle der BMPs im Kalzifikationsprozess und in der Chemotaxis von Entzündungszellen an.^{149;150}

Proteine der Extrazellulärmatrix, wie die Matrix-Metalloproteinasen und die verschiedenen Kollagen-Typen, spielen eine Rolle im Umbau des Gewebes bei der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques und Restenose-Arealen. Bedingt durch eine Labor-Reorganisation im Rahmen einer Lehrstuhl-Neubesetzung waren diese Untersuchungen in unserem Labor leider nicht mehr durchführbar.

5 Zusammenfassung

Die Senkung der Restenoserate durch mit Rapamycin beschichtete Stents im Vergleich zu unbeschichteten Stents wurde in mehreren großen Studien untersucht und belegt. Weitgehend gesichert erscheint in diesem Zusammenhang die Hemmung von Proliferation und Migration von vaskulären glatten Muskelzellen durch Rapamycin, welche an der Entstehung von Restenose beteiligt sind. Dabei erzielt die Substanz ihre Wirkung durch die Interaktion mit Signalkaskaden, die zur Expression und Translation von Faktoren führen, die maßgeblich an der Regulation von Zellteilung, Zellwachstum- und -größe und Proteinsynthese von zellulären und extrazellulären Strukturproteinen beteiligt sind. Die genauen Mechanismen, durch die das erreicht wird, sind bis dato noch unzureichend aufgeklärt.

Zu Beginn unserer Untersuchung wurden Gene-Arrays als Screening-Methode eingesetzt, um aus einer Vielzahl von Genen eine Auswahl für weiterführende Untersuchungen zu treffen. Aus den Genen, die im Gene-Array signifikant beeinflusst wurden, wählten wir eine Reihe von Genen aus, die für verschiedene Hitzeschockproteine kodieren.

Grund für die Auswahl speziell der Hitzeschockproteine war, dass eine funktionelle Rolle dieser Proteine bei der Entstehung der Arteriosklerose und der Restenose in der Literatur vielfach beschrieben ist. Somit wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Hemmung der Synthese von Hitzeschockproteinen durch Rapamycin einen möglichen Mechanismus zur Verhinderung von Restenosen darstellen könnte.

In einem in-vitro-Stressmodell sollte geprüft werden, ob die Synthese dieser Hitzeschockproteine unter Einfluss von Rapamycin auch auf Proteinebene, im Falle von HSP-70 auch auf RNA-Ebene, signifikant beeinflusst wird.

Die angewandten Stressfaktoren, vor allem der Hitzeschock, sind anerkannte Methoden, um die Synthese von Hitzeschockproteinen in vitro zu steigern.

Im Fall von HSP-40 und HSP-70 erhielten am Beginn Untersuchungen vereinzelt Ergebnisse, die einen Effekt von Rapamycin vermuten ließen. Diese Ergebnisse ließen sich jedoch nicht eindeutig reproduzieren. Insgesamt ließ sich ein Einfluß von Rapamycin auf die Proteinexpression von Hitzeschockproteinen in kultivierten humanen glatten Muskelzellen in umfangreichen Versuchen nicht eindeutig nachweisen, so dass die Hypothese, dass Rapamycin über eine verminderte Expression von Hitzeschockproteinen die Entstehung einer Restenose therapeutisch günstig beeinflusst, nicht bestätigt werden konnte.

6 Quellenverzeichnis

1. Kirby M, Jackson G, Simonsen U. Endothelial dysfunction links erectile dysfunction to heart disease. *Int J Clin Pract.* 2005;59:225-229.
2. Barter P. The inflammation: lipoprotein cycle. *Atheroscler Suppl.* 2005;6:15-20.
3. Takeya M. [Monocytes and macrophages--multifaced cell population involved in inflammation, atherosclerosis, and obesity]. *Nippon Rinsho.* 2005;63 Suppl 4:117-122.
4. Czech B, Kucewicz E, Pawlak S. [Role of inflammation and infection in the etiopathogenesis of atheromatosis--literature review]. *Wiad Lek.* 2004;57:659-662.
5. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-1695.
6. Larsson PT, Hallerstam S, Rosfors S, Wallen NH. Circulating markers of inflammation are related to carotid artery atherosclerosis. *Int Angiol.* 2005;24:43-51.
7. Duprez DA, Somasundaram PE, Sigurdsson G, Hoke L, Florea N, Cohn JN. Relationship between C-reactive protein and arterial stiffness in an asymptomatic population. *J Hum Hypertens.* 2005.
8. Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, Sabeti S, Amighi J, Nikowitsch R, Timmel E, Kickinger B, Minar C, Pones M, Lalouschek W, Rumpold H, Maurer G, Wagner O, Minar E. Inflammation and Carotid Artery--Risk for Atherosclerosis Study (ICARAS). *Circulation.* 2005;111:2203-2209.
9. Ziegler D. Type 2 diabetes as an inflammatory cardiovascular disorder. *Curr Mol Med.* 2005;5:309-322.
10. Yang F, Tan HM, Wang H. Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis. *Sheng Li Xue Bao.* 2005;57:103-114.
11. Fudal M, Wilczewski P. [Atherosclerosis and inflammation--role of chlamydia pneumoniae infection what do we know to date?]. *Wiad Lek.* 2004;57:151-155.
12. Gruntzig AR, Senning A, Siegenthaler WE. Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med.* 1979;301:61-68.
13. Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med.* 1987;316:701-706.
14. van der Hoeven BL, Pires NM, Warda HM, Oemrawsingh PV, van Vlijmen BJ, Quax PH, Schalij MJ, van der Wall EE, Jukema JW. Drug-eluting stents: results, promises and problems. *Int J Cardiol.* 2005;99:9-17.

15. Yock A, Isbill JM, King SB, III. Bare-metal stent outcomes in an unselected patient population. *Clin Cardiol.* 2006;29:352-356.
16. Babapulle MN, Joseph L, Belisle P, Brophy JM, Eisenberg MJ. A hierarchical Bayesian meta-analysis of randomised clinical trials of drug-eluting stents. *Lancet.* 2004;364:583-591.
17. Hoffmann R, Mintz GS, Dussailant GR, Popma JJ, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Griffin J, Leon MB. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation.* 1996;94:1247-1254.
18. Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, Virmani R. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation.* 1999;99:44-52.
19. Farb A, Weber DK, Kolodgie FD, Burke AP, Virmani R. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation.* 2002;105:2974-2980.
20. Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation.* 1998;98:224-233.
21. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:224-230.
22. Mintz GS, Popma JJ, Hong MK, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Leon MB. Intravascular ultrasound to discern device-specific effects and mechanisms of restenosis. *Am J Cardiol.* 1996;78:18-22.
23. Cirillo P, Golino P, Ragni M, Battaglia C, Pacifico F, Formisano S, Buono C, Condorelli M, Chiariello M. Activated platelets and leucocytes cooperatively stimulate smooth muscle cell proliferation and proto-oncogene expression via release of soluble growth factors. *Cardiovasc Res.* 1999;43:210-218.
24. Rectenwald JE, Moldawer LL, Huber TS, Seeger JM, Ozaki CK. Direct evidence for cytokine involvement in neointimal hyperplasia. *Circulation.* 2000;102:1697-1702.
25. Furukawa Y, Matsumori A, Ohashi N, Shioi T, Ono K, Harada A, Matsushima K, Sasayama S. Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemoattractant and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. *Circ Res.* 1999;84:306-314.
26. Ott I, Neumann FJ, Kenngott S, Gawaz M, Schomig A. Procoagulant inflammatory responses of monocytes after direct balloon angioplasty in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1998;82:938-942.
27. Dollery CM, Humphries SE, McClelland A, Latchman DS, McEwan JR. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 by use of an adenoviral vector inhibits smooth muscle cell migration and reduces neointimal hyperplasia in the rat model of vascular balloon injury. *Circulation.* 1999;99:3199-3205.

28. Southgate KM, Fisher M, Banning AP, Thurston VJ, Baker AH, Fabunmi RP, Groves PH, Davies M, Newby AC. Upregulation of basement membrane-degrading metalloproteinase secretion after balloon injury of pig carotid arteries. *Circ Res*. 1996;79:1177-1187.
29. Bauters C, de Groote P, Adamantidis M, Delcayre C, Hamon M, Lablanche JM, Bertrand ME, Dupuis B, Swynghedauw B. Proto-oncogene expression in rabbit aorta after wall injury. First marker of the cellular process leading to restenosis after angioplasty? *Eur Heart J*. 1992;13:556-559.
30. Moreno PR, Palacios IF, Leon MN, Rhodes J, Fuster V, Fallon JT. Histopathologic comparison of human coronary in-stent and post-balloon angioplasty restenotic tissue. *Am J Cardiol*. 1999;84:462-6, A9.
31. Bartorelli AL, Trabattoni D, Montorsi P, Fabbicchi F, Galli S, Ravagnani P, Grancini L, Cozzi S, Loaldi A. Aspirin alone antiplatelet regimen after intracoronary placement of the Carbostent: the ANTARES study. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2002;55:150-156.
32. Tomai F, Ghini AS, Ferri C, Desideri G, Versaci F, Gaspardone A, Altamura L, Magliano G, Crea F, Chiariello L. Effects of carbon-coated coronary stents on the markers of inflammation, thrombin generation and platelet and endothelial activation. *Ital Heart J*. 2003;4:23-28.
33. Korkmaz ME, Tayfun E, Muderrisoglu H, Yildirim A, Ozin B, Ulucam M, Turan M. Carbon coating of stents has no effect on inflammatory response to primary stent deployment. *Angiology*. 2002;53:563-568.
34. Haase J, Storger H, Hofmann M, Schwarz CE, Reinemer H, Schwarz F. Comparison of stainless steel stents coated with turbostratic carbon and uncoated stents for percutaneous coronary interventions. *J Invasive Cardiol*. 2003;15:562-565.
35. Gehman S. Increased risk of restenosis after placement of gold-coated stents. *Circulation*. 2001;104:E23.
36. vom DJ, Haager PK, Grube E, Gross M, Beythien C, Kromer EP, Cattelaens N, Hamm CW, Hoffmann R, Reineke T, Klues HG. Effects of gold coating of coronary stents on neointimal proliferation following stent implantation. *Am J Cardiol*. 2002;89:801-805.
37. Hausleiter J, Kastrati A, Mehilli J, Schühlen H, Pache J, Dotzer F, Glatthor C, Siebert S, Dirschinger J, Schomig A. A randomized trial comparing phosphorylcholine-coated stenting with balloon angioplasty as well as abciximab with placebo for restenosis reduction in small coronary arteries. *J Intern Med*. 2004;256:388-397.
38. Unverdorben M, Sattler K, Degenhardt R, Fries R, Abt B, Wagner E, Koehler H, Scholz M, Ibrahim H, Tews KH, Hennen B, Daemgen G, Berthold HK, Vallbracht C. Comparison of a silicon carbide coated stent versus a noncoated stent in humans: the Tenax- versus Nir-Stent Study (TENISS). *J Interv Cardiol*. 2003;16:325-333.
39. Lewis AL, Willis SL, Small SA, Hunt SR, O'byrne V, Stratford PW. Drug loading and elution from a phosphorylcholine polymer-coated coronary stent does not affect long-term stability of the coating in vivo. *Biomed Mater Eng*. 2004;14:355-370.

40. Lewis AL, Vick TA, Collias AC, Hughes LG, Palmer RR, Leppard SW, Furze JD, Taylor AS, Stratford PW. Phosphorylcholine-based polymer coatings for stent drug delivery. *J Mater Sci Mater Med*. 2001;12:865-870.
41. Grube E, Silber S, Hauptmann KE, Mueller R, Buellesfeld L, Gerckens U, Russell ME. TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions. *Circulation*. 2003;107:38-42.
42. Tanabe K, Serruys PW, Degertekin M, Guagliumi G, Grube E, Chan C, Munzel T, Belardi J, Ruzyllo W, Bilodeau L, Kelbaek H, Ormiston J, Dawkins K, Roy L, Strauss BH, Disco C, Koglin J, Russell ME, Colombo A. Chronic arterial responses to polymer-controlled paclitaxel-eluting stents: comparison with bare metal stents by serial intravascular ultrasound analyses: data from the randomized TAXUS-II trial. *Circulation*. 2004;109:196-200.
43. Tanabe K, Serruys PW, Grube E, Smits PC, Selbach G, van der Giessen WJ, Staberock M, de Feyter P, Muller R, Regar E, Degertekin M, Ligthart JM, Disco C, Backx B, Russell ME. TAXUS III Trial: in-stent restenosis treated with stent-based delivery of paclitaxel incorporated in a slow-release polymer formulation. *Circulation*. 2003;107:559-564.
44. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, Turco M, Caputo R, Bergin P, Greenberg J, Popma JJ, Russell ME. One-year clinical results with the slow-release, polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS stent: the TAXUS-IV trial. *Circulation*. 2004;109:1942-1947.
45. Stone GW, Ellis SG, O'Shaughnessy CD, Martin SL, Satler L, McGarry T, Turco MA, Kereiakes DJ, Kelley L, Popma JJ, Russell ME. Paclitaxel-eluting stents vs vascular brachytherapy for in-stent restenosis within bare-metal stents: the TAXUS V ISR randomized trial. *JAMA*. 2006;295:1253-1263.
46. Sousa JE, Sousa AG, Costa MA, Abizaid AC, Feres F. Use of rapamycin-impregnated stents in coronary arteries. *Transplant Proc*. 2003;35:165S-170S.
47. Holmes DR, Jr., Leon MB, Moses JW, Popma JJ, Cutlip D, Fitzgerald PJ, Brown C, Fischell T, Wong SC, Midei M, Snead D, Kuntz RE. Analysis of 1-year clinical outcomes in the SIRIUS trial: a randomized trial of a sirolimus-eluting stent versus a standard stent in patients at high risk for coronary restenosis. *Circulation*. 2004;109:634-640.
48. Kelbaek H, Thuesen L, Helqvist S, Klovgaard L, Jorgensen E, Aljabbari S, Saunamaki K, Krusell LR, Jensen GV, Botker HE, Lassen JF, Andersen HR, Thayssen P, Galloe A, van Weert A. The Stenting Coronary Arteries in Non-stress/benestent Disease (SCANDSTENT) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:449-455.
49. Windecker S, Remondino A, Eberli FR, Juni P, Raber L, Wenaweser P, Togni M, Billinger M, Tuller D, Seiler C, Roffi M, Corti R, Sutsch G, Maier W, Luscher T, Hess OM, Egger M, Meier B. Sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents for coronary revascularization. *N Engl J Med*. 2005;353:653-662.
50. Morice MC, Colombo A, Meier B, Serruys P, Tamburino C, Guagliumi G, Sousa E, Stoll HP. Sirolimus- vs paclitaxel-eluting stents in de novo coronary artery lesions: the REALITY trial: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006;295:895-904.

51. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975;28:721-726.
52. Napoli KL, Taylor PJ. From beach to bedside: history of the development of sirolimus. *Ther Drug Monit*. 2001;23:559-586.
53. Sehgal, S. N. Sirolimus: a new immunosuppressive agent: a historical perspective and immunosuppressive profile. Principles of drug development in transplantation and autoimmunity. 1996. Austin, TX, USA, Lieberman R.; Mukherjee A.

Ref Type: Generic

54. Kay JE, Kromwel L, Doe SE, Denyer M. Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin. *Immunology*. 1991;72:544-549.
55. Hatfield SM, Mynderse JS, Roehm NW. Rapamycin and FK506 differentially inhibit mast cell cytokine production and cytokine-induced proliferation and act as reciprocal antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;261:970-976.
56. Akselband Y, Harding MW, Nelson PA. Rapamycin inhibits spontaneous and fibroblast growth factor beta-stimulated proliferation of endothelial cells and fibroblasts. *Transplant Proc*. 1991;23:2833-2836.
57. Gregory CR, Pratt RE, Huie P, Shorthouse R, Dzau VJ, Billingham ME, Morris RE. Effects of treatment with cyclosporine, FK 506, rapamycin, mycophenolic acid, or deoxyspergualin on vascular muscle proliferation in vitro and in vivo. *Transplant Proc*. 1993;25:770-771.
58. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1995;76:412-417.
59. Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R, Pratt R, Morris RE. Effects of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. Inhibition of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor action and antagonism of rapamycin by FK506. *Transplantation*. 1995;59:390-395.
60. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Seay U, Zhang L, der Leyen HE, Morris RE, Dzau VJ. Cell cycle protein expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo is regulated through phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1152-1158.
61. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, Chesebro J, Fallon J, Fuster V, Marks A, Badimon JJ. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation*. 1999;99:2164-2170.
62. Luo Y, Marx SO, Kiyokawa H, Koff A, Massague J, Marks AR. Rapamycin resistance tied to defective regulation of p27Kip1. *Mol Cell Biol*. 1996;16:6744-6751.
63. Roque M, Reis ED, Cordon-Cardo C, Taubman MB, Fallon JT, Fuster V, Badimon JJ. Effect of p27 deficiency and rapamycin on intimal hyperplasia: in vivo and in vitro studies using a p27 knockout mouse model. *Lab Invest*. 2001;81:895-903.

64. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J Clin Invest.* 1996;98:2277-2283.
65. Sun J, Marx SO, Chen HJ, Poon M, Marks AR, Rabbani LE. Role for p27(Kip1) in Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *Circulation.* 2001;103:2967-2972.
66. Boehm M, Nabel EG. Cell cycle and cell migration: new pieces to the puzzle. *Circulation.* 2001;103:2879-2881.
67. Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* 2002;16:1472-1487.
68. Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene.* 2004;23:3151-3171.
69. Hilker M, Buerke M, Guckenbiehl M, Schwertz H, Buhler J, Moersig W, Hake U, Oelert H. Rapamycin reduces neointima formation during vascular injury. *Vasa.* 2003;32:10-13.
70. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.
71. Cole SP. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1986;17:259-263.
72. Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet.* 1999;21:20-24.
73. van der Poel HG, Hanrahan C, Zhong H, Simons JW. Rapamycin induces Smad activity in prostate cancer cell lines. *Urol Res.* 2003;30:380-386.
74. Berberian PA, Myers W, Tytell M, Challa V, Bond MG. Immunohistochemical localization of heat shock protein-70 in normal-appearing and atherosclerotic specimens of human arteries. *Am J Pathol.* 1990;136:71-80.
75. Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1547-1559.
76. Libby P, Hansson GK. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest.* 1991;64:5-15.
77. Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today.* 1995;16:27-33.
78. Xu Q, Hu Y, Kleindienst R, Wick G. Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1. *J Clin Invest.* 1997;100:1089-1097.
79. Madamanchi NR, Li S, Patterson C, Runge MS. Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:321-326.

80. Xu Q, Schett G, Seitz CS, Hu Y, Gupta RS, Wick G. Surface staining and cytotoxic activity of heat-shock protein 60 antibody in stressed aortic endothelial cells. *Circ Res*. 1994;75:1078-1085.
81. Ohtsuka K, Masuda A, Nakai A, Nagata K. A novel 40-kDa protein induced by heat shock and other stresses in mammalian and avian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;166:642-647.
82. Nguyen TQ, Jaramillo A, Thompson RW, Dintzis S, Oppat WF, Allen BT, Sicard GA, Mohanakumar T. Increased expression of HDJ-2 (hsp40) in carotid artery atherosclerosis: a novel heat shock protein associated with luminal stenosis and plaque ulceration. *J Vasc Surg*. 2001;33:1065-1071.
83. Fan CY, Ren HY, Lee P, Caplan AJ, Cyr DM. The type I Hsp40 zinc finger-like region is required for Hsp70 to capture non-native polypeptides from Ydj1. *J Biol Chem*. 2005;280:695-702.
84. Fan CY, Lee S, Cyr DM. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones*. 2003;8:309-316.
85. Fan CY, Lee S, Ren HY, Cyr DM. Exchangeable chaperone modules contribute to specification of type I and type II Hsp40 cellular function. *Mol Biol Cell*. 2004;15:761-773.
86. Hafizur RM, Yano M, Gotoh T, Mori M, Terada K. Modulation of chaperone activities of Hsp70 and Hsp70-2 by a mammalian DnaJ/Hsp40 homolog, DjA4. *J Biochem (Tokyo)*. 2004;135:193-200.
87. Yamane M, Hattori H, Sugito K, Hayashi Y, Tohnai I, Ueda M, Nishizawa K, Ohtsuka K. Cotranslocation and colocalization of hsp40 (DnaJ) with hsp70 (DnaK) in mammalian cells. *Cell Struct Funct*. 1995;20:157-166.
88. Minami Y, Hohfeld J, Ohtsuka K, Hartl FU. Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J Biol Chem*. 1996;271:19617-19624.
89. Ngosuwana J, Wang NM, Fung KL, Chirico WJ. Roles of cytosolic Hsp70 and Hsp40 molecular chaperones in post-translational translocation of presecretory proteins into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2003;278:7034-7042.
90. Nakai A, Satoh M, Hirayoshi K, Nagata K. Involvement of the stress protein HSP47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 1992;117:903-914.
91. Jabs A, Kramer S, Skowasch D, Welsch U, Kuhn A, Kandolf R, Luderitz B, Bauriedel G. [Neointimal hyperplasia by luminal cell recruitment and not by transmural migration. The role of Bcl-2 and HSP47 after balloon angioplasty]. *Z Kardiol*. 2002;91:626-636.
92. Rocnik E, Saward L, Pickering JG. HSP47 expression by smooth muscle cells is increased during arterial development and lesion formation and is inhibited by fibrillar collagen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:40-46.
93. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*. 1988;22:631-677.

94. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 1998;92:351-366.
95. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:670-684.
96. Xu Q, Schett G, Li C, Hu Y, Wick G. Mechanical stress-induced heat shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Rac and Ras small G proteins but not mitogen-activated protein kinases. *Circ Res*. 2000;86:1122-1128.
97. Zhu WM, Roma P, Pirillo A, Pellegatta F, Catapano AL. Oxidized LDL induce hsp70 expression in human smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 1995;372:1-5.
98. Johnson AD, Berberian PA, Tytell M, Bond MG. Differential distribution of 70-kD heat shock protein in atherosclerosis. Its potential role in arterial SMC survival. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:27-36.
99. George J, Greenberg S, Barshack I, Singh M, Pri-Chen S, Laniado S, Keren G. Accelerated intimal thickening in carotid arteries of balloon-injured rats after immunization against heat shock protein 70. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1564-1569.
100. Young DB. Heat-shock proteins: immunity and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 1992;4:396-400.
101. Mandal K, Jahangiri M, Xu Q. Autoimmunity to heat shock proteins in atherosclerosis. *Autoimmun Rev*. 2004;3:31-37.
102. Tsukahara F, Yoshioka T, Muraki T. Molecular and functional characterization of HSC54, a novel variant of human heat-shock cognate protein 70. *Mol Pharmacol*. 2000;58:1257-1263.
103. Kleindienst R, Xu Q, Willeit J, Waldenberger FR, Weimann S, Wick G. Immunology of atherosclerosis. Demonstration of heat shock protein 60 expression and T lymphocytes bearing alpha/beta or gamma/delta receptor in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1993;142:1927-1937.
104. Xu Q, Kleindienst R, Waitz W, Dietrich H, Wick G. Increased expression of heat shock protein 65 coincides with a population of infiltrating T lymphocytes in atherosclerotic lesions of rabbits specifically responding to heat shock protein 65. *J Clin Invest*. 1993;91:2693-2702.
105. Hammerer-Lercher A, Mair J, Bonatti J, Watzka SB, Puschendorf B, Dirnhofer S. Hypoxia induces heat shock protein expression in human coronary artery bypass grafts. *Cardiovasc Res*. 2001;50:115-124.
106. Kanwar RK, Kanwar JR, Wang D, Ormrod DJ, Krissansen GW. Temporal expression of heat shock proteins 60 and 70 at lesion-prone sites during atherogenesis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1991-1997.
107. Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet*. 1997;350:430-436.

108. Epstein SE. The multiple mechanisms by which infection may contribute to atherosclerosis development and course. *Circ Res.* 2002;90:2-4.
109. Nieto FJ. Infections and atherosclerosis: new clues from an old hypothesis? *Am J Epidemiol.* 1998;148:937-948.
110. Muhlestein JB. Bacterial infections and atherosclerosis. *J Investig Med.* 1998;46:396-402.
111. Shor A. Mechanism of Arterial Infection by Chlamydia pneumoniae. *Circulation.* 2001;104:E75.
112. Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation.* 1998;98:300-307.
113. Wiedermann CJ, Kiechl S, Dunzendorfer S, Schratzberger P, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J. Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck Study. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:1975-1981.
114. Seitz CS, Kleindienst R, Xu Q, Wick G. Coexpression of heat-shock protein 60 and intercellular-adhesion molecule-1 is related to increased adhesion of monocytes and T cells to aortic endothelium of rats in response to endotoxin. *Lab Invest.* 1996;74:241-252.
115. Xu Q, Schett G, Perschinka H, Mayr M, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J, Kiechl S, Wick G. Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation.* 2000;102:14-20.
116. Pockley AG, Wu R, Lemne C, Kiessling R, de Faire U, Frostegard J. Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension.* 2000;36:303-307.
117. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest.* 1999;103:571-577.
118. Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol.* 1999;162:3212-3219.
119. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med.* 2000;6:435-442.
120. Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:185-194.
121. Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol.* 2000;164:13-17.

122. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem.* 2002;277:15107-15112.
123. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem.* 2002;277:15028-15034.
124. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol.* 2000;164:558-561.
125. Bulut Y, Faure E, Thomas L, Karahashi H, Michelsen KS, Equils O, Morrison SG, Morrison RP, Arditi M. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J Immunol.* 2002;168:1435-1440.
126. Habich C, Baumgart K, Kolb H, Burkart V. The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J Immunol.* 2002;168:569-576.
127. Sasu S, LaVerda D, Qureshi N, Golenbock DT, Beasley D. Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circ Res.* 2001;89:244-250.
128. Zhang L, Pelech SL, Mayrand D, Grenier D, Heino J, Uitto VJ. Bacterial heat shock protein-60 increases epithelial cell proliferation through the ERK1/2 MAP kinases. *Exp Cell Res.* 2001;266:11-20.
129. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995;9:726-735.
130. Xu Q, Willeit J, Marosi M, Kleindienst R, Oberhollenzer F, Kiechl S, Stulnig T, Luef G, Wick G. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet.* 1993;341:255-259.
131. Huittinen T, Leinonen M, Tenkanen L, Manttari M, Virkkunen H, Pitkanen T, Wahlstrom E, Palosuo T, Manninen V, Saikku P. Autoimmunity to human heat shock protein 60, Chlamydia pneumoniae infection, and inflammation in predicting coronary risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:431-437.
132. Gruber R, Lederer S, Bechtel U, Lob S, Riethmuller G, Feucht HE. Increased antibody titers against mycobacterial heat-shock protein 65 in patients with vasculitis and arteriosclerosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996;110:95-98.
133. Hoppichler F, Lechleitner M, Traweger C, Schett G, Dzien A, Sturm W, Xu Q. Changes of serum antibodies to heat-shock protein 65 in coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 1996;126:333-338.
134. Frostegard J, Lemne C, Andersson B, Van der ZR, Kiessling R, de Faire U. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with borderline hypertension. *Hypertension.* 1997;29:40-44.

135. Mukherjee M, De Benedictis C, Jewitt D, Kakkar VV. Association of antibodies to heat-shock protein-65 with percutaneous transluminal coronary angioplasty and subsequent restenosis. *Thromb Haemost.* 1996;75:258-260.
136. Birnie DH, Holme ER, McKay IC, Hood S, McColl KE, Hillis WS. Association between antibodies to heat shock protein 65 and coronary atherosclerosis. Possible mechanism of action of Helicobacter pylori and other bacterial infections in increasing cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 1998;19:387-394.
137. Chan YC, Shukla N, Abdus-Samee M, Berwanger CS, Stanford J, Singh M, Mansfield AO, Stansby G. Anti-heat-shock protein 70 kDa antibodies in vascular patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1999;18:381-385.
138. Gromadzka G, Zielinska J, Ryglewicz D, Fiszer U, Czlonkowska A. Elevated levels of anti-heat shock protein antibodies in patients with cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis.* 2001;12:235-239.
139. Prohaszka Z, Duba J, Lakos G, Kiss E, Varga L, Janoskuti L, Csaszar A, Karadi I, Nagy K, Singh M, Romics L, Fust G. Antibodies against human heat-shock protein (hsp) 60 and mycobacterial hsp65 differ in their antigen specificity and complement-activating ability. *Int Immunol.* 1999;11:1363-1370.
140. Ciervo A, Visca P, Petrucca A, Biasucci LM, Maseri A, Cassone A. Antibodies to 60-kilodalton heat shock protein and outer membrane protein 2 of Chlamydia pneumoniae in patients with coronary heart disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9:66-74.
141. Prohaszka Z, Duba J, Horvath L, Csaszar A, Karadi I, Szebeni A, Singh M, Fekete B, Romics L, Fust G. Comparative study on antibodies to human and bacterial 60 kDa heat shock proteins in a large cohort of patients with coronary heart disease and healthy subjects. *Eur J Clin Invest.* 2001;31:285-292.
142. Mosorin M, Surcel HM, Laurila A, Lehtinen M, Karttunen R, Juvonen J, Paavonen J, Morrison RP, Saikku P, Juvonen T. Detection of Chlamydia pneumoniae-reactive T lymphocytes in human atherosclerotic plaques of carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1061-1067.
143. Young RA, Elliott TJ. Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell.* 1989;59:5-8.
144. Xu Q, Luef G, Weimann S, Gupta RS, Wolf H, Wick G. Staining of endothelial cells and macrophages in atherosclerotic lesions with human heat-shock protein-reactive antisera. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1763-1769.
145. Schett G, Xu Q, Amberger A, Van der ZR, Recheis H, Willeit J, Wick G. Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity. *J Clin Invest.* 1995;96:2569-2577.
146. Mayr M, Metzler B, Kiechl S, Willeit J, Schett G, Xu Q, Wick G. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of Escherichia coli and Chlamydia pneumoniae: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation.* 1999;99:1560-1566.

147. Xu Q, Dietrich H, Steiner HJ, Gown AM, Schoel B, Mikuz G, Kaufmann SH, Wick G. Induction of arteriosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:789-799.
148. George J, Shoenfeld Y, Afek A, Gilburd B, Keren P, Shaish A, Kopolovic J, Wick G, Harats D. Enhanced fatty streak formation in C57BL/6J mice by immunization with heat shock protein-65. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:505-510.
149. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1998-2003.
150. Schluesener HJ, Meyermann R. Immunolocalization of BMP-6, a novel TGF-beta-related cytokine, in normal and atherosclerotic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1995;113:153-156.

7 Abkürzungsverzeichnis

BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	base pairs (Basenpaare)
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Centers for Disease Control (USA)
cdk	cyclin dependent kinase
cdki	cyclin dependent kinase inhibitor
cDNA	copy DNA
CRP	C-reaktives Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylen-Diamino-Tetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERK	Extracellular Regulated Kinase
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
HeLa	Zelllinie, die auf einen malignen Tumor der Patientin Henrietta Lacks zurückgeht
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSP	Heat Shock Protein (Hitzeschockprotein)
IL	Interleukin
ISR	In-Stent-Restenose
IVUS	Intravaskulärer Ultraschall
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
MMP-12	Matrix-Metalloproteinase 12
NSTEMI	Non-ST-Elevation Myocardial Infarction
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sHSP	soluble Heat Shock Protein
TLR	Toll-like Receptor
TRIS	Kurzbezeichnung für Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USAN	United States Adopted Names
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells (vaskuläre glatte Muskelzellen)

8 Anhang

Anhang 1: Gene, die im Gene-Array bei maximaler Wachstumsstimulation für 24h in Anwesenheit von Rapamycin signifikant heraufreguliert (133) bzw. herunterreguliert (148) wurden. SLR = Signal Log Ratio, Av. = Average, Stdev. = Standardabweichung

Gen	SLR-Av.	SLR-Stdev.
G protein-coupled receptor	1,45	0,21
Chromosome 8 open reading frame 4 (C8ORF4)	1,45	0,34
Endothelial cell-specific molecule 1 (ESM1)	1,39	0,4
Interleukin 8 C-terminal variant (IL8)	1,39	0,37
Clone HRC00953	1,38	0,19
H1 histone family, member X (H1FX)	1,33	0,52
Interleukin 8 (IL8)	1,27	0,16
Parathyroid hormone-like hormone	1,24	0,17
Cyclin G2	1,23	0,29
Hyaluronan synthase 1 (HAS1)	1,22	0,22
Diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor) (DTR)	1,19	0,1
Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)	1,19	0,26
Interleukin 11 (IL11)	1,17	0,17
HMG box containing protein 1	1,17	0,1
Clone DKFZp564N1272	1,16	0,16
Transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	1,15	0,22
Interleukin 6 (interferon, beta 2) (IL6)	1,14	0,12
Transcription factor 8 (represses interleukin 2 expression) (TCF8)	1,13	0,23
Hypothetical protein DKFZp566J091	1,12	0,26
Prostate differentiation factor	1,11	0,22
GABA-A receptor-associated protein like 1 (GABARAPL1)	1,1	0,14
Parathyroid hormone-like hormone (PTH LH)	1,07	0,18
mRNA for DVS27-related protein	1,05	0,3
Human proteinase activated receptor-2	1,05	0,2
Follistatin (FST), transcript variant FST344	1,01	0,13
Zinc finger protein 277 (ZNF277)	0,99	0,2
Immediate early response 3 (IER3)	0,99	0,07
GABA-A receptor-associated protein	0,99	0,07
Human ovarian beta-A inhibin	0,98	0,15
Human BAC clone GS1-99H8	0,98	0,14
Jun B proto-oncogene (JUNB)	0,97	0,3
FLJ23067 fis, clone LNG04993	0,95	0,15
Nerve growth factor, beta polypeptide (NGFB)	0,93	0,12
Vascular endothelial growth factor	0,93	0,19
GRO1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha) (GRO1)	0,93	0,34
Heptacellular carcinoma novel gene-3 protein (LOC51339)	0,92	0,09
Inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide) (INHBA)	0,91	0,19
Matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase) (MMP12)	0,91	0,17
High-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 2	0,91	0,22
Human DNA sequence from clone RP1-19N1 on chromosome Xq21.33-22.3	0,89	0,21

FLJ13302 fis, clone OVARC1001357	0,89	0,14
Human tumor antigen (L6)	0,89	0,1
KIAA0203 gene product (KIAA0203)	0,89	0,2
Thiamine carrier 1 (TC1)	0,88	0,15
Insulin-like growth factor 1 receptor	0,88	0,22
Transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	0,87	0,07
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	0,86	0,19
Insulin-like growth factor 1 receptor	0,86	0,15
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative (BTG1)	0,85	0,16
Bone morphogenetic protein 6 (BMP6)	0,84	0,09
DNA-binding zinc finger(GBF), core promoter element binding protein	0,84	0,17
Leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor) (LIF)	0,83	0,16
cDNA FLJ11828 fis, clone HEMBA1006507, weakly similar to DIAPHANOUS PROTEIN HOMOLOG 2	0,82	0,2
Microvascular endothelial differentiation gene 1 (MDG1)	0,82	0,2
Hypothetical protein PRO0082 (PRO0082)	0,82	0,25
Human vascular permeability factor	0,81	0,19
Core promoter element binding protein	0,8	0,26
FLJ22296 fis, clone HRC04468	0,79	0,07
NADPH oxidase 4 (NOX4)	0,77	0,14
Cardiotrophin-like cytokine; neurotrophin-1B-cell stimulating factor-3 (CLC)	0,76	0,17
Novel MAFF (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene family, protein F) LIKE protein	0,75	0,12
hHDC for homolog of Drosophila headcase (LOC51696)	0,74	0,1
Clone MGC:2698, mRNA, complete cds	0,74	0,19
Vascular endothelial growth factor	0,73	0,19
CCAATenhancer binding protein (CEBP)	0,73	0,2
N-myc downstream regulated (NDRG1)	0,71	0,07
Bone morphogenetic protein 2 (BMP2)	0,71	0,22
Myosin X (MYO10)	0,7	0,11
KIAA0355 gene product (KIAA0355)	0,7	0,08
Cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1)	0,69	0,2
Retinoic acid induced 3 (RAI3)	0,69	0,13
v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2	0,69	0,11
Epithelial membrane protein 2 (EMP2)	0,69	0,08
RelA-associated inhibitor (RAI)	0,69	0,17
AA469071:ne17f11.s1 Homo sapiens cDNA	0,68	0,13
KIAA1100 protein (KIAA1100)	0,66	0,09
Friend of GATA2 (FOG2)	0,66	0,11
FLJ11946 fis, clone HEMBB1000709	0,66	0,08
mRNA for KIAA0640 protein	0,65	0,12
CHMP1.5 protein	0,64	0,22
Single-minded (Drosophila) homolog 2 (SIM2), transcript variant SIM2	0,63	0,12
Insulin receptor substrate 2	0,63	0,06
Latexin protein (LXN)	0,63	0,08
Activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67) (ATF4)	0,6	0,08
Beta-glucocorticoid receptor (clone OB10)	0,6	0,18
Transmembrane 4 superfamily member 1	0,6	0,16

CCAATenhancer binding protein (CEBP), delta (CEBPD)	0,6	0,2
Endothelin 1 (EDN1)	0,6	0,11
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434C1722 (from clone DKFZp434C1722)	0,59	0,15
Hypothetical protein MGC4175 (MGC4175)	0,58	0,2
Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 20 (SCYA20)	0,58	0,1
HRP-3	0,58	0,11
HP protein (HP)	0,57	0,07
Basic fibroblast growth factor (FGF)	0,57	0,15
Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit p110delta	0,57	0,05
PRKC, apoptosis, WT1, regulator	0,57	0,1
KIAA0620 protein	0,56	0,17
KIAA0965 protein	0,56	0,1
SWAP-70 protein	0,56	0,24
Clone 24760 mRNA sequence	0,56	0,13
JM5 protein, clone MGC:8542	0,55	0,11
Hypothetical protein FLJ10055 (FLJ10055)	0,54	0,13
Kruppel-like factor (LOC51713)	0,54	0,06
KIAA0247 gene product (KIAA0247)	0,54	0,14
Leucine zipper transcription factor-like 1 (LZTFL1)	0,54	0,1
Similar to decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system), clone MGC:5192	0,54	0,09
Hypothetical protein FLJ20073 (FLJ20073)	0,53	0,12
KIAA0742 protein	0,52	0,08
AI806628:wf14g08.x1 Homo sapiens cDNA	0,52	0,18
Glucocorticoid receptor alpha-2	0,51	0,11
BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1 (BACH1)	0,51	0,08
Niemann-Pick disease, type C1 (NPC1)	0,5	0,17
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	0,49	0,08
E3 ubiquitin ligase SMURF2	0,49	0,18
PPAR(gamma) angiopoietin related protein (PGAR)	0,49	0,1
Insulin receptor substrate-2 (IRS2)	0,48	0,1
Hypothetical protein AF140225 (AF140225)	0,48	0,2
Novel human gene mapping to chromosome 13, similar to rat RhoGAP	0,47	0,1
TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal) (TEK)	0,47	0,14
Ubiquitin-like 3	0,47	0,06
Conserved gene amplified in osteosarcoma (OS4)	0,46	0,07
MAX binding protein (MNT)	0,44	0,11
KIAA0203 gene product	0,43	0,14
Interleukin 4 receptor (IL4R)	0,42	0,08
Cyclin G1	0,42	0,12
CGI-127 protein (LOC51646)	0,41	0,05
KIAA0462 protein	0,41	0,07
Presenilin 1 (Alzheimer disease 3) (PSEN1)	0,4	0,06
Nuclear antigen Sp100 (SP100)	0,39	0,04
Postsynaptic protein CRIPT (CRIPT)	0,38	0,04
Hypothetical protein FLJ20154	0,37	0,06
Stromal antigen 2	0,33	0,11

Serumglucocorticoid regulated kinase (SGK)	0,32	0,07
Intersectin short form mRNA	-0,31	0,04
Uncharacterized hypothalamus protein HT010	-0,4	0,09
Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5	-0,41	0,1
KIAA0671 gene product (KIAA0671)	-0,41	0,07
hqp0256 protein (LOC51202)	-0,42	0,09
5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase	-0,42	0,11
Zinc finger protein 148 (pHZ-52)	-0,42	0,07
Serologically defined colon cancer antigen 16	-0,43	0,09
Calciumcalmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II gamma (CAMK2G)	-0,43	0,12
GrpE-like protein cochaperone	-0,46	0,13
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	-0,47	0,1
Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)	-0,47	0,1
Topoisomerase (DNA) I	-0,48	0,09
Eukaryotic translation initiation factor 5	-0,48	0,11
ATPase, Class V, type 10D	-0,49	0,07
Hypothetical protein FLJ10871 (FLJ10871)	-0,49	0,11
Multifunctional polypeptide similar to SAICAR synthetase and AIR carboxylase	-0,49	0,1
KIAA0923 protein	-0,49	0,11
GTP-binding protein (NGB)	-0,5	0,07
Heat shock 70kD protein 8	-0,5	0,15
Interferon, gamma-inducible protein 16 (IFI16)	-0,51	0,1
GT198, complete ORF	-0,51	0,06
Mitochondrial ribosomal protein S12 (MRPS12)	-0,51	0,13
Heat shock 60kD protein 1 (chaperonin)	-0,51	0,13
Heat shock 40kD protein 1 (HSPF1)	-0,51	0,03
SerArg-related nuclear matrix protein (plenty of prolines 101-like) (SRM160)	-0,51	0,11
W22690:71G4 Homo sapiens cDNA	-0,52	0,11
M-phase phosphoprotein 6 (MPHOSPH6)	-0,52	0,17
Sorting nexin 2 (SNX2)	-0,52	0,1
KIAA0671 gene product	-0,53	0,09
DKFZP564M182 protein	-0,53	0,07
Acidic 82 kDa protein	-0,54	0,05
KIAA0971 protein	-0,54	0,14
Solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1 (SLC20A1)	-0,55	0,05
Hypothetical protein FLJ13390 similar to PAF53 (FLJ13390)	-0,55	0,1
cDNA DKFZp586F1323 (from clone DKFZp586F1323)	-0,55	0,11
Nucleoporin 98kD (NUP98)	-0,55	0,11
Eukaryotic translation initiation factor 5	-0,55	0,11
DEADH (Asp-Glu-Ala-AspHis) box polypeptide 21 (DDX21)	-0,56	0,1
Ribonuclease P, 40kD subunit (RPP40)	-0,56	0,06
Rab6 GTPase activating protein (GAP and centrosome-associated) (GAPCENA)	-0,56	0,16
Eukaryotic translation initiation factor 5 (EIF5)	-0,57	0,2
General transcription factor IIH, polypeptide 1 (62kD subunit)	-0,57	0,09
Six transmembrane epithelial antigen of the prostate (STEAP)	-0,58	0,07

Mitogen-activated protein kinase kinase 3	-0,58	0,09
DKFZP564O092 protein	-0,58	0,16
Hypothetical protein FLJ20533 (FLJ20533)	-0,58	0,09
CGI-133 protein (LOC51022)	-0,59	0,13
Origin recognition complex, subunit 5 (yeast homolog)-like (ORC5L)	-0,59	0,07
Heat shock protein, DNAJ-like 2 (HSJ2); DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	-0,59	0,09
Putative human HLA class II associated protein I	-0,6	0,19
Hypothetical protein FLJ10509 (FLJ10509)	-0,6	0,08
PRP4STKWD splicing factor	-0,6	0,14
KIAA1199 protein	-0,6	0,1
STRIN protein (STRIN)	-0,6	0,06
Hypothetical protein FLJ10377 (FLJ10377)	-0,6	0,09
Interferon, gamma-inducible protein 16	-0,6	0,11
Tumorous imaginal discs (Drosophila) homolog (TID1); DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3	-0,6	0,04
Oxytocin receptor (OXTR)	-0,61	0,18
Ras homolog gene family, member I	-0,62	0,17
Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (GCLC)	-0,62	0,18
KIAA0923 protein	-0,62	0,18
Eukaryotic translation initiation factor 5	-0,62	0,15
Nucleolar cysteine-rich protein	-0,63	0,07
Hypothetical protein FLJ10774; KIAA1709 protein (FLJ10774)	-0,63	0,19
Hypothetical protein, clone MGC:1067	-0,63	0,16
Pinin, desmosome associated protein	-0,63	0,06
Nucleolar phosphoprotein p130	-0,63	0,07
Weakly similar to T15138 hypothetical protein T28F2.4 - Caenorhabditis elegans C.elegans	-0,63	0,17
Aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	-0,63	0,17
Hypothetical protein FLJ10773 (FLJ10773)	-0,63	0,11
kiaa-iso protein (LOC51188)	-0,63	0,16
CGI-48 protein (LOC51096)	-0,64	0,09
cDNA DKFZp434E248 (from clone DKFZp434E248)	-0,64	0,23
CGI-147 protein (LOC51651)	-0,64	0,14
Hypothetical protein FLJ12820 (FLJ12820)	-0,64	0,16
KIAA1105 protein	-0,64	0,13
60S acidic ribosomal protein PO (LOC51154)	-0,64	0,14
RNA polymerase I subunit (RPA40)	-0,64	0,18
Hypothetical protein FLJ20220 (FLJ20220)	-0,65	0,1
CDC28 protein kinase 2 (CKS2)	-0,65	0,22
Hypothetical protein MGC5347	-0,65	0,11
Uridine monophosphate synthetase (orotate phosphoribosyl transferase and orotidine-5-decarboxylase)	-0,66	0,05
Hypothetical protein FLJ20516 (FLJ20516)	-0,66	0,2
AI869988:wl63e02.x1 Homo sapiens cDNA	-0,66	0,14
Dyskeratosis congenita 1, dyskerin	-0,66	0,1
Peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	-0,68	0,11
Hypothetical protein MGC5487 (MGC5487)	-0,68	0,16
Hypothetical protein FLJ10881 (FLJ10881)	-0,68	0,08

DKFZP566A0946 protein	-0,68	0,13
KIAA0020 gene product (KIAA0020)	-0,69	0,14
Hypothetical protein FLJ10968	-0,7	0,16
Nucleolar protein (KKED repeat)	-0,7	0,2
Hypothetical protein (HSPC031)	-0,71	0,24
KIAA0671 gene product	-0,71	0,11
KIAA0446 protein	-0,72	0,13
RNA binding protein	-0,72	0,09
Adrenomedullin (ADM)	-0,72	0,12
Splicing factor, arginineserine-rich 7 (35kD) (SFRS7)	-0,73	0,13
Nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 1	-0,73	0,12
Hypothetical protein MGC2477	-0,73	0,09
Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11	-0,74	0,16
Pinin, desmosome associated protein	-0,74	0,18
BH-protocadherin (brain-heart) (PCDH7)	-0,74	0,13
Hypothetical protein FLJ12671 (FLJ12671)	-0,75	0,18
KIAA0179 protein	-0,75	0,14
Heat shock protein hsp70-related protein (LOC51182)	-0,75	0,14
Fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated) (FABP5)	-0,76	0,14
Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2 (beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase) (GCNT1)	-0,77	0,08
Activator of S phase kinase (ASK)	-0,77	0,2
Nucleoporin 98 (NUP98)	-0,77	0,09
Embryonic ectoderm development protein	-0,77	0,14
Hypothetical protein (FLJ20485)	-0,78	0,1
Similar to hypothetical protein FLJ12484, clone MGC:3008	-0,79	0,08
RNA polymerase I subunit hRPA39	-0,8	0,15
Hypothetical protein FLJ13340 (FLJ13340)	-0,8	0,28
Apolipoprotein AI regulatory protein (ARP-1)	-0,81	0,14
Putative lymphocyte G0G1 switch gene (G0S2)	-0,81	0,11
Disrupter of silencing 10, clone MGC:11290	-0,81	0,17
FLJ21737 fis, clone COLF3396	-0,82	0,12
Dyskeratosis congenita 1, dyskerin (DKC1)	-0,84	0,08
Periodic tryptophan protein 2 (PWP2)	-0,84	0,28
Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region, gene 1	-0,85	0,12
Hypothetical protein (FLJ20500)	-0,85	0,24
Protein predicted by clone 23733 (HSU79274)	-0,86	0,09
Putative 28 kDa protein (LOC56902)	-0,87	0,13
S-adenosylmethionine decarboxylase 1 (AMD1)	-0,88	0,15
S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	-0,88	0,2
Adipose differentiation-related protein	-0,89	0,23
S-adenosylmethionine decarboxylase 1	-0,9	0,07
Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	-0,91	0,16
Hypothetical protein FLJ10563 (FLJ10563)	-0,92	0,23
Dyskeratosis congenita 1, dyskerin	-0,92	0,08
KIAA0061 protein	-0,94	0,09
Splicing factor, arginineserine-rich 7 (35kD)	-0,94	0,11
Glutamine PRPP amidotransferase (GPAT)	-0,96	0,15

ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 1	-0,99	0,42
Nucleolar protein (KKED repeat) (NOP56)	-1	0,1
TALE homeobox protein Meis2e (LOC56908)	-1,04	0,16
Phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase	-1,05	0,22
HDCMC28P protein (HDCMC28P)	-1,08	0,18
Hypothetical protein (HSPC111)	-1,1	0,07
Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	-1,12	0,24
Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)	-1,13	0,3
Ephrin-B2	-1,15	0,29
Hypothetical protein FLJ20624 (FLJ20624)	-1,17	0,25
Hexokinase 2	-1,22	0,1
Hypothetical protein	-1,25	0,13
Sin3-associated polypeptide, 30kD (SAP30)	-1,43	0,2

Anhang 2: Gene, die im Gene-Array bei kontinuierlicher Wachstumsstimulation in Anwesenheit von Rapamycin signifikant heraufreguliert (32) bzw. herunterreguliert (28) wurden. SLR = Signal Log Ratio, Av. = Average, Stdev. = Standardabweichung

Gen	SLR-Av.	SLR-Stdev.
Insulin-like growth factor 1 (IGF1)	2,04	0,43
Inhibitor of DNA binding 1 (Id-1H)	1,53	0,11
Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)	1,47	0,18
Human BAC clone (GS1-99H8)	1,45	0,08
Chromosome 8 open reading frame (C8ORF4)	1,33	0,44
Cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1)	1,24	0,13
Bone morphogenetic protein 6 (BMP6)	1,17	0,12
Orphan seven-transmembrane receptor, chemokine related (VSHK1)	1,16	0,3
Inhibitor of DNA binding 3 (ID3)	1,15	0,11
Beta-A inhibin (INHBA)	1,04	0,18
ATPase, Na ⁺ K ⁺ transporting	0,98	0,07
Interleukin 8 (IL8)	0,95	0,16
Protein kinase-related oncogene (PIM1)	0,95	0,29
Type-2 phosphatidic acid phosphatase alpha-2 (PAP2-a2)	0,87	0,14
Hypothetical protein FLJ10970 (FLJ10970)	0,85	0,22
GABA-A receptor-associated protein like 1 (GABARAPL1)	0,81	0,2
Proenkephalin (PENK)	0,81	0,16
Glioma tumor suppressor candidate region gene 2 (GLTSCR2)	0,77	0,15
Hypothetical protein PP1044 (PP1044)	0,75	0,15
RNA polymerase I 16 kDa subunit (LOC51082)	0,72	0,14
Calponin 1, basic, smooth muscle (CNN1)	0,71	0,13
Casein kinase 2, alpha prime polypeptide (CSNK2A2)	0,71	0,17
KIAA0355 gene product (KIAA0355)	0,66	0,11
mRNA for phosphatidic acid phosphatase 2a, complete cds	0,65	0,15
cDNA: FLJ23067 fis, clone LNG04993	0,64	0,07
Similar to keratin 7, clone MGC:3625	0,63	0,22
Integrin beta-like 1 (ITGBL1)	0,62	0,11
Down syndrome critical region gene 5 (DSCR5b)	0,54	0,12

Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (ACTA2)	0,49	0,18
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 (gamma, 40kD) (EIF3S3)	0,48	0,13
KIAA0564 protein	0,46	0,14
Ribosomal protein L14	0,44	0,24
Thy-1 cell surface antigen	-0,55	0,11
Adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	-0,55	0,08
Four and a half LIM domains 1 protein isoform C (FHL1)	-0,56	0,14
Human tryptophanyl-tRNA synthetase (WRS)	-0,57	0,19
Adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	-0,59	0,17
DKFZP566A0946 protein	-0,67	0,11
Tenascin XB (TNXB)	-0,68	0,07
Solute carrier family 1 (neuronal epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1 (SLC1A1)	-0,73	0,31
Regulator of G-protein signalling 4	-0,75	0,1
37 kDa leucine-rich repeat (LRR) protein (P37NB)	-0,77	0,19
Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5)	-0,78	0,2
Integrin alpha-7	-0,78	0,16
Clone 24747 mRNA sequence	-0,84	0,17
Heparin-binding growth factor receptor (HBGF-R-alpha-a3)	-0,91	0,3
WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1)	-0,93	0,26
Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5)	-0,94	0,23
Alpha-1 (VI) collagen	-0,95	0,28
Aspartate beta-hydroxylase (ASPH)	-1,05	0,63
Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 (SERPINB2)	-1,06	0,09
DKFZP564A122 protein	-1,08	0,39
mRNA for paxillin beta	-1,11	0,24
Regulator of G-protein signalling 4 (RGS4)	-1,15	0,75
Keratin 19 (KRT19)	-1,17	0,16
Plasminogen activator, tissue (PLAT)	-1,18	0,1
Interleukin 1 receptor-like 1 (IL1RL1)	-1,2	0,11
Lysyl oxidase-like 2	-1,24	0,43
Truncated tenascin XB (TNXB)	-1,26	0,74
Keratin 14 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara, Koebner)	-1,44	0,15

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Reimer Riessen danke ich für die hervorragende und freundliche Betreuung während der Anfertigung dieser Dissertation, und für die Bereitstellung seines Labors.

Frau Heike Runge danke ich herzlich für die Einarbeitung in die Methoden, für die Unterstützung mit Rat und Tat und ihre immer freundliche Art.

Dr. Michael Bonin danke ich für die hervorragende Arbeit bei der Anfertigung der Gene Arrays.

Frau PD Dr. Dorothea Siegel-Axel danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Dr. Roman Laszlo und Dr. Frank Wessel danke ich für die Bereitstellung ihres Büros und der Software zur densitometrischen Auswertung von Western Blots.

Vor allem danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für den Rückhalt und die Unterstützung, die mir dieses Studium ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliches:

Name: Claudius Fischer

Geboren: 18. Januar 1980 in Sindelfingen

Eltern: Dr. Bernhard Fischer, Physiker
Lieselotte Fischer, geb. Pleger, Hausfrau

Geschwister: Antonia Sprengel, geb. Fischer, Betriebswirtin

Schulen:

1986 – 1990 Mörike Grundschule Leonberg

1990 – 1999 Johannes-Kepler-Gymnasium Leonberg

1993 Jane Lathrop Stanford Middle School,
Palo Alto, Kalifornien, USA

Juni 1999 Allgemeine Hochschulreife

Studium und beruflicher Werdegang:

09/1999 – 09/2000 Zivildienst beim DRK Böblingen

10/2000 – 01/2001 Fachhochschule Reutlingen, Studiengang
„International Business“ (abgebrochen)

02/2001 – 06/2001 Bürotätigkeit (Projektassistent) bei der EvoBus
GmbH (DaimlerChrysler), Stuttgart-Möhringen

07/2001 – 07/2007 Rettungssanitäter beim DRK Böblingen

10/2001 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

05.09.2003 Ärztliche Vorprüfung bestanden

02/2007 – 01/2008 Praktisches Jahr in San Francisco, USA und am
Universitätsklinikum Tübingen

08.05.2008 Ärztliche Prüfung bestanden