

Aus dem CharitéCentrum 13
für Innere Medizin mit Kardiologie, Gastroenterologie, Nephrologie
Charité, Universitätsmedizin
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Rainer Dietz

Habilitationsschrift

Rolle von nukleären Rezeptoren als potentiell Target zur Therapie und Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Florian Blaschke
geboren in Hof

eingereicht: Januar 2010

Dekanin: Professor Dr. med. A. Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Laufs

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Gerd Schmitz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Mechanismen der Restenose.....	6
1.1.1 “Response to Injury” nach perkutaner transluminaler Angioplastie	6
1.1.2 Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und Zellzyklusregulation	7
1.1.3 Integrine und Migration glatter Gefäßmuskelzellen.....	8
1.2 Mechanismen der Arteriosklerose	9
1.3 Nukleäre Rezeptoren.....	9
1.3.1 Liver X Rezeptoren.....	10
2. Zielsetzung	12
3. Relevante Originalarbeiten	
3.1 Mechanismen der Angiotensin II vermittelten Migration glatter Gefäßmuskelzellen (Originalarbeit 1) “Angiotensin-II augmented migration of VSMCs towards PDGF-BB involves Pyk2 and ERK1/2 activation”	14
3.2 Hypoxie vermittelte Signaltransduktionswege in glatten Gefäßmuskelzellen (Originalarbeit 2) “Hypoxia activates β 1-integrin via ERK 1/2 and p38 MAP kinase in human vascular smooth muscle cells”	15
3.3 Mechanismen der CRP induzierten Apoptose humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Originalarbeit 3) “C-Reactive Protein Induces Apoptosis in Human Coronary Vascular Smooth Muscle Cells” ..	16
3.4 Rolle des Liver X Rezeptors in der Zellzyklusregulation glatter Gefäßmuskelzellen und der Neointimaentwicklung <i>in vivo</i> (Originalarbeit 4) “Liver X Receptor Agonists Suppress Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Inhibit Neointima Formation in Balloon-Injured Rat Carotid Arteries”	17
3.5 Neuer Mechanismus inflammatorischer Genregulation durch Liver X Rezeptoren (Originalarbeit 5) A Nuclear Receptor Corepressor-Dependent Pathway Mediates Suppression of Cytokine- Induced C-Reactive Protein Gene Expression by Liver X Receptor”	18
4. Diskussion	19
5. Zusammenfassung	23
6. Literaturverzeichnis	25
7. Danksagung	30
8. Erklärung	31

Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	ATP-binding cassette, subfamily A member 1
ABCG1	ATP-binding cassette subfamily G member 1
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
AP-1	Activator Protein-1
BMS	Bare-metal Stent
bp	Basenpaare
CDK	Cyclin-abhängige Proteinkinasen
ChIP Assays	Chromatin Immunopräzipitations Assays
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRP	C-reaktives Protein
DES	Drug-eluting Stent
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1 und 2
FAK	Focal adhesion kinase
FAS	Fatty acid synthase
GADD153	Growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153)
GLUT4	Glukosetransporter 4
hs-CRP	High-sensitivity C-reaktives Protein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
KHK	Koronare Herzerkrankung
LPS	Lipopolysaccharid
LXR	Liver X Rezeptor
LXRE	LXR Response Elemente
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MCM6	Minichromosome Maintenance Protein 6
NCoR	Nuclear receptor corepressor
NF- κ B	Nuclear factor κ B
PCI	Percutane Coronare Intervention

PDGF-BB	Platelet-derived growth factor BB
PES	Paclitaxel-eluting Stent
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
proMMP-1	Pro-Matrix Metalloproteinase-1
Pyk2	Prolin-reiche Tyrosinkinase
RAS	Renin-Angiotensin-System
Rb	Retinoblastomprotein
RXR	Retinoid X Rezeptor
SCD	Stearoyl-CoA Desaturase 1
SES	Sirolimus-eluting Stent
siRNA	Small interfering RNA
SREBP-1	Sterol regulatory element-binding protein 1
Skp2	S-Phase Kinase-associated Protein 2
TIMP-1	Tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase-1
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VSMCs	Glatte Gefäßmuskelzellen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems stellen in der westlichen Welt die häufigste Todesursache dar.¹ Innerhalb dieser Gruppe ist die koronare Herzkrankheit (KHK) eine der häufigsten Todesursachen. Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass inflammatorische Prozesse eine zentrale Rolle für die Entwicklung arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen und deren Folgeerkrankungen wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall spielen.^{2, 3}

Arteriosklerotische und restenotische Gefäßwandveränderungen sind Folge unterschiedlicher Interaktionen verschiedener Zelltypen und nachfolgender Aktivierung der entsprechenden Signaltransduktionskaskaden. Dabei spielt die Aktivierung, Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs) sowohl bei der Entwicklung arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen als auch bei der Restenosierung des Gefäßlumens nach Percutaner Coronarer Intervention (PCI) eine Schlüsselrolle.⁴

Arteriosklerose ist eine chronische, durch Inflammation gekennzeichnete Erkrankung multifaktorieller Genese, bei der es durch Einlagerungen von Lipiden in die Gefäßwand und Einwanderung glatter Muskelzellen aus der Media zur Ausbildung arteriosklerotischer Plaques und Entstehung von Gefäßverschlüssen kommt. Dagegen kommt es nach einer PCI innerhalb weniger Tage zu einer Migration glatter Gefäßmuskelzellen aus der Media in die Intima mit anschließender Proliferation und Produktion extrazellulärer Matrixproteine.

Trotz großer Anstrengungen und verschiedener Strategien ist es bisher nicht gelungen, eine effektive pharmakologische Therapie zur Verhinderung der "Response-to-Injury" Reaktion, die zur Restenosierung führt, zu etablieren. Initial kam es nach einer PCI bei 30-60% der Patienten zu einer Restenosierung, wobei 20% dieser Patienten eine erneute Intervention oder ein operatives Bypass Verfahren benötigten.⁵ Die Entwicklung intrakoronarer Stents stellte die erste effektive Strategie zur Reduzierung der Restenose Rate dar. Die Entwicklung von Drug-eluting Stents (DES) stellte einen weiteren vielversprechenden Ansatz zur Reduzierung der In-stent Restenose dar. In der Tat konnte durch DES wie dem Sirolimus-eluting Stent (SES) und dem Paclitaxel-eluting Stent (PES) die angiographische und klinische Restenose in einem breiten Patientenkollektiv reduziert werden. Patienten mit Diabetes mellitus, Restenose nach Platzierung eines DES und erfolgter Revaskularisierung mittels Bypass Chirurgie stellen jedoch weiterhin ein problematisches Patientenkollektiv dar.^{6, 7} Darüber hinaus zeigte sich bei DES im Vergleich zu Bare-metal Stents (BMS) keine Verbesserung der Langzeitprognose.^{8, 9} Darüber hinaus wurde der Einsatz von DES mit einer erhöhten Rate von Stent-Thrombosen in Verbindung gebracht.^{10, 11}

Basierend auf dem Konzept der inflammatorischen Genese arteriosklerotischer Gefäßläsionen wurden eine Reihe inflammatorischer Biomarker als Prediktor für das Risiko künftiger kardiovaskulärer Ereignisse identifiziert. Dabei zeigte sich, dass high-sensitivity C-reaktives Protein (hs-CRP), ein Serummarker für systemische Entzündungen, bei Gesunden ein unabhängiger Prediktor für kardiovaskuläre Ereignisse wie Myokardinfarkt, Schlaganfall und plötzlichem Herztod ist.^{12, 13} Darüber legen eine Reihe von Studien nahe, dass C-reaktives Protein (CRP) neben der prädiktiven Bedeutung für kardiovaskuläre Ereignisse direkt an der Entstehung und Progression von arteriosklerotischen Läsionen beteiligt ist. So konnte gezeigt werden, dass CRP die Expression eine

Reihe von Genen wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) induziert, die eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Adhäsion von Monozyten spielen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass CRP die Aufnahme von LDL durch Makrophagen fördert und das Komplementsystem aktiviert.^{14, 15}

Die Sauerstoffversorgung der Zellen in der Gefäßwand erfolgt überwiegend durch Diffusion aus dem Gefäßlumen und den Gefäßen der Adventitia. Dabei ist die Media aufgrund ihrer Lokalisation besonders anfällig für Schwankungen des Sauerstoffangebotes. Bereits 1944 formulierte Hueper die Theorie der Arterioskleroseentstehung durch Anoxämie.¹⁶ Demnach führen arteriosklerotische Plaques durch die damit verbundene Dickenzunahme der Gefäßwand zu einer Minderversorgung der Zellen mit Sauerstoff und somit zu einer weiteren Progression arteriosklerotischer Läsionen. Diese Theorie wird durch im Tiermodell erhobene Daten gestützt, die zeigen, dass eine durch einen Verschluss der Vasa vasorum erzeugte lokale Ischämie zu einer Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und daraus resultierender Hyperplasie der Intima führt.¹⁷ Darüber hinaus konnten Bjornheden et al. hypoxische Areale *in vivo* innerhalb arteriosklerotischer Plaques und in der Media immunhistochemisch nachweisen.¹⁸

Metabolische Störungen wie Diabetes oder Dyslipidämie begünstigen als klassische Risikofaktoren der KHK die Entstehung und Progression arteriosklerotischer Gefäßwandläsionen. Darüber hinaus konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Diabetes mellitus mit einer höheren Restenoserate nach Koronarinterventionen assoziiert ist.¹⁹ Untersuchungen in den letzten Jahren zu antidiabetisch wirkenden Substanzen wie Thiazolidindionen und Metformin haben einen positive Effekt dieser Substanzen auf die Restenoserate gezeigt.²⁰ Thiazolidindionen haben neben ihrem metabolischen Effekt auch gefäßprotective Wirkung durch Aktivierung des Peroxisome Proliferator-Activated Receptors gamma (PPAR γ). PPAR γ gehört wie der Liver X Rezeptor (LXR) zu den Ligand-aktivierten Transkriptionsfaktoren aus der Familie der nukleären Steroidrezeptoren. Diese stellen aufgrund ihres Genregulationsmechanismus ein vielversprechendes Target zur Prävention und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen dar.

Eine pharmakologische Therapie mit dem Ziel Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen zu blockieren und inflammatorische Genexpression zu inhibieren stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie und Prävention arteriosklerotischer und restenotischer Gefäßwandveränderungen dar. Zur Entwicklung neuer Therapiestrategien ist ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen erforderlich.

1.1 Mechanismen der Restenose

1.1.1 "Response-to-Injury" nach perkutaner transluminaler Angioplastie

Die Pathophysiologie der Restenose, nach angiographischen Kriterien definiert als Verengung des Gefäßdurchmessers von mehr als 50% sechs Monate nach der durchgeführten Intervention,²¹ ist komplex und beruht auf unterschiedlichen Mechanismen. Zum einen kann es nach der Dilatation durch elastische Rückstellkräfte (Recoil) im Gefäß zu einer raschen Wiederverengung des Gefäßlumens kommen.²² Darüber hinaus trägt negatives Remodelling zur Restenose nach PCI bei. Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass Inflammation eine wichtige Rolle bei der Neointimaformation spielt. Die "Response-to-Injury" Reaktion nach einer Ballonangioplastie ist

charakterisiert durch eine Abfolge von Inflammation, Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und Remodelling der extrazellulären Matrix, die zu Neointima Formation und Restenose führt. Das durch endovaskuläre Interventionen bedingte Trauma induziert eine lokale inflammatorische Reaktion, die durch nachfolgende Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und Synthese von extrazellulärer Matrix zur Neointimaformation führt. In der Frühphase des inflammatorischen Prozesses nach Gefäßverletzung spielen sowohl aktivierte Leukozyten und Neutrophile als auch Monozyten und Thrombozyten eine wichtige Rolle.²³ Initial bildet sich eine Lage von Thrombozyten auf dem verletzten und de-endothelialisierten Gefäß, gefolgt von der Adhäsion und Transmigration von Leukozyten durch die an der Oberfläche adhärenen Thrombozyten.²⁴

1.1.2 Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und Zellzyklusregulation

Die Kontrolle des Zellzyklus spielt für normales Zellwachstum und geregelte Differenzierungsprozesse eine zentrale Rolle. Der Zellzyklus setzt sich aus vier definierten, voneinander abgrenzbaren Phasen zusammen, der G1-(Gap), S-(Synthese), G2-, und der M-(Mitose) Phase. Zellen treten in Anwesenheit mitogener Faktoren vom Ruhestadium G0 in die G1-Phase ein, in der die Zellzyklusproteinsynthese und Aktivierung beginnt. In der späten G1-Phase erreichen die Zellen den sogenannten Restriktionspunkt. Danach sind die Zellen unabhängig von extrazellulären Wachstumsfaktoren und vollenden das Zellteilungsprogramm. Die Replikation der DNA erfolgt in der nachfolgenden S-Phase. Nach erfolgter DNA Synthese und anschließender Progression durch die G2 Phase, gelangt die Zelle in die M-Phase, an deren Ende die Zellteilung steht. Der Übertritt in die verschiedenen Zellzyklusphasen wird durch die Expression und/oder Aktivierung spezifischer Kinasen, den sogenannten Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CDK) reguliert. Diese bilden Holoenzyme mit ihren regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen.^{25, 26} Für die G1-Phase ist die Expression von Typ D-Cyclinen charakteristisch, von denen drei Subtypen (D1-D3) existieren. Die D-Typ Cycline bilden Komplexe mit CDK4 und CDK6. Cyclin E akkumuliert in der späten G1-Phase und bildet einen Komplex mit CDK2.

Die enzymatische Aktivität von Cyclin/CDK Komplexen wird durch CDK Inhibitoren (CKIs) reguliert.²⁷ Diese werden bezüglich der Substratspezifität in zwei Familien unterteilt, der INK 4-Familie, die p15^{Ink4A}, p16^{Ink4B}, p18^{Ink4C} und p19^{Ink4D} umfasst und die Proteine der Cip/Kip-Familie mit p27^{Kip1}, p21^{Cip1} und p57^{Kip2}. Mitglieder der INK 4 Familie hemmen spezifisch Cyclin D-CDK 4/6 Komplexe, während Mitglieder der Cip/Kip Familie verschiedene Cyclin/CDK Komplexe inaktivieren.

Das p27^{Kip1}-kodierende Gen kommt ubiquitär in allen Zelltypen vor. In ruhenden oder kontaktinhibierten Zellen ist der Gehalt an p27^{Kip1} maximal. Nach mitogener Stimulation und nachfolgender Zellzyklusprogression von der G1- in die S-Phase fällt die Konzentration von p27^{Kip1} ab. Beim Abbau von p27^{Kip1} spielt das Ubiquitin-Proteasomen System eine zentrale Rolle.^{28, 29}

Für die Progression der G1- in die S-Phase ist die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb) durch aktivierte Cyclin/CDK Komplexe essentiell.³⁰ In ruhenden Zellen liegt Rb in einem hypophosphorylierten Zustand vor, der die Bindung an Mitglieder der E2F Familie von Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Die Phosphorylierung von Rb in der späten G1-Phase des Zellzyklus induziert eine Konformationsänderung, die zu einer Freisetzung des für die Zellzyklusprogression und DNA Synthese nötigen Transkriptionsfaktors E2F führt.³¹

Die PCI-induzierte mechanische Gefäßverletzung und die dadurch ausgelöste “Response-to-Injury” führt zu einem Eintritt der Zellen aus dem Ruhestadium G0 in die G1-Phase. Die dadurch ausgelöste lokale Stimulation der Zellproliferation ist die wesentliche Grundlage des Restenoseprozesses. Somit stellt der Zellzyklus einen vielversprechenden Angriffspunkt in der Behandlung der In-Stent Restenose dar.

1.1.3 Integrine und Migration glatter Gefäßmuskelzellen

Unter Migration versteht man die Wanderung von Zellen infolge von Chemotaxis, der gerichteten Bewegung entlang eines chemischen Gradienten. Die Migration glatter Gefäßmuskelzellen von der Media in die Intima nimmt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Arteriosklerose und Restenose ein. Dabei spielen β_1 -Integrine und β_3 -Integrine eine zentrale Rolle.^{32, 33} Integrine sind Zelloberflächenrezeptoren, die aus zwei nicht kovalent gebundenen transmembranen Glykoproteinen, der α - und β - Untereinheit bestehen.³⁴ Jede dieser Untereinheiten besteht aus einer extrazellulären Domäne, einem transmembranen Abschnitt sowie einer zytoplasmatischen Domäne. Bisher sind 18 verschiedene α -Untereinheiten und 8 verschiedene β -Untereinheiten beschrieben, die insgesamt 24 verschiedene Integrinrezeptoren bilden. Die unterschiedlichen Kombinationen der Untereinheiten bestimmen die Substratspezifität der Integrine.³⁵ Integrine spielen als Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle bei der Bindung der Zelle an die extrazelluläre Matrix. Darüber hinaus sind Integrine an der Signaltransduktion beteiligt. Bindung von Substraten an die extrazelluläre Domäne führt zur Aktivierung zahlreicher Signaltransduktionskaskaden und nachfolgenden Änderungen der Zellmorphologie, verschiedener Zellfunktionen wie Migration und Proliferation und der Apoptose (“outside-in-signaling”).^{36, 37} Da die zytoplasmatischen Domänen der Integrine keine intrinsische Kinase Aktivität besitzen, sind sie für die intrazelluläre Signalweiterleitung auf nachgeschaltete Moleküle mit Phosphorylierungspotential wie FAK (focal adhesion kinase), talin, paxillin oder ILK angewiesen.³⁸ Der Aktivitätszustand der Integrinrezeptoren kann auch durch das sogenannte “inside-out-signaling” beeinflusst werden.^{36, 37} Durch Bindung von Liganden an Nicht-Integrin Rezeptoren werden intrazelluläre Signalwege aktiviert, die über eine Wechselwirkung mit der zytoplasmatische Domäne eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne induzieren und so zu einer Aktivierung der Integrine führen. Die genauen Mechanismen sind allerdings noch nicht bekannt.

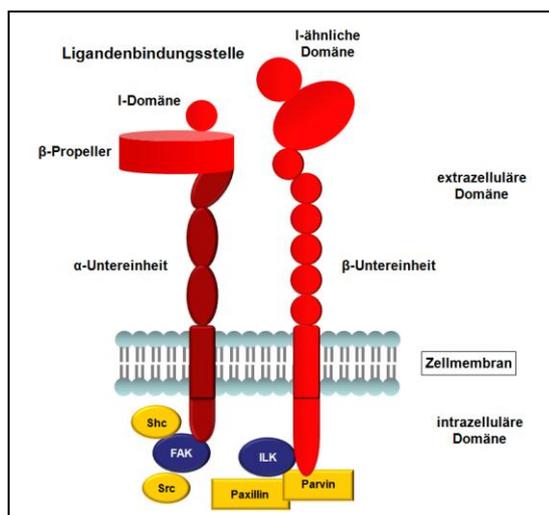


Figure 1: Schematische Darstellung eines Integrin Rezeptors

1.2 Mechanismen der Arteriosklerose

Arteriosklerose ist eine multifaktorielle chronisch-inflammatorische Erkrankung, an deren Pathogenese eine Reihe unterschiedlicher Zelltypen wie Makrophagen, T-Lymphozyten, Thrombozyten, Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen beteiligt sind.^{39, 40} Arteriosklerotische Läsionen lassen sich morphologisch in verschiedene Schweregrade einteilen. Nach einer initialen Schädigung des Endothels durch mechanische, entzündliche oder immunologische Reize kommt es zu einer Adhäsion von Monozyten mit nachfolgender Transmigration in die subendotheliale Intima.⁴¹ Dort kommt es zu einer Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen, welche durch Aufnahme von modifiziertem und oxidiertem Low Density Lipoprotein (LDL) sogenannte Schaumzellen bilden.^{42, 43} Diese Schaumzellen bilden zusammen mit extrazellulären Matrixproteinen den Hauptbestandteil der frühen arteriosklerotischen Läsion. Im weiteren Verlauf bilden sich durch Einwanderung glatter Gefäßmuskelzellen Atherome, die durch eine fibröse Kappe gegen das Gefäßlumen abgegrenzt sind. Im fortgeschrittenen Stadium bildet sich im Zentrum ein Kern aus nekrotischem Gewebe.

Das Konzept der Plaqueruptur mit Freilegung von subintimalem thrombogenem Gewebe und daraus resultierender Thrombusbildung und Okklusion des entsprechenden Gefäßabschnittes wurde 1926 erstmals von Benson postuliert.⁴⁴ Initial wurde angenommen, dass ein Myokardinfarkt aus einem thrombotischen Verschluss einer hochgradig stenosierten Koronarstenose resultiert. Später konnte allerdings gezeigt werden, dass in der überwiegenden Anzahl Koronarstenosen unter 50% für Plaqueruptur und nachfolgender koronare Thrombusbildung verantwortlich sind.⁴⁵ Der häufigste Mechanismus der Plaqueruptur ist ein Einreißen der fibrösen Kappe an der dünnsten Stelle. Lokale Entzündungsreaktionen in den arteriosklerotischen Plaques führen durch Infiltration aktivierter Makrophagen und T-Lymphozyten und Sezernierung matrixabbauender Proteine zu einer Schwächung der fibrösen Kappe und erhöhen das Risiko einer Plaqueruptur. So konnte mittels intravaskulärem Ultraschall gezeigt werden, dass die Serumspiegel von hs-CRP, proMMP-1 (pro-Matrix Metalloproteinase-1) und TIMP-1 (tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase-1) mit instabilen und rupturierten Plaques korreliert sind.⁴⁶

Vielversprechende Therapiestrategien zur Plaquestabilisierung umfassen anti-inflammatorische und anti-thrombotische Behandlungskonzepte.

1.3 Nukleäre Rezeptoren

Die Superfamilie der nukleären Rezeptoren spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Entwicklung, Reproduktion, Homöostase, Inflammation, dem Immunsystem und metabolischen Prozessen.^{47, 48} Nukleäre Rezeptoren sind Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch Ligandenbindung reguliert wird. Dabei werden drei Klassen von nukleären Rezeptoren unterschieden. Die erste Gruppe umfasst die klassischen, Liganden aktivierten Rezeptoren, die sich typischerweise im Zytoplasma befinden. Bindung von Liganden induziert eine Aktivierung und Translokation der Rezeptoren in den Zellkern mit nachfolgender Transkription der entsprechenden Zielgene. Die zweite Gruppe der nukleären Rezeptoren, genannt "Orphan Receptors", umfasst eine Vielzahl von Rezeptoren, für die Liganden entweder nicht bekannt sind oder nicht benötigt werden. Die dritte Gruppe von nukleären Rezeptoren, die unter anderem PPARs und LXR beinhaltet, bildet obligate Heterodimere mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR). Diese Heterodimere können die Expression von

Genen in einer Signal- und Gen spezifischen Weise sowohl induzieren als auch inhibieren. Bei fehlendem Ligand binden die RXR Heterodimere an spezifische Response Elemente (Erkennungssequenzen) in der Promoter Region ihrer Target Gene und inhibieren Gen Transkription durch Interaktion mit Co-Repressoren, Histon Deacetylasen und Chromatin modifizierenden Faktoren ("Active Repression").⁴⁹ Liganden Bindung induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, den Austausch von Co-Repressoren gegen Co-Aktivatoren, und nachfolgende Induktion entsprechender Target Gene ("Ligand Dependent Transactivation"). Beim Übergang von "Active Repression" zur "Ligand Dependent Transactivation" spielt das Ubiquitin-Proteasomen-System eine wichtige Rolle, da es den intrazellulären Proteinabbau des Co-Repressor Komplexes bewerkstelligt.⁵⁰ Darüber hinaus können nukleäre Rezeptoren Genexpression inhibieren, indem sie in einer ligandenabhängigen Weise um transkriptionelle Co-Aktivatoren konkurrieren und die Aktivität anderer Signal-abhängiger Transkriptionsfaktoren wie Nuclear Factor κ B (NF- κ B) und des Activator Proteins-1 (AP-1) antagonisieren (Figure 2).

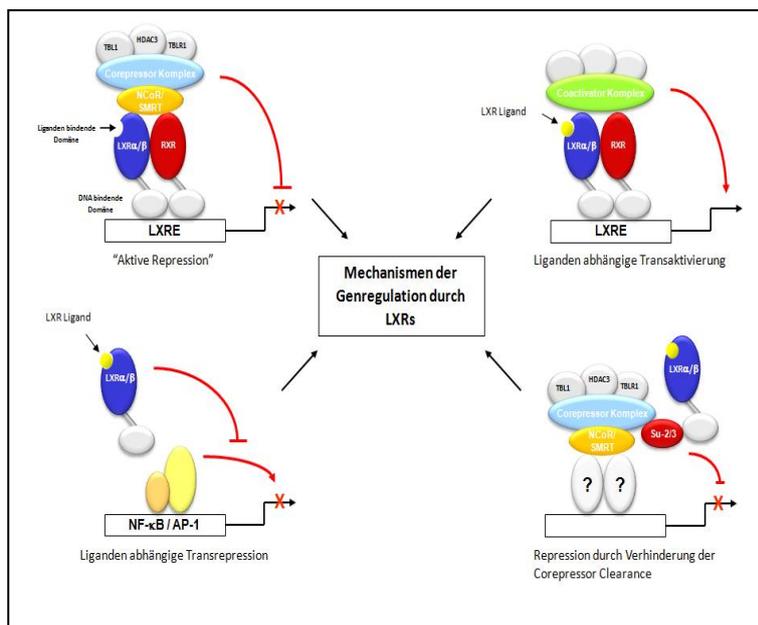


Figure 2: Mechanismen der Genregulation durch LXR

3.1.1 Liver X Rezeptoren

LXR α und LXR β wurden unabhängig voneinander zwischen 1994 und 1995 erstmalig beschrieben.⁵¹
⁵² Bisher wurden die beiden Isoformen LXR α (NR1H3) und LXR β (NR1H2) identifiziert. LXR α weist hohe Expressionslevel in der Leber auf und wird in geringerem Maße im Darm, Fettgewebe, Lunge und den Nebennieren exprimiert, wohingegen LXR β ubiquitär exprimiert wird.⁵³ Trotz der Kodierung durch unterschiedliche Gene zeigt sich bei LXR α und LXR β ein hoher Grad an Homologie innerhalb der für die Ligandenbindung zuständigen Domäne. Trotz funktioneller Überschneidungen und Aktivierung beider Isoformen durch die gleichen endogenen Liganden existieren für LXR α und LXR β eine Reihe unterschiedlicher Zielgene.⁵⁴ LXR α und LXR β binden als Heterodimer mit RXR an spezifische Sequenzen in der Promoterregion ihrer Zielgene, den sogenannten LXR Response Elementen (LXREs).⁵⁵ Oxidierte Cholesterinderivate wie 22(R)-Hydroxycholesterol, 24(S)-

Hydroxycholesterol, 27-Hydroxycholesterol, 24(S)-Epoxycholesterol, 25-Epoxycholesterol und Desmosterol sind natürliche Liganden für LXR α und LXR β .⁵⁶⁻⁵⁸ Darüber hinaus wurden synthetische LXR Liganden wie T0901317 (T1317) und GW3965 entwickelt, die sowohl LXR α als auch LXR β aktivieren.⁵⁹

Vorangegangene Studien haben LXRs als wichtige Regulatoren des reversen Cholesteroltransports, des Fett- und des Glukose Metabolismus identifiziert.⁶⁰ Aktivierung von LXRs induziert die Expression von Mitgliedern der ABC Transporter Familie (adenosine triphosphate-binding cassette), wie zum Beispiel ABCA1 (ATP-binding cassette, subfamily A member 1) oder ABCG1 (ATP-binding cassette, subfamily G member 1), die für den Cholesterol-Efflux aus Makrophagen verantwortlich sind.⁶¹ Einige der ersten Untersuchungen haben LXR α als Schlüsselregulator der hepatischen Lipogenese identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass LXR Liganden die Expression von SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein 1c), einem zentralen Regulator der hepatischen Lipogenese, induzieren und die Fatty Acid Synthase (FAS), Acetyl-CoA Carboxylase (ACC), und Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD) hochregulieren.⁶² Synthetische LXR Agonisten reduzieren die Glukoneogenese in der Leber durch Inhibierung der Carboxykinase und Glucose-6 Phosphatase.⁶³ Darüber hinaus wurde im weißen Fettgewebe der Insulin-abhängige Glukose Transporter (GLUT4) als LXR Target identifiziert.⁶⁴

LXR Rezeptoren spielen eine zentrale Rolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse. So konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von LXR durch Liganden in Makrophagen die Transkription inflammatorischer Gene wie zum Beispiel iNOS (inducible nitric oxide synthase), COX-2 (Cyclooxygenase 2), oder MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) inhibiert.⁶⁵ Dabei besitzen beide Isoformen anti-inflammatorische Eigenschaften, da der Effekt von LXR Liganden auf die inflammatorische Genexpression in LXR α ^{-/-} und LXR β ^{-/-} Makrophagen, nicht jedoch in LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} Makrophagen beobachtet wurde.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass synthetische LXR Liganden die Entwicklung von Gefäßläsionen in zur Arteriosklerose neigenden Apo E- und LDL-Rezeptor-defizienten (Apo E^{-/-}, LDLR^{-/-}) Mäusen inhibieren und zu einer Regression von bestehenden arteriosklerotischen Läsionen führen.⁶⁶⁻⁶⁸ Im Gegensatz dazu zeigte sich bei LDLR^{-/-} und Apo E^{-/-} Mäusen nach Durchführung einer Knochenmarkstransplantation mit LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} Mäusen als Spender eine deutliche Zunahme der arteriosklerotischen Läsionen, was die essentielle Rolle von LXR im Cholesterin-Efflux aus Makrophagen weiter unterstreicht.⁶⁹

2. Zielsetzung

Lokale inflammatorische Prozesse und nachfolgende Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen sind für die häufig nach Ballonangioplastie auftretende Komplikation der Neointimabildung und daraus resultierender Lumenreduktion von entscheidender Bedeutung.

Eine pharmakologische Intervention mit dem Ziel einer Inhibierung der Proliferation, Migration und inflammatorischen Genexpression glatter Gefäßmuskelzellen stellt einen sinnvollen therapeutischen Ansatz zur Prävention und Therapie arteriosklerotischer und restenotischer Gefäßwandveränderungen dar. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Mechanismen und Signaltransduktionskaskaden der Regulation von Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen untersucht. Dabei wurde insbesondere die Rolle des nukleären Rezeptors LXR als Regulator von Zellwachstum und inflammatorischer Genexpression untersucht. Desweiteren wurden die Effekte von CRP auf glatte Gefäßmuskelzellen *in vitro* und *in vivo* analysiert.

Im Einzelnen wurden untersucht:

- der Einfluss von Angiotensin II auf die PDGF-induzierte Signaltransduktion und Zellfunktionen in glatten Gefäßmuskelzellen (Originalarbeit 1, 3.1)
- der Einfluss von Hypoxie auf Signaltransduktion und Zellfunktionen in glatten Gefäßmuskelzellen (Originalarbeit 2, 3.2)
- der Effekt von CRP auf Genexpression und Zellviabilität glatter Gefäßmuskelzellen (Originalarbeit 3, 3.3)
- die Funktion von LXR in Zellzyklusregulation glatter Gefäßmuskelzellen *in vitro* und der Neointimaformation *in vivo* (Originalarbeit 4, 3.4)
- Mechanismen der inflammatorischen Genregulation durch LXR (Originalarbeit 5, 3.5)

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Zellzyklusregulation und der inflammatorischen Genexpression in glatten Gefäßmuskelzellen beizutragen. Dies schließt insbesondere die Rolle des nukleären Rezeptors LXR als potentiell pharmakologisches Target zur Therapie und Prävention von arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen und Restenose nach PCI ein.

3. Relevante Originalarbeiten

3.1 Florian Blaschke, Philipp Stawowy, Kai Kappert, Stephan Goetze, Ulrich Kintscher, Brigitte Wollert-Wulf, Eckart Fleck, Kristof Graf (2002): Angiotensin-II augmented migration of VSMCs towards PDGF-BB involves Pyk2 and ERK1/2 activation (2002). *Basic Res Cardiol* 97(4): 334-342.

3.2 Florian Blaschke, Philipp Stawowy, Stephan Goetze, Oliver Hintz, Michael Gräfe, Ulrich Kintscher, Eckart Fleck, Kristof Graf. Hypoxia activates β 1-integrin via ERK 1 /2 and p38 MAP kinase in human vascular smooth muscle cells (2002). *Biochem Biophys Res Commun* 30;296(4):890-6.

3.3 Florian Blaschke, Dennis Bruemmer, Fen Yin, Yasunori Takata, Wei Wang, Michael C. Fishbein, Takafumi Okura, Jitsuo Higaki, Kristof Graf, Eckart Fleck, Willa A. Hsueh, Ronald E. Law. C-Reactive Protein Induces Apoptosis in Human Coronary Vascular Smooth Muscle Cell (2004). *Circulation*;110:579-587.

3.4 Florian Blaschke, Olli Leppanen, Yasunori Takata, Evren Caglayan, Joey Liu, Michael C. Fishbein, Kai Kappert, Keichi L. Nakayama, Alan R. Collins, Eckart Fleck, Willa A. Hsueh, Ronald E. Law, Dennis Bruemmer. Liver X Receptor Agonists Suppress Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Inhibit Neointima Formation in Balloon-Injured Rat Carotid Arteries (2004). *Circ Res*;95:e110-e123.

3.5 Florian Blaschke, Yasunori Takata, Evren Caglayan, Alan Collins, Peter Tontonoz, Willa A. Hsueh, Rajendra K. Tangirala. A Nuclear Receptor Corepressor-Dependent Pathway Mediates Suppression of Cytokine-Induced C-Reactive Protein Gene Expression by Liver X Receptor (2006). *Circ Res*;99:e88-e99.

3.1 Mechanismen der Angiotensin II vermittelten Migration glatter Gefäßmuskelzellen (Originalarbeit 1)

“Angiotensin-II augmented migration of VSMCs towards PDGF-BB involves Pyk2 and ERK1/2 activation”

Florian Blaschke, Philipp Stawowy, Kai Kappert, Stephan Goetze, Ulrich Kintscher, Brigitte Wollert-Wulf, Eckart Fleck, Kristof Graf

Basic Research of Cardiology 2002;97(4): 334-342

Die Entstehung der Arteriosklerose wird durch eine Vielzahl von pro- und anti-arteriosklerotischen Faktoren reguliert. Das vasoaktive Peptidhormon Angiotensin II stellt dabei einen zentralen pro-arteriosklerotischen Wachstumsfaktor dar. Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs) spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Arteriosklerose und Restenose nach Ballonangioplastie. Voraussetzung für Zellbewegung ist die kontinuierliche Umstrukturierung des Zytoskeletts. Dies beinhaltet die Phosphorylierung Zytoskelett-assoziiierter Tyrosinkinasen, wie zum Beispiel der Fokalen Adhäsionskinase FAK und der Prolin-reichen Tyrosinkinase Pyk2.

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Angiotensin II auf die PDGF-BB (platelet-derived growth factor BB) gerichtete Migration von VSMCs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Langzeitstimulation (48 Stunden) mit Angiotensin II zu einem signifikanten und konzentrationsabhängigen Anstieg der Zellmigration führt. Die Expression von für Zellmigration wichtigen Integrinen wie β_3 - und β_5 -Integrine war dabei unverändert. Vielmehr zeigte sich, dass eine Langzeitstimulation mit Angiotensin II zu einem Anstieg der Proteinexpression von Pyk2 und FAK (focal adhesion kinase) und zu einer verstärkten Phosphorylierung von Pyk2 und der Mitogen-aktivierten Proteinkinase ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1 und 2) führt. Weiter wurde eine Translokation von Pyk2 von der Plasmamembran ins Zytosol und eine perinukleäre Anreicherung von ERK1/2 MAPK nachgewiesen.

Diese Daten zeigen, dass Änderungen im Phosphorylierungsstatus von Pyk2 und ERK1/2 MAPK und ihrer zellulären Lokalisation eine zentrale Rolle für die Chemotaxis glatter Gefäßmuskelzellen nach Angiotensin II Stimulation spielen. Vor dem Hintergrund der Bedeutung von Zellmigration in der Pathogenese von Arteriosklerose und Restenose bieten diese Daten einen möglichen pharmakologischen Ansatz zur Therapie und Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen.

3.2 Hypoxie vermittelte Signaltransduktionswege in glatten Gefäßmuskelzellen (Originalarbeit 2)

“Hypoxia activates β 1-integrin via ERK 1/2 and p38 MAP kinase in human vascular smooth muscle cells”

Florian Blaschke, Philipp Stawowy, Stephan Goetze, Oliver Hintz, Michael Graefe, Ulrich Kintscher, Eckart Fleck, Kristof Graf

Biochemical and Biophysical Research Communications 2002;296: 890-896

Hypoxie spielt eine maßgebliche Rolle beim Prozess des vaskulären Remodelling, das allgemein die Veränderung des Gefäßumfangs über einen bestimmten Zeitraum beschreibt. Die Fähigkeit glatter Gefäßmuskelzellen an extrazelluläre Matrixproteine zu adhären ist eine Grundvoraussetzung für deren Proliferation und Migration. Die Kommunikation der VSMCs mit der extrazellulären Umgebung wird durch eine Gruppe heterodimerer, transmembranärer Glykoproteine vermittelt, den sogenannten Integrinen, die aus einer α - und einer β -Einheit bestehen.

In dieser Arbeit wurde der *in vitro* Einfluss von Hypoxie auf die Adhäsion humaner koronarer VSMCs an extrazelluläre Matrixproteine untersucht. Dabei zeigte sich unter Hypoxie ein signifikanter Anstieg der Adhäsion auf Kollagen I und Fibronectin. Dabei spielte die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2 (ERK1/2 MAPK) und der p38 MAPK eine entscheidende Rolle, da der Effekt von Hypoxie auf die Zelladhäsion durch den pharmakologischen ERK1/2 MAPK Inhibitor PD98059 und den p38 MAPK Inhibitor SB203580 blockiert wurde. Die Adhäsion glatter VSMCs an die extrazellulären Matrixproteine Kollagen I und Fibronectin wird vor allem über β ₁-Integrin Rezeptoren vermittelt. So zeigte sich, dass eine Blockade des β ₁ Integrin Rezeptors mittels eines spezifischen Antikörpers (P5D2) unter Normoxie und Hypoxie zu einer vergleichbaren Inhibierung der Adhäsion führt. Allerdings waren die mRNA und Protein Expression des β ₁-Integrin Rezeptors unter Hypoxie unverändert. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass Hypoxie durch Konformationsänderung der β ₁ Untereinheit zu einer Aktivierung des β ₁-Integrins führt.

Diese Daten zeigen, dass Hypoxie via Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktionskaskade ERK1/2 MAPK und p38 MAPK und Aktivierung des β ₁-Integrins zu einer verstärkten Adhäsion humaner koronarer VSMCs an extrazelluläre Matrixproteine führt. Dadurch konnte erstmals gezeigt werden, dass Hypoxie Zell-Matrixinteraktionen moduliert und so zur Progression arteriosklerotischer und restenotischer Gefäßläsionen beitragen kann.

3.3 Mechanismen der CRP induzierten Apoptose humane glatter Gefäßmuskelzellen (Originalarbeit 3)

“C-Reactive Protein Induces Apoptosis in Human Coronary Vascular Smooth Muscle Cells”

Florian Blaschke, Dennis Bruemmer, Fen Yin, Yasunori Takata, Wei Wang, Michael C. Fishbein, Takafumi Okura, Jitsuo Higaki, Kristof Graf, Eckart Fleck, Willa A. Hsueh, Ronald E. Law

Circulation 2004;110: 579-587

Neuere Studien haben gezeigt, dass CRP nicht nur einen unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt, sondern eine aktive Rolle in der Entstehung und Progression arteriosklerotischer Gefäßläsionen spielt. Während einige wissenschaftliche Studien den Effekt von CRP auf Endothelzellen und Makrophagen untersucht haben, waren die Effekte von CRP auf glatte Gefäßmuskelzellen bis dahin unbekannt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CRP Caspase-vermittelte Apoptose in humanen koronaren VSMCs induziert. Mittels DNA Mikroarray Analyse konnte GADD153 (growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153) als CRP reguliertes Gen identifiziert werden. Stimulation humaner koronarer VSMCs mit CRP führte zu einer zeit- und dosisabhängigen Induktion der GADD153 mRNA Expression. Dabei zeigte sich, dass die CRP vermittelte Regulation der GADD153 mRNA Expression posttranskriptionell durch mRNA Stabilisierung erfolgt. Durch Verwendung von spezifisch gegen GADD153 gerichteter siRNA (small interfering RNA) konnte gezeigt werden, dass CRP induzierte Apoptose durch GADD153 vermittelt wird. Immunhistochemische Analysen von arteriosklerotischen Läsionen in humanen Koronargefäßen zeigten eine Kollokalisierung von GADD153 und apoptischen glatten Gefäßmuskelzellen. Dies weist auf eine funktionelle Rolle von GADD153 in der CRP-induzierten Apoptose *in vivo* hin.

Diese Daten demonstrieren, dass GADD153 eine CRP-reguliertes Gen in humanen koronaren VSMCs darstellt und eine kausale Rolle in der CRP-induzierten Apoptose spielt. Diese Daten zeigen, dass eine pharmakologische Therapie mit dem Ziel, die CRP Expression oder dessen Wirkung zu blockieren, einen vielversprechenden potentiellen Therapieansatz zur Prävention und Therapie arteriosklerotischer Gefäßveränderungen darstellen könnte.

3.4 Rolle des Liver X Rezeptors in der Zellzyklusregulation glatter Gefäßmuskelzellen und der Neointimaentwicklung *in vivo* (Originalarbeit 3)

“Liver X Receptor Agonists Suppress Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Inhibit Neointima Formation in Balloon-Injured Rat Carotid Arteries”

Florian Blaschke, Olli Leppanen, Yasunori Takata, Evren Caglayan, Joey Liu, Michael C. Fishbein, Kai Kappert, Keiichi I. Nakayama, Alan R. Collins, Eckart Fleck, Willa A. Hsueh, Ronald E. Law, Dennis Brummer

Circulation Research, 2004;95: e110-e123

Zahlreiche wissenschaftliche Publikationen haben gezeigt, dass Liver X Rezeptoren (LXR α and LXR β) wichtige Regulatoren des Cholesterin Stoffwechsels in der Leber und in Makrophagen sind. Darüber hinaus spielen LXRs eine wichtige Rolle in der Regulation inflammatorischer Genexpression in Makrophagen. Die Expression von LXRs und deren funktionelle Bedeutung in humanen koronaren glatten Gefäßmuskelzellen wurde jedoch bis dahin nicht untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung humaner koronarer VSMCs mit synthetischen LXR Liganden die PDGF-BB induzierte Zellproliferation und Zellzyklusprogression *in vitro* signifikant inhibiert. Der PDGF-BB induzierte Abbau des Zellzyklusinhibitors p27^{Kip1} wurde durch LXR Liganden konzentrationsabhängig inhibiert. Weiter zeigte sich eine dosisabhängige Inhibierung von Cyclin D1, Cyclin A und von MCM6 (Minichromosome Maintenance Protein 6). Der stabilisierende Effekt von LXR Liganden auf p27^{Kip1} wurde über eine Inhibierung der Skp2 (S-Phase Kinase-associated Protein 2) Expression vermittelt, einem essentiellen Bestandteil der SCF^{Skp2/Cks1}-Ubiquitin-Ligase, die für den proteasomalen Abbau des Zellzyklusinhibitors p27^{Kip1} verantwortlich ist. Entsprechend den *in vitro* Daten zeigte sich im Tiermodell eine signifikante Inhibierung der Neointima Formation nach Ballonverletzung der Arteria carotis in der mit LXR Liganden behandelten Gruppe.

Diese Daten zeigen erstmalig, dass eine Aktivierung von LXR durch synthetische Liganden Proliferation und Zellzyklusprogression glatter Gefäßmuskelzellen *in vitro* inhibiert und *in vivo* die Neointimabildung nach Ballonverletzung signifikant reduziert. Die bisher unbekannte Rolle von LXRs in der Zellzyklusregulation stellt eine vielversprechende neue Therapiestrategie zur Behandlung gefäßproliferativer Erkrankungen dar.

3.5. Neuer Mechanismus inflammatorischer Genregulation durch Liver X Rezeptoren (Originalarbeit 5)

“A Nuclear Receptor Corepressor-Dependent Pathway Mediates Suppression of Cytokine-Induced C-Reactive Protein Gene Expression by Liver X Receptor”

Florian Blaschke, Yasunori Takata, Evren Caglayan, Alan Collins, Peter Tontonoz, Willa A. Hsueh, Rajendra K. Tangirala

Circulation Research, 2006;99: e88-e99

Während zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten gezeigt haben, dass Liver X Rezeptor Aktivierung die inflammatorische Genexpression in Makrophagen reguliert und die Entstehung und Progression von arteriosklerotischen Läsionen in Mausmodellen für Arteriosklerose inhibiert, ist der zugrundeliegende Mechanismus der inflammatorischen Genregulation durch LXRs weitgehend unbekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine LXR Aktivierung durch synthetische Liganden die Zytokin induzierte Expression des Akute-Phase-Proteins CRP in humanen Hepatozyten inhibiert. Durch einen spezifischen Knockdown von LXR α und LXR β mittels siRNAs konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt von LXR Liganden auf einem LXR Rezeptor vermitteltem Mechanismus beruht. Durch transiente Transfektionsexperimente mit CRP Promoter Konstrukten verschiedener Länge konnte eine Region zwischen -125 und -256 bp (Basenpaare) entfernt vom Transkriptionsstartpunkt identifiziert werden, die den inhibitorischen Effekt der LXR Liganden auf die CRP Gen Transkription vermittelt. Durch Chromatin-Immunoprecipitations Assays (ChIP Assays) wurde gezeigt, dass der nukleäre Korepressor NCoR (nuclear receptor corepressor) in diesem Promoterbereich bindet. LXR Liganden verhindern die Zytokin induzierte Dissoziation von NCoR und inhibieren so die CRP Gentranskription. Der *in vitro* gezeigte inhibierende Effekt von LXR Liganden auf die CRP Gen Expression konnte *in vivo* auch im Mausmodell gezeigt werden. Lipopolysaccharid (LPS) induzierte Akute-Phase-Protein Expression (CRP, Serum Amyloid P) in der Leber wurde in C57Bl6/J Mäusen durch LXR Liganden inhibiert, wohingegen kein Effekt in LXR $\alpha\beta$ knockout Tieren beobachtet wurde.

Diese Daten zeigen, dass LXR Aktivierung mittels synthetischer Liganden die CRP Expression in humanen Hepatozyten durch Inhibierung der Dissoziation des Korepressors NCoR vom CRP Promoter regulieren. Dies stellt einen bisher noch nicht bekannten Mechanismus inflammatorischer Genregulation durch LXRs dar. Vor dem Hintergrund der Bedeutung inflammatorischer Prozesse in der Pathogenese der Arteriosklerose und Restenose nach Ballonangioplastie zeigen diese Daten, dass LXR Aktivierung einen vielversprechender Ansatz zur Therapie und Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt.

4. Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall stellen in der westlichen Welt die häufigste Todesursache dar.¹ Auch in den Entwicklungsändern wird als Folge veränderter Lebensbedingungen ein stetiger Anstieg der Morbiditätsziffern in diesem Bereich dokumentiert. Lokale inflammatorische Reaktionen spielen eine Schlüsselrolle bei vaskulären Umbauprozessen und den daraus resultierenden Folgeerkrankungen. Vor dem Hintergrund der zentralen Rolle glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen dieser Prozesse wurden in der vorliegenden Habilitationsschrift Regulationsmechanismen der Proliferation und Migration untersucht (Originalarbeiten 1 und 2). Basierend auf einer Reihe von Studien, die gezeigt haben, dass hs-CRP Serumspiegel nicht nur ein Prädiktor für das kardiovaskuläre Risiko sind, sondern dass CRP eine aktive Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose spielt, wurde die Wirkung von CRP auf glatte Gefäßmuskelzellen *in vitro* und *in vivo* untersucht (Originalarbeit 3). In der Originalarbeit 4 wurde der Effekt einer Aktivierung des nukleären Rezeptors LXR mittels synthetischer Liganden auf die Zellzyklusregulation in glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro* und die Neointimabildung nach Ballonverletzung der A. carotis in der Ratte untersucht. Mechanismen der inflammatorischen Genregulation durch LXRs wurden anhand des klassischen Akute-Phase-Proteins CRP in der Originalarbeit 5 charakterisiert.

In der vorliegenden Habilitationsschrift wurde der Effekt von Angiotensin II auf die Migration glatter Gefäßmuskelzellen und die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden untersucht. Zellmigration ist ein komplexer Vorgang, der den geordneten Ablauf von Prozessen wie Chemotaxis, Zelladhäsion und -deadhäsion und einen Umbau der extrazellulären Matrix umfasst. Das Renin-Angiotensin-System (RAS), und dabei insbesondere Angiotensin II, spielt eine wichtige Rolle in der Arterioskleroseentstehung und der Plaqueruptur. So konnte in der HOPE Studie (The Heart Outcome Prevention Study) gezeigt werden, dass eine medikamentöse Therapie mit ACE-Hemmern das kardiovaskuläre Risiko bei Gesunden und bei Patienten mit manifester Gefäßerkrankung unabhängig von der Blutdrucksenkung reduziert. Darüber hinaus konnte in der SECURE-Studie (Study to Evaluate Changes in Patients Treated with Ramipril and Vitamin E) gezeigt werden, dass eine ACE-Hemmer Therapie die Progression arteriosklerotischer Gefäßveränderungen verlangsamt.

Der in der vorliegenden Habilitationsschrift gezeigte pro-migratorische Effekt von Angiotensin II auf glatte Gefäßmuskelzellen stellt einen weiteren möglichen Pathomechanismus der pro-arteriosklerotischen Wirkung von Angiotensin II dar und unterstreicht das Potential von ACE-Hemmern zur Primärprophylaxe von vaskulären Umbauprozessen.

In der Originalarbeit 2 wurde der Effekt von Hypoxie auf die Interaktion von glatten Gefäßmuskelzellen mit extrazellulären Matrixproteinen untersucht. Integrine spielen als Oberflächenrezeptoren eine zentrale Rolle bei der Vernetzung und Kommunikation von Zellen mit ihrer Umgebung. So konnte in einer Reihe von Studien gezeigt werden, dass Integrine für Proliferation, Migration, Adhäsion und Differenzierung verschiedener Zelltypen wichtig sind.

Präklinische Studien mit selektiven $\alpha_5\beta_1$ -Integrin Antagonisten haben gezeigt, dass diese durch Hemmung der Angiogenese eine neue und vielversprechende Therapiemöglichkeit zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration und verschiedener Tumorerkrankungen darstellen. Darüber

hinaus wurde in Phase-I und Phase-II Studien gezeigt, dass die Behandlung von Patienten mit Colitis ulcerosa und Multipler Sklerose mit Integrin-spezifischen Antikörpern zu einem Rückgang der entzündlichen Herde im Darm bzw. zentralen Nervensystem (ZNS) führt.^{70, 71} Natalizumab (Tysabri®), ein gegen $\alpha 4$ -Integrin gerichteter monoklonaler Antikörper wurde im November 2004 durch die US-amerikanische Zulassungsbehörde FDA zur Behandlung der schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose zugelassen. Allerdings wurde Natalizumab zwischenzeitlich aufgrund mehrerer Todesfälle durch die Progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML), einer ZNS Infektion mit dem Polyomavirus JC, vom Markt genommen. Natalizumab verhindert, dass Leukozyten die Blut Hirn Schranke passieren und begünstigt so das Auftreten einer JC Virus Infektion. Abciximab (ReoPro®), ein monoklonaler Antikörper gegen den $\alpha \text{IIb}\beta_3$ -Rezeptor auf Thrombozyten wird bereits seit 1995 klinisch zur Verhinderung der Thrombozytenaggregation bei instabiler Angina pectoris und PCI eingesetzt.⁷² Im Rahmen der vorliegenden Habilitationsschrift wurde gezeigt, dass Hypoxie über eine Aktivierung des β_1 -Integrins zu einer Zunahme der Adhäsion von glatten Gefäßmuskelzellen an extrazelluläre Matrixproteine führt. Der Effekt von gegen β_1 -Integrin gerichteten Antikörpern als möglichen therapeutischen Ansatz zur Plaquestabilisierung und zur Prävention und Behandlung von Arteriosklerose und Restenose wurde noch nicht untersucht. Allerdings sind aufgrund der zentralen Rolle von Integrinen für die Zell-Matrix-Interaktion signifikante Nebenwirkungen möglicherweise nicht auszuschließen.

Aufgrund der zentralen Rolle inflammatorischer Prozesse in der Pathogenese der Arteriosklerose und ihrer klinischen Manifestation stellen diese einen vielversprechenden Angriffspunkt für die Primär- und Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen dar. In der Originalarbeit 3 konnte gezeigt werden, dass CRP Apoptose in humanen koronaren Gefäßmuskelzellen induziert. Dieser Pathomechanismus trägt möglicherweise zu dem mit erhöhtem hs-CRP Serumspiegeln verbundenem gesteigerten Risiko für künftige kardiale Ereignisse bei gesunden Männern und Frauen und der schlechteren kurz- und langfristigen Prognose bei Patienten mit instabiler Angina pectoris bei.⁷³⁻⁷⁵ Das Konzept der Plaqueruptur mit daraus resultierender Freilegung von subintimalem thrombogenem Gewebe und konsekutiver Bildung von Thromben im Koronargefäßsystem als Ursache für das akute Koronarsyndrom wurde bereits 1926 von Benson postuliert.⁴⁴ Während initial angenommen wurde, dass ein akuter Myokardinfarkt aus einem thrombotischen Verschluss eines hochgradig verengten Koronargefäßes resultiert, konnte in den folgenden Jahren gezeigt werden, dass die zugrundeliegende Residualstenose in den meisten Fällen um die 50% beträgt.⁴⁵ Somit ist nicht die Größe, sondern die Zusammensetzung und der Grad der Inflammation eines arteriosklerotischen Plaques entscheidend für das Risiko einer Ruptur. Vulnerable, instabile Plaques sind im Vergleich zu einem stabilen Plaque durch eine dünne fibröse Kappe, einen großen lipidreichen Kern und einen hohen Gehalt an Entzündungszellen gekennzeichnet.⁷⁶ Die Identifizierung kardiovaskulärer Hochrisikopatienten mit instabilen Plaques und deren Behandlung stellt in der Zukunft eine wichtige Herausforderung dar. Eine CRP-senkende medikamentöse Therapie stellt möglicherweise einen sinnvollen therapeutischen Ansatz zur Primär- und Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen dar. So konnte eine Reihe von Studien zeigen, dass eine Langzeittherapie mit Statinen

zur einer LDL-unabhängigen Senkung der hs-CRP Serumspiegel führt.⁷⁷ Dieser pleiotrope Effekt trägt möglicherweise zur beobachteten Plaquestabilisierung unter Statintherapie bei.⁷⁸

Die In-Stent Restenose und thrombotische Komplikationen im Koronargefäßsystem gelten als wichtigste limitierende Faktoren für den therapeutischen Erfolg einer PCI. Durch die Entwicklung von Drug-eluting Stents konnte die In-Stent Restenose Rate im Vergleich zur herkömmlichen Ballon Angioplastie und zu Bare-metal Stents sowohl bei Patienten mit niedrigem als auch mit hohem Restenose Risiko reduziert werden. So wird durch den Einsatz von Medikamenten-beschichteten Stents durch die lokale Gabe ein höherer Gewebespiegel im gewünschten Areal als bei einer systemischen Gabe erzielt. Darüber hinaus wird das Risiko von systemischen Nebenwirkungen durch die geringen Serumspiegel der entsprechenden Substanzen reduziert. Gegenwärtig zur Beschichtung von Stents eingesetzte Substanzen wie Rapamycin (Cypher® Stent) und Tacrolimus (Taxus® Stent) hemmen die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und führen so zu einer signifikanten Reduktion der Neointimaformation. Allerdings konnte durch Verwendung von Drug-eluting Stents keine Verbesserung der Langzeitprognose im Vergleich zu unbeschichteten Stents erreicht werden.^{8, 9} Darüber hinaus wurden Drug-eluting Stents mit einem erhöhten Risiko von späten und sehr späten Stent-Thrombosen in Verbindung gebracht.¹⁰ Im Gegensatz zu anti-proliferativ wirkenden Beschichtungen haben sich Versuche, die Rezidivstenoserate mit systemisch verabreichten Medikamenten zu senken, bisher als nicht effektiv erwiesen. In der Originalarbeit 4 wurde der Effekt von synthetischen LXR Liganden auf die Zellproliferation und Zellzyklusregulation glatter Gefäßmuskelzellen untersucht. In einem Ballonverletzungsmodell der A. carotis der Ratte konnte erstmals gezeigt werden, dass die systemische Gabe spezifischer LXR Agonisten zu einer signifikanten Inhibierung der Neointimaformation führt. Die systemische Gabe von synthetischen LXR Agonisten stellt eine vielversprechende neue Therapiemöglichkeit zur Verhinderung von Restenose nach einer koronaren Intervention dar. Eine erste Studie zur Verträglichkeit und Pharmakokinetik bei gesunden Probanden wurde bereits durchgeführt.⁷⁹ Ein klinischer Einsatz wird möglicherweise durch in Mäusen beobachtete Erhöhung der Triglyceridspiegel und dem Auftreten einer Lebersteatose limitiert. So führen LXR Agonisten über eine Aktivierung von LXR α zu einer Hochregulation von SREBP-1c und konsekutiver Steigerung der hepatische Triglyceridsynthese.⁶²

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass LXRs eine zentrale Rolle bei der Regulation inflammatorischer Prozesse spielen. Der zugrundeliegende Mechanismus war allerdings weitgehend unbekannt. In der Originalarbeit 5 konnte am Beispiel des Akuten-Phase-Proteins CRP gezeigt werden, dass ein Komplex aus synthetischem LXR Ligand und Rezeptor die Dissoziation des nukleären Korepressors NCoR inhibiert und so die Genexpression verhindert. Dieser Genregulationsmechanismus ist möglicherweise auch für andere inflammatorische Gene und nukleäre Rezeptoren relevant. Nukleäre Rezeptoren stellen vielversprechende Zielstrukturen zur Prävention und Therapie von metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen dar. Bei den derzeit klinisch verwendeten Liganden handelt es sich allerdings überwiegend um volle Agonisten, deren Verwendung häufig durch auftretende Nebenwirkungen limitiert ist. Durch die Entwicklung von Liganden, die im Gegensatz zu vollen Agonisten eine selektive Bindung von Kofaktoren induzieren,

könnten die Nebenwirkungen reduziert werden. Eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung dieser Liganden ist ein besseres Verständnis der Interaktionen zwischen nukleären Rezeptoren und den entsprechenden Kofaktoren.

Arteriosklerose und Restenose stellen trotz Entwicklung neuer invasiver und medikamentöser Therapieformen weiter ein schwerwiegendes klinisches und aufgrund der damit verbundenen Kosten, auch volkswirtschaftlich bedeutsames Problem dar. So handelt es sich bei der koronaren Herzerkrankung um die häufigste Todesursache in den USA mit jährlichen Kosten von 133.2 Milliarden Dollar.⁸⁰ Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskulzellen aus der Media in die Intima sind wesentliche Pathomechanismen beider Erkrankungen. Darüber hinaus spielen inflammatorische Prozesse eine zentrale Rolle. Ein Eingriff in den Zellzyklus und dessen Regulation stellt neben einem anti-inflammatorischen Ansatz eine vielversprechende Therapiestrategie zur Prävention und Behandlung von Arteriosklerose und Restenose dar. Vor allem die Aktivierung nukleärer Rezeptoren mittels spezifischer Liganden könnte sich als wirksamer Ansatz für Prävention und Therapie vaskulärer Umbauprozesse erweisen.

5. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen in der westlichen Welt die häufigste Todesursache dar. Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass die Inflammation eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Arteriosklerose und deren Folgeerkrankungen spielt. Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen spielt dabei eine zentrale Rolle sowohl in der Pathogenese arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen als auch der Entstehung von Restenose nach interventionellen Eingriffen. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen ist die Voraussetzung zur Entwicklung neuer pharmakologischer Strategien zur Prävention und Therapie von Arteriosklerose und Restenose.

In der Originalarbeit 1 konnte gezeigt werden, dass Langzeitinkubation glatter Gefäßmuskelzellen mit Angiotensin II die PDGF-BB gerichtete Zellmigration erhöht. Die Expression von Zellmigration vermittelnder Integrine blieb dabei unverändert. Allerdings zeigte sich nach Langzeitstimulation mit Angiotensin II eine verstärkte Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 MAPK und Pyk2. Weiter konnten wir eine Translokation von Pyk2 von der Plasmamembran in das Zytosol und eine perinukleäre Anreicherung von ERK1/2 MAPK nachweisen. Dies stellt wahrscheinlich den entscheidenden Mechanismus für die durch Angiotensin II Vorbehandlung vermittelte Zunahme der Zellmigration dar und liefert eine weitere molekulare Erklärung für die pro-arteriosklerotische Wirkung von Angiotensin.

Der Effekt von Hypoxie auf die Interaktion von VSMCs mit extrazellulären Matrixproteinen wurde in der Originalarbeit 2 untersucht. Dabei zeigte sich, dass Hypoxie durch eine Konformationsänderung des β_1 Integrins die Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine verstärkt. Vermittelt wurde die gesteigerte Adhäsion über eine Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktionswege ERK1/2 MAPK und p38 MAPK. Diese Daten zeigen erstmalig, dass Hypoxie bei gleichbleibender Expression über eine Konformationsänderung des β_1 -Integrins Zell-Matrix-Interaktionen moduliert und so eine wichtige Rolle bei vaskulären Umbauprozessen spielt.

In der Originalarbeit 3 konnte gezeigt werden, dass das akute Phase Protein CRP Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen induziert. Mittels DNA Mikroarray Analysen wurde GADD153 als CRP reguliertes Gen in VSMCs identifiziert. Durch einen spezifischen Knockdown von GADD153 mittels siRNA konnte gezeigt werden, dass die CRP induzierte Apoptose durch GADD153 vermittelt wird. Die Kolokalisation von CRP, GADD153 und apoptotischen VSMCs in arteriosklerotischen Plaques humaner Koronargefäße unterstreicht die funktionelle Rolle von GADD153 in der CRP induzierten Apoptose.

Die Rolle des nukleären Rezeptors LXR in der Zellzyklusregulation von VSMCs wurde in der Originalarbeit 4 untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass LXR α und LXR β in VSMCs exprimiert wird und die Expression des Rezeptors durch synthetische Liganden im Rahmen eines Autoregulationsmechanismus induziert wird. Weiter konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von LXR mittels synthetischer Liganden die Mitogen-induzierte Zellproliferation und Zellzyklusprogression hemmt. Vermittelt wurde dieser Effekt über eine Hemmung des Abbaus des

Zellzyklusinhibitors p27^{Kip1}. Es konnte gezeigt werden, dass LXR Liganden die Expression von Skp2, einem zentralen Bestandteil der SCF^{Skp2/Cks1}-Ubiquitin Ligase, inhibieren und so den proteasomalen Abbau von p27^{Kip1} verhindern. Die Bedeutung einer LXR Aktivierung mittels spezifischer Liganden wurde *in vivo* in einem Ballonverletzungsmodell der A. carotis der Ratte untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Inhibierung der Neointima Formation nach Ballonverletzung bei den mit LXR Liganden behandelten Tieren. Die bis dato unbekannte Rolle von LXRs in der Zellzyklusregulation von VSMCs stellt einen vielversprechenden neuen Therapieansatz zur Prävention und Therapie von vaskulären Umbauprozessen im Rahmen der Arteriosklerose und Restenose dar.

Inflammatorische Prozesse spielen in der Frühphase nach Gefäßverletzung eine wichtige Rolle bei der Neointimaformation nach Ballonangioplastie. Obwohl LXRs als wichtige Regulatoren inflammatorischer Genexpression in Makrophagen identifiziert wurden, ist der zugrundeliegende Mechanismus weitgehend unbekannt. In der Originalarbeit 5 wurde der Effekt von LXR Liganden auf die Zytokin induzierte Expression von CRP in humanen Hepatozyten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass LXR Liganden die CRP Genexpression konzentrationsabhängig inhibieren. Als zugrundeliegender Mechanismus wurde die Inhibierung der Zytokin induzierten Dissoziation des nukleären Korepressors NCoR vom CRP Promoter identifiziert. Diese Daten zeigen einen neuen Mechanismus inflammatorischer Genregulation durch LXRs. Dieser Mechanismus ist möglicherweise auch für andere Gene und andere nukleäre Rezeptoren von Bedeutung.

6. Literaturverzeichnis

1. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation* 2001;104:2855-64.
2. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.
3. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2009;6:399-409.
4. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 2002;8:1249-56.
5. Lowe HC, Oesterle SN, Khachigian LM. Coronary in-stent restenosis: current status and future strategies. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:183-93.
6. Costa MA, Simon DI. Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation* 2005;111:2257-73.
7. Lemos PA, van Mieghem CA, Arampatzis CA, et al. Post-sirolimus-eluting stent restenosis treated with repeat percutaneous intervention: late angiographic and clinical outcomes. *Circulation* 2004;109:2500-2.
8. 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;364:583-91.
9. Spaulding C, Daemen J, Boersma E, Cutlip DE, Serruys PW. A pooled analysis of data comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med* 2007;356:989-97.
10. Webster MW, Ormiston JA. Drug-eluting stents and late stent thrombosis. *Lancet* 2007;370:914-5.
11. Takahashi S, Kaneda H, Tanaka S, et al. Late angiographic stent thrombosis after sirolimus-eluting stent implantation. *Circ J* 2007;71:226-8.
12. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-65.
13. Pai JK, Pischon T, Ma J, et al. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med* 2004;351:2599-610.
14. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* 2001;103:1194-7.
15. Wolbink GJ, Brouwer MC, Buysmann S, ten Berge IJ, Hack CE. CRP-mediated activation of complement in vivo: assessment by measuring circulating complement-C-reactive protein complexes. *J Immunol* 1996;157:473-9.
16. Hueper W. General reviews. *Arterioscler Arch Pathol* 1944;38:162-81.
17. Martin JF, Booth RF, Moncada S. Arterial wall hypoxia following hyperfusion through the vasa vasorum is an initial lesion in atherosclerosis. *Eur J Clin Invest* 1990;20:588-92.
18. Bjornheden T, Levin M, Evaldsson M, Wiklund O. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:870-6.
19. Corros C, Jimenez-Quevedo P, Sabate M. Diabetes mellitus and percutaneous coronary revascularization. *Minerva Cardioangiol* 2005;53:431-43.

20. Lexis CP, Rahel BM, Meeder JG, Zijlstra F, van der Horst IC. The role of glucose lowering agents on restenosis after percutaneous coronary intervention in patients with diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 2009;8:41.
21. Bennett MR, O'Sullivan M. Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy. *Pharmacol Ther* 2001;91:149-66.
22. Rensing BJ, Hermans WR, Strauss BH, Serruys PW. Regional differences in elastic recoil after percutaneous transluminal coronary angioplasty: a quantitative angiographic study. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:34B-8B.
23. Welt FG, Edelman ER, Simon DI, Rogers C. Neutrophil, not macrophage, infiltration precedes neointimal thickening in balloon-injured arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2553-8.
24. Evangelista V, Manarini S, Sideri R, et al. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 1999;93:876-85.
25. Malumbres M, Harlow E, Hunt T, et al. Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol* 2009;11:1275-6.
26. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374:131-4.
27. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-12.
28. Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995;269:682-5.
29. Shirane M, Harumiya Y, Ishida N, et al. Down-regulation of p27(Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing. *J Biol Chem* 1999;274:13886-93.
30. Harbour JW, Dean DC. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2000;2:E65-7.
31. Weinberg RA. E2F and cell proliferation: a world turned upside down. *Cell* 1996;85:457-9.
32. Skinner MP, Raines EW, Ross R. Dynamic expression of alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrin receptors by human vascular smooth muscle cells. Alpha 2 beta 1 integrin is required for chemotaxis across type I collagen-coated membranes. *Am J Pathol* 1994;145:1070-81.
33. Slepian MJ, Massia SP, Dehdashti B, Fritz A, Whitesell L. Beta3-integrins rather than beta1-integrins dominate integrin-matrix interactions involved in postinjury smooth muscle cell migration. *Circulation* 1998;97:1818-27.
34. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673-87.
35. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 2000;275:21785-8.
36. Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong JP. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:381-410.
37. Qin J, Vinogradova O, Plow EF. Integrin bidirectional signaling: a molecular view. *PLoS Biol* 2004;2:e169.
38. Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 20):3563-71.
39. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005;111:3481-8.

40. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
41. Adams DH, Shaw S. Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 1994;343:831-6.
42. Williams KJ, Tabas I. Lipoprotein retention--and clues for atheroma regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1536-40.
43. Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002;417:750-4.
44. Benson R. The present status of coronary arterial disease. *Arch Pathol Lab Med* 1926;2:876-916.
45. Brown BG, Gallery CA, Badger RS, et al. Incomplete lysis of thrombus in the moderate underlying atherosclerotic lesion during intracoronary infusion of streptokinase for acute myocardial infarction: quantitative angiographic observations. *Circulation* 1986;73:653-61.
46. Zhang XW, Ge JB, Yang JM, et al. Relationship between hs-CRP, proMMP-1, TIMP-1 and coronary plaque morphology: intravascular ultrasound study. *Chin Med J (Engl)* 2006;119:1689-94.
47. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240:889-95.
48. Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995;83:841-50.
49. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 2000;14:121-41.
50. Perissi V, Aggarwal A, Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* 2004;116:511-26.
51. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 1995;9:1033-45.
52. Teboul M, Enmark E, Li Q, Wikstrom AC, Pelto-Huikko M, Gustafsson JA. OR-1, a member of the nuclear receptor superfamily that interacts with the 9-cis-retinoic acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2096-100.
53. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:459-81.
54. Steffensen KR, Nilsson M, Schuster GU, Stulnig TM, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Gene expression profiling in adipose tissue indicates different transcriptional mechanisms of liver X receptors alpha and beta, respectively. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:589-93.
55. Peet DJ, Janowski BA, Mangelsdorf DJ. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:571-5.
56. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 1996;383:728-31.
57. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 1997;272:3137-40.
58. Fu X, Menke JG, Chen Y, et al. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem* 2001;276:38378-87.
59. Geyeregger R, Zeyda M, Stulnig TM. Liver X receptors in cardiovascular and metabolic disease. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:524-39.

60. Steffensen KR, Gustafsson JA. Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes* 2004;53 Suppl 1:S36-42.
61. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 2000;275:28240-5.
62. Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 2003;17:985-93.
63. Laffitte BA, Chao LC, Li J, et al. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5419-24.
64. Dalen KT, Ulven SM, Bamberg K, Gustafsson JA, Nebb HI. Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J Biol Chem* 2003;278:48283-91.
65. Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem* 2003;278:10443-9.
66. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7604-9.
67. Terasaka N, Hiroshima A, Koieyama T, et al. T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Lett* 2003;536:6-11.
68. Levin N, Bischoff ED, Daige CL, et al. Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:135-42.
69. Tangirala RK, Bischoff ED, Joseph SB, et al. Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11896-901.
70. Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, et al. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *N Engl J Med* 2005;352:2499-507.
71. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2003;348:15-23.
72. Fredrickson BJ, Turner NA, Kleiman NS, et al. Effects of abciximab, ticlopidine, and combined Abciximab/Ticlopidine therapy on platelet and leukocyte function in patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 2000;101:1122-9.
73. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973-9.
74. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331:417-24.
75. Ferreiros ER, Boissonnet CP, Pizarro R, et al. Independent prognostic value of elevated C-reactive protein in unstable angina. *Circulation* 1999;100:1958-63.
76. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med* 1997;336:1276-82.

77. Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA* 2001;286:64-70.
78. Libby P. Lipid-lowering therapy stabilizes plaque, reduces events by limiting inflammation. *Am J Manag Care* 2002;Suppl:1, 4.
79. Katz A, Udata C, Ott E, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants. *J Clin Pharmacol* 2009;49:643-9.
80. American Heart Association, Heart Disease and Stroke Statistics -2004 Update. 2004.

7. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Rainer Dietz und Herrn Professor Dr. Ludwig Thierfelder für die außerordentliche wissenschaftliche und persönliche Förderung meiner Arbeit an der Charité und am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin. Insbesondere bedanke ich mich für die hilfreichen Anregungen und zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen.

Meinem Mentor Professor Dr. Ronald Law bin ich zu großem Dank verpflichtet, da er meine wissenschaftliche Arbeit weit über unsere gemeinsame Zeit an der University of California, Los Angeles (UCLA) hinaus geprägt hat. Er stand mir mit seinen fachlichen Ratschlägen, seiner herzlichen und motivierenden Art und seinem umfassenden molekularbiologischen Wissen jederzeit zur Seite und ließ meine Zeit in Los Angeles menschlich und wissenschaftlich unvergesslich werden. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Professor Dr. Willa Hsueh, die mich als Division Chief an der UCLA stets unterstützt hat und großen Freiraum bei der Durchführung eigener Projektideen gelassen hat. Ganz herzlich möchte ich mit noch bei meinen damaligen Kollegen an der UCLA, Dr. Yasunori Takata, Dr. Dennis Brümmer und Dr. Evren Caglayan für das Durchführen gemeinsamer Projekte, viele hilfreiche Anregungen und wissenschaftliche Diskussionen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Eckart Fleck für seine große Unterstützung zu Beginn meiner ärztlichen und wissenschaftlichen Tätigkeit. Mein Dank gilt dabei auch den damaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe am Deutschen Herzzentrum Berlin, PD Dr. Kai Kappert, Dr. Oliver Hintz, PD Dr. Philipp Stawowy und PD Dr. Michael Gräfe für die gute Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Anregungen und wissenschaftlichen Diskussionen. Herrn Professor Dr. Kristof Graf bin ich besonders dankbar für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mit den ersten wissenschaftlichen Projekten den Grundstock für die nachfolgenden Forschungsprojekte gelegt haben zu können.

Meinen technischen Mitarbeiterinnen Frau Beatrice Leip und Frau Stefanie Belz danke ich für Ihr grosses Engagement bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinem Doktoranden Herrn Timm Zörgiebel und der Diplomandin Frau Annett Spitzl. Mein herzlicher Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Ludwig Thierfelder für die außergewöhnlich freundschaftliche Atmosphäre und das befruchtende wissenschaftliche Arbeitsumfeld.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Claudia für ihre liebevolle Unterstützung und Verständnis für meine wissenschaftliche Tätigkeit in Berlin und Los Angeles.

An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ganz herzlich bei meinen Eltern Helga und Benno bedanken, die mich immer unterstützt haben und ohne die dies nicht möglich gewesen wäre.

8. Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur in der Habilitationsschrift angegeben wurden
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist

Berlin, 25.01.2010

Dr. F. Blaschke