

Aus der Klinik für Innere Medizin / Kardiologie  
Deutsches Herzzentrum Berlin  
Stiftung des Bürgerlichen Rechts

DISSERTATION

Zelluläre CD40 Expression in der Pathogenese der Atherosklerose

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Urte Riggers  
aus Rendsburg

**Gutachter :**

- 1. Prof. Dr. med. K. Graf**
- 2. Prof. Dr. med. U. Kintscher**
- 3. Priv.-Doz. Dr. med. S. Rosenkranz**

**Datum der Promotion: 04. Februar 2011**

Meinen Eltern  
Jutta Riggers und Jochen Riggers  
in Dankbarkeit gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	6
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1.1. CD40 und sein Ligand CD154</b>	<b>7</b>
1.1.2. CD40/CD154 regulierte Funktionen immunologischer Zellen: B-Zellen, T-Zellen, Natürliche Killerzellen, Monozyten, Makrophagen sowie Antigenpräsentation	8
1.1.3. CD40/CD154 regulierte Funktionen nicht immunologischer Zellen: Endothelzellen, Vaskuläre glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten	12
1.1.4 Zusammenfassung und klinische Bedeutung	13
<b>1.2 Atherosklerose</b>	<b>15</b>
1.2.1. Definition, Inzidenz und Mortalität	15
1.2.2. Ätiologie: Risikofaktoren, Umwelteinflüsse und genetische Ursachen	15
1.2.3. Stadieneinteilung	18
1.2.4. Hypothesen der Atheroskleroseentstehung	19
1.2.4.1 "Response to injury" Hypothese: Endothelzellen und ihre Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose	19
1.2.4.2 Immunhypothese: Makrophagen, T-Zellen, Vaskuläre glatte Muskelzellen, B-Zellen und Mastzellen und ihre Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose	20
1.2.5. Atherosklerose- Systemische Entzündungsreaktion und klinische Komplikationen	26
<b>1.3. Fragestellung</b>	<b>27</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1. Material	29
2.1.2. Fixierung des Materials	29
2.2. Methoden	29
2.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	29
2.2.2. Sudan III Fettfärbung	30
2.2.3. Immunhistochemische Methoden	30
2.2.3.1 APAAP-Methode und	30
2.2.3.2 Streptavidin Biotin Amplifikation	33
2.3. Histologische Auswertung der Präparate	37
2.4. Stadieneinteilungen im Vergleich	37
2.4.1. Stadieneinteilung der American Heart Association	37
2.4.2. Modifikationen der AHA Klassifikation nach Gown et al.	40
2.4.3. WHO Klassifikation	41
2.5. Analyse der CD40 Expression	42
2.6. Statistische Analyse	42

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1.	Histomorphologische Beschreibung der Resultate in der Intima	45
3.1.1.	Histomorphologie der Gefäßschnitte im WHO-Stadium 0	45
3.1.2.	Histomorphologie der Gefäßschnitte im WHO-Stadium 1	46
3.1.3.	Histomorphologie der Gefäßschnitte im WHO-Stadium 2	50
3.1.4.	Histomorphologie der Gefäßschnitte im WHO-Stadium 3	52
3.2.	Media	55
3.3.	Adventitia	57
3.4.	Endothelzellen	59
3.5.	Kolokalisation von CD40, ICAM-1, VCAM-1 und MMP-2	60
3.6.	CD40 Ligand / CD154	62
3.7.	Analyse / Statistische Ergebnisse	64
3.7.1.	Verteilung	64
3.7.2.	Stadienabhängiger Anstieg der Intimadicke, Infiltrate und Makrophagen	64
3.7.3.	Semiquantitative Analyse	66
3.7.4.	Korrelationen	67
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
4.1.	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	69
4.2.	CD40 Expression der vaskulären glatten Muskelzellen	70
4.3.	CD40 Expression der Makrophagen	72
4.4.	CD40 Expression der Endothelzellen	73
4.5.2.	CD40 Expression der Endothelzellen der Adventitia	74
4.6.	CD40 und CD154 Expression der T-Zellen	74
4.6.2.	Antigendiskussion	76
4.7.	Effekte der CD40 Ligation auf die Pathogenese der Atherosklerose	76
4.7.2.	Funktionsspektrum von CD40/CD154 in der Pathogenese der Atherosklerose	77
4.8.	CD40 und klinische Komplikationen	78
4.8.1.	CD40/CD154 und thrombotische Ereignisse	78
4.8.2.	CD40/CD154 und die Plaque Ruptur	79
4.8.3.	Klinische Studien zu CD40/CD154 und Grenzen der Studie	79
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>Verzeichnisse</b>	<b>94</b>
<b>7.1.</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen</b>	<b>95</b>
<b>7.2.</b>	<b>Verzeichnis der Tabellen</b>	<b>95</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>96</b>
<b>9.</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>97</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>98</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>98</b>

## Abkürzungsverzeichnis:

AK	Antikörper
AS	Aminosäure
APC	Antigenpräsentierende Zelle
EC	Endothelzellen
MAC	Makrophagen
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
TF	Tissue Factor
VSMC	Vascular smooth muscle cell
HIGM1	Hyper IgM 1 Syndrom
TI Antigene	Thymusunabhängige Antigene
TD Antigene	Thymusabhängige Antigene
TH1	T-Helfezellen 1
TH2	T-Helferzellen 2
LDL	Low density lipoprotein
HDL	High density lipoprotein
ox. LDL	Oxidiertes low density lipoprotein
VLA-1	Very late antigen 1
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
IL-1	Interleukin-1
TNF	Tumornekrosefaktor
TGF	Transforming growth factor
GM-CSF	Granulocyte Monocyte colony stimulating factor
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
MCP-1	Monozyten chemoattractant protein 1
Ø	Durchschnitt / Durchmesser
HPF	High power field / Gesichtsfeld
MMPs	Metalloproteinasen
sCD40L	löslicher (soluble) CD40 Ligand

# I. Einleitung

## 1. 1. CD40 und sein Ligand CD154

CD40 ist ein phosphoryliertes TypI 49 kDa Glykoprotein, welches zur Genfamilie der Nervenzellwachstumsfaktor-/ Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptoren gehört. Es wurde 1985 von Paulie et al. primär auf B-Zellen und humanen Harnblasen-Carcinomzellen gefunden und 1992 auf dem IV. Internationalen Workshop als CD40 designiert (Gordon et al. 1987). Die Länge des humanen CD40 cDNA Klons beinhaltet 831 Nukleotide (open reading frame) und kodiert ein Peptid von 277 Aminosäuren (AS). Das TypI integrale Membranprotein besteht aus einer 19 AS leader sequenz, aus einer großen 193 AS extrazellulären Domäne (mit 22 Cystein Residuen und zwei N-verbundenen Glykosylierungsstellen) sowie einer 22 AS langen transmembranären Domäne und einem zytoplasmatischen Schwanz von 62 AS (Stamenkovic et al.1989).

**Tabelle 1.: CD40-expremierende Zellen:**

Reife B-Zell-Linien (Stamenkovic et al.1989) nicht unreife oder Plasmazellen (Uckun 1990)	Glatte Muskelzellen (SMCs) (Braun et al. 1999, Mach et al.1997)
Fibroblasten (Yellin et al. 1995; Fries et al. 1995; Brouty-Boye et al. 2000)	Dendritische Zellen (Schriever et al.1989) Endothelzellen (Yellin et al.1995)
Monozyten und Makrophagen (Stout et al. 1996)	Tumorzellen (CD40m-RNA): Adenocarcinom der Lunge, Koloncarcinom, Ösophagus- karzi- nom, Schilddrüsenkarzinom (Grewal et al. 1998)
Epitheliale Thymus Zellen (Galy et al.1992)	
Mastzellen (Grewal et al.1998)	Keratinocyten (Gaspari et al. 1996)

1992 identifizierten Noelle et al. den CD40Liganden als 39 kDa Membranprotein, auch gp39 genannt, initial auf aktivierten T-Zellen. Unabhängig davon wurde er als T-Zell-B-Zell-aktivierendes Molekül (T-BAM) und TNF related activation protein (TRAP) (Lederman et al. 1992, Graf et al. 1992) entdeckt. Heute ist er in die CD-Nomenklatur als CD154 aufgenommen. Das Polypeptid ist ein TypII Membran Glykoprotein mit einer signifikanten Homologie zu TNF $\alpha$  und gilt als Mitglied der TNF-Zytokin-Superfamilie (Banchereau et al. 1994). Die cDNA des humanen CD40L/CD154 beinhaltet 783 Nukleotide, die ein 261 AS langes Polypeptid mit einem kalkulierten Gewicht von 29,254 kDa kodiert. Das Glykoprotein enthält eine 22 AS lange cytoplasmatische, eine 24 AS lange transmembranäre und eine 215 AS lange extrazelluläre Domäne mit fünf Cystein Residuen. In manchen Zellen kommt ein 33 kDa schweres Protein vor, was eine Glykosylierung nahe legt.

## Einleitung

Der CD40L/CD154 wurde primär auf T-Zell-Oberflächen gefunden (Graf et al.; Hollenbaugh et al.; Armitage et al. alle 1992). Der menschliche CD40L kommt meistens vorübergehend auf aktivierten CD4+T-Zell-Subtypen, selten auch auf CD8+T-Zellen vor. In Mäusen ist er nur auf aktivierten und nicht auf unstimulierten TH2-Zellen zu finden (Armitage et al.1992).

**Tabelle 2. : CD154 expremierende Zellen:**

Humane PMA aktivierte CD8+ T-Zellen (Lederman et al. 1992)	Mastzellen und Basophile (Gauchat et.al.1993; Bancherau et al. 1994)
Aktivierte CD4+T-Zellen aus Milz und Blut meist CD4+CD8 Subtypen, selten auch CD8+T-Zellen (Graf et al.; Hollenbaugh et al.; Armitage et al. alle 1992)	Transkripte in aktivierten dendritischen Zellen, Aktivierten B-Zellen und B-Zell-Linien (Grammer et al.1995)
Natural Killer Cells (Cocks et al.1993)	Thrombozyten (Henn et.al.1998)
Eosinophile (Gauchat et al. 1995)	

### 1.1.2. CD40/CD154 regulierte Funktionen immunologischer Zellen

#### CD40 regulierte B-Zell-Funktionen

Die Funktion von CD40 wurde vor allem auf den zuerst entdeckten CD40+B-Zellen erforscht. Im Rahmen der humoralen Immunantwort erwiesen sich alle wesentlichen B-Zell Funktionen als CD40 vermittelt, teilweise unter Ausschluss jeglicher Redundanz: Aktivierung, Antigenpräsentation, Keimzentrumsbildung, Immunglobulinproduktion, Isotypenwechsel, Induktion der Gedächtniszellen, Rescue von Apoptose und noch fraglich Erhaltung der Gedächtnisleistung sowie klonale Expansion (Grewal et al. 1998).

Durch das Hyper-IgM-Syndrom (HIGM1) - eine Mutation in dem CD154 einschließenden Gen, die die CD154-Expression verhindert oder so verändert, dass die Bindung an CD40 nicht mehr möglich ist - konnten viele Funktionen des CD40 Systems, besonders im Bezug auf die B-Zellen ermittelt werden. HIGM1-Erkrankte haben normale oder erhöhte IgM Serum-Spiegel und reduzierte oder keine Serum-Spiegel für IgG, IgA und IgE. Keimzentren sind reduziert oder nicht vorhanden und sekundäre Immunantworten auf Thymus-abhängige (TD) Antigene sind nicht zu generieren (Noelle et al.1992, Armitage 1992). Diese Beobachtungen bewiesen, dass die Funktion von CD154 nicht redundant ist und eine zentrale Stellung in der Generierung der humoralen Immunantwort einnimmt. Studien mit Hilfe von blockierenden Antikörpern zeigten ähnliche Ergebnisse: Anti CD154 blockiert die primäre und sekundäre Immunantwort auf TD Antigene, wie z.B. Ig-Produktion, Ig-Klassenwechsel, die Entwicklung von Keimzentren und die Bildung von B-Gedächtniszellen (Durie et el. 1994). Auch CD154 knockout Mäusen fehlt zirkulierendes



IgE und IgG. IgM ist erstaunlicherweise auch verringert. Es liegt ebenfalls ein Problem des Ig-Klassenwechsels vor. Die Bildung von Keimzentren ist unmöglich. Wesentliche Funktionen der gegen TD-Antigene gerichteten Immunantworten sind nicht vorhanden, während normale Antworten auf Thymusunabhängige (TI) Antigene generiert werden können.

Obwohl CD154 wesentlich zur Keimzentrenbildung ist, bleibt seine Rolle in der klonalen Expansion fraglich. In vitro Daten zeigen, dass CD154 essentiell für die T-Zell-induzierte B-Zell-Proliferation ist (Durie et al. 1994), so dass man annimmt, die CD40-CD154 Interaktion sei auch in vivo für die TD T-Zell-induzierte B-Zell klonale Expansion verantwortlich.

Die Rolle des CD40 Systems für die B-Zell-Gedächtnisbildung (Foy et al. 1994, Durie et al. 1994) und die somatische Hypermutation sind offen.

### **CD40 regulierte T-Zell Funktionen**

#### **T-Zell-Priming**

Ähnlich wie bei HIV- infizierten Patienten, einem T-Helfer-Zell-Defekt, erkrankten Patienten mit HIGM1 an Pneumozystis carinii und Kryptosporidien Infektionen. Damit liegt nahe, dass auch hier ein T-Zell Defekt vorliegt (Grewal et al. 1998). Ebenso zeigen Studien mit knockout Mäusen für CD154 Defekte im T-Zell Priming gegenüber Proteinantigenen. Ihre T-Zellen in Zucht proliferieren nach Antigen-Immunsierung schlecht und produzieren kein oder nur wenig IL-4 und IFN $\gamma$  (Grewal et al. 1996). Auch das Priming mit Adenoviren regt CD154 -/- T-Zellen nur zu einer reduzierten Produktion von IL-4, IL-10 und IFN $\gamma$  an (Yang et al. 1996).

Im Gegensatz zu den CD4+T-Helfer-Zellen zeigen CD8+T-Zellen auch in CD154-/- Mäusen intakte Funktionen (Grewal et al. 1998). Nur die Gedächtnisfunktion von antiviralen T-Lymphozyten (CD8+zytotoxisch) waren in diesen Mäusen defekt (Borrow et al. 1996). Ungeklärt bleibt, ob das eine direkte Störung der CD8+T-Zell-Funktionen ist oder an der defekten Antigenpräsentation der APC liegt.

#### **T-Zell-Differenzierung und Immundelevation:**

Bei Entzündungsreaktionen findet eine Polarisierung der T-Zellen in TH1-Zellen (produzierte Zytokine: IFN $\gamma$ , IL2, TNF $\beta$ , GM-CSF, Funktionen u.a.: Aktivierung von MAC, Abwehr intrazellulärer Erreger) und TH2- Zellen (Zytokine: IL-4, IL-5, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-14, Funktionen u.a.: Aktivierung von B-Zellen, Produktion von Antikörpern) statt. Dabei spielen Zytokine, Antigen/MHC Affinität und Typ der APC mit selektiver Expression von kostimulatorischen Molekülen und löslichen Kofaktoren wie IL-4, IL-6 und IL-12 eine Rolle (Grewal et al. 1996). Da CD40 die APC-Aktivität und Zytokinproduktion mitreguliert, liegt eine Beteiligung

nahe. Insbesondere die CD40 regulierte IL-12 Produktion durch Makrophagen, Dendritische Zellen und Endothelzellen (Lienenlücke et al. 2000) ist zur Entwicklung einer TH1-Antwort wichtig. Einzelne Studien geben zudem Hinweise auf die Blockierung von TH1-Antworten durch CD40 Antikörper. Über eine direkte Stimulation der T-Lymphozyten könnte auch die IL-4 Synthese erhöht und damit eine TH2 Antwort vermittelt werden (Grewal et al. 1998). Abschließende Daten zur Rolle von CD40/CD154 in der Immundeviation liegen bisher nicht vor.

### **CD40 regulierte Funktionen von Natürlichen Killer (NK) - Zellen:**

Neben ihrer Killerfunktion sind NK-Zellen fähig, B-Zell Reifung, Immunglobulin-Sekretion und den Ig-Klassenwechsel (Grewal et al. 1998) – alles CD40 regulierte Funktionen - zu bewirken. Zudem sind NK-Zellen, die CD154 auf ihrer Oberfläche tragen fähig, Ziele zu töten, die CD40 exprimieren. Dieser Weg ist durch Zugabe von CD40AK inhibierbar. Die Expression von MHCI gewährt einen Schutz gegenüber dieser Zellyse. Die Signifikanz dieses Weges ist unklar. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob es sich um eine Regulation der Lysetätigkeit oder die Regulation von aberrant aktivierten APC handelt und dadurch die cytotoxische Aktivität der NK-Zellen regulatorisch in Immunantworten eingreift (Carbone et al.1997).

### **CD40 regulierte Monozyten- und Makrophagen Effektor-Funktionen**

Die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen ist abhängig von T-Zell Signalen (Stout et al.1996), die die CD40 Ligation beinhalten. Diese CD40-Ligation stimuliert die Produktion von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-8 sowie den Rescue vor Apoptose von zirkulierenden Monozyten. Damit kommt CD40 eine bedeutende Rolle in Monozyten vermittelten Entzündungsreaktionen zu.

Für Makrophagen ist ein Zell-Zell-Kontakt mit T-Zellen via CD40/CD154 zur Produktion von IFN $\gamma$ , NO und IL-12 wichtig (Stout et al.1996, Tian et al.1995, Shu et al.1995) in Studien mit CD154 defizienten Mäusen auch TNF $\alpha$  und NO (Stout et al.1996).

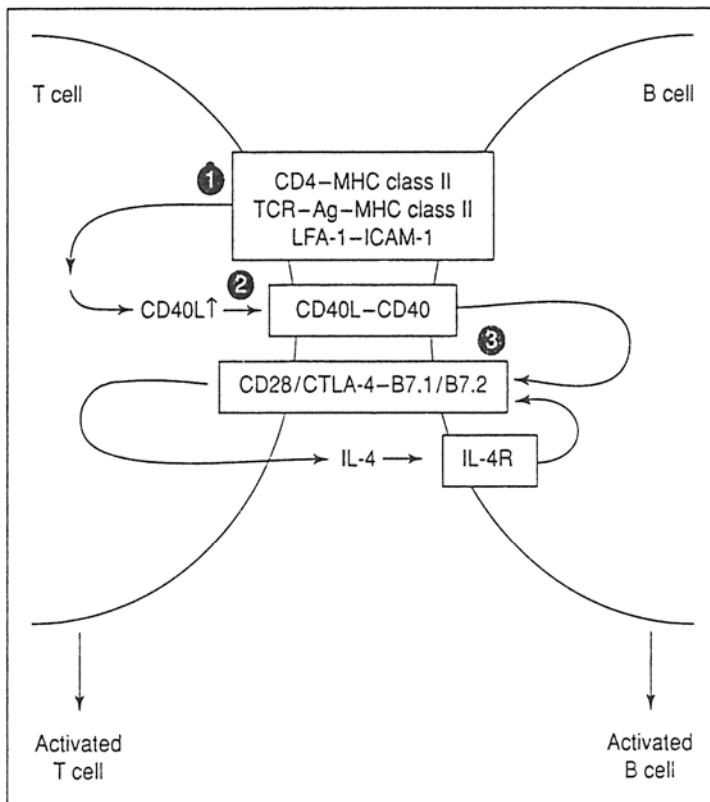
Da die IL-12 Produktion zur Entwicklung und Erhaltung einer TH1 Antwort sowie zur Aktivierung von NK-Zellen wesentlich ist, könnte man von einer besonderen Bedeutung zur Abwehr intrazellulärer Parasiten ausgehen.

### **Regulation der Antigenpräsentation:**

Besonders gut ist die Rolle von CD40 als kostimulatorisches Molekül in der Antigenpräsentation erforscht. Diese erfolgt durch eine Reihe von Zellen wie B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen und führt zur Aktivierung der beteiligten Zellen im Sinne einer T-Zell-abhängigen

Immunreaktion. Nachdem lange Zeit nur die Reaktion von MHCII auf den antigenpräsentierenden Zellen (APC) mit dem Antigen und dem T-Zell-Rezeptor (TCR/CD3) wichtig erschien, sind mittlerweile mehrere kostimulatorische Moleküle bekannt, die sequentiell expremiert werden und für die Antigenerkennung notwendig sind (Durie et al.1994). Bei der Antigenpräsentation handelt es sich um die zentrale Funktion der Aktivierung einer T-Zell abhängigen Immunantwort.

**Abb.1. Interaktionsablauf der Antigepräsentation (aus Durie et al. 1994)**



1. Im ersten Schritt bindet das präsentierte Antigen an den spezifischen TCR/CD3 zusammen mit MHCII, das mit CD4 auf der T-Zelle interagiert. Außerdem verbinden sich LFA-1 mit ICAM-1. Das Antigen mitsamt der Begleitstimulierung wird erkannt und führt zur

2. Heraufregulation des CD40L/CD154 auf den T-Zellen und zunehmende Bindung an CD40 auf der APC.

3. Das führt zusammen mit IL-4, produziert von der T-Zelle zur Expression von B7-1 und B7-2 auf der APC, wodurch diese eine kompetente APC wird und durch die Bindung an CD28 / CTLA-4 auch die T-Zelle aktivieren kann.

Neben der Funktion in der Antigenerkennung bei der APC, trägt CD40 auch zur Regulation der kostimulatorischen Aktivität bei. CD154- T-Zellen sind unfähig, B-Zellen zu aktivieren. Auch die Induktion der kostimulatorischen Aktivität auf anderen Typen von APC wie dendritischen Zellen und Makrophagen wird durch die CD40/CD154 Aktivität reguliert. CD40-abhängig sind beispielsweise die Hochregulierung von CD58, CD80 und CD86 auf dendritischen Langerhanszellen. Die Ligation mit CD154 bewirkt zudem auf Dendritischen Zellen eine verstärkte Produktion von Zytokinen wie IL-8, MIP-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  und IL-12, welches kritisch ist für die T-Zell-Aktivierung und T-Zell Antworten vom TH1 Typ. Bei Monozyten führt eine Stimulation mit CD154 und CD8 chimeric protein zu einer Induktion einiger für die Antigenpräsentation wichti-

ger Moleküle: CD54, MHCII, CD86 und CD40 (Kiener et al. 1995). Die Ligation von CD40 verlängert das Überleben von Monozyten (Laman et al. 1997).

Die CD40 - CD154 Interaktion ist für den Ablauf der Antigenpräsentation und für die Regulation der APC wesentlich und stellt einen kritischen Schritt in der Aktivierung von T-Zellen und T-Zell-abhängigen Immunantworten dar.

### **1.1.3. CD40/CD154 regulierte Funktionen nicht immunologischer Zellen**

Die Funktionsbereiche des CD40-Systems auf den nicht immunologischen Zellen der Gefäßwand (Endothelzellen und vaskuläre glatte Muskelzellen) werden hier nur kurz und in der Diskussion ausführlicher dargestellt. Wesentliche Funktionsbereiche dieser Zellspezies sind: Adhäsionsmoleküle, Proliferationsregulation, Neovaskularisierung, Matrix Metalloproteinasen, proinflammatorische Zytokine und Gerinnungsregulation.

#### **Endothelzellen (EC)**

Die Expression von CD40 auf Endothelzellen wurde in Gefäßen von Milz, Haut, Thymus, Schilddrüse, Lunge, Herz und aortalen Ästen gezeigt (Yellin et al. 1995). Sie kann durch Zytokine wie  $IFN\gamma$ ,  $IFN\beta$ ,  $TNF\alpha$  und  $IL-1\alpha$  hochreguliert werden (Karman et al. 1995; Hollenbaugh et al. 1995, Mantoviani et al. 1997). CD40 spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung von EC. Mit seiner Hilfe wird die Induktion von CD62 (E-Selectin), CD106 (VCAM-1) und CD54 (ICAM-1) getriggert (Karman et al. 1995, Hollenbaugh et al. 1995, Yellin et al. 1995). Diese Adhäsionsmoleküle vermitteln mit Chemokinen wie IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  bei Entzündungsreaktionen die Extravasation von Leukozyten (Mantoviani et al. 1995 und 1997) und zwar sowohl am Ort der Reaktion als auch in den sekundären Lymphorganen (Stout et al. 1996). Die CD40-Ligation spielt eine wesentliche Rolle bei der Akkumulation und Extravasation von aktivierten T-Zellen in der Entzündungsreaktion. Außerdem können aktivierte T-Zellen durch inflammatorische Zytokine wie TNF und  $IFN\gamma$  auf EC Funktionen aktivieren, die für T-Zell-vermittelte Immunantworten wichtig sind.

#### **Vaskuläre Glatte Muskelzellen (VSMC)**

Die Expression von CD40 auf VSMCs wurde erstmals 1997 von Mach F. et al. beschrieben. Die CD40-vermittelte Regulation der VSMCs beinhaltet die Funktionsbereiche: Adhäsionsmolekülen, damit Leukozyten-Akkumulation und Aktivierung monozytärer Zellen sowie Regulation des

## Einleitung

Zellzyklus und der Proliferation (Braun et al. 1999), Matrix Metalloproteinasen, proinflammatorische Zytokine, Tissue Factor und weitere Funktionen der Gerinnung.

Aufgrund der Fähigkeit von VSMCs zur Expression von MHC Klasse II (Hansson et al. 1988) bleibt zudem die Möglichkeit zur Antigenpräsentation unter speziellen Konditionen als weiteres Funktionsgebiet von CD40 zu diskutieren.

### **Fibroblasten**

Die Expression von CD40 auf Fibroblasten verschiedener Gewebearten, auch pathologisch veränderten, wie myelometaplastischer Milz oder Mamma-Carcinom, ist bekannt (Yellin et al. 1995; Brouty-Boye et al. 2000). Die Expression von CD40 auf Fibroblasten kann durch Zytokine der T-Zellen wie  $IF\gamma$ , nicht jedoch durch IL-4, hochreguliert werden. Diese Funktion wird in der Anwesenheit von  $IL1\alpha$  oder  $TNF\alpha$  verstärkt. Die funktionelle Bedeutung liegt in der Proliferation der Fibroblasten nach CD40Ligation und einer Aktivierung in Form der Mobilisierung von  $NF-\kappa B$  (Laman et al. 1997), Expression von CD54 (ICAM-1) und CD106 (VCAM-1) sowie der Produktion von IL-6 (Yellin et al. 1995).

### **Keratinocyten**

Ähnlich wie die Fibroblasten exprimieren alle Keratinocyten CD40. Eine Hochregulierung ist durch  $IF\gamma$  möglich und fördert die Sekretion von Tyrosin-phosphoryliertem Polypeptid und von IL-6, einem für die Proliferation wichtigen Zytokin (Gaspari et al. 1996).

### **1.1.4. Zusammenfassung und klinische Bedeutung**

CD40 vermittelt die Aktivierung und Differenzierung verschiedener Effektorzellen und besetzt Schlüsselstellen zu einer effektiven immunologischen Reaktion. Zentral ist die Antigenpräsentation als Nadelöhr zur gesamten T-Zell-abhängigen Immunantwort. Abhängig von ihr findet das T-Zell Priming und die Aktivierung von Makrophagen und B-Zellen statt. Ist sie gehemmt, werden die T-Zellen keine effizienten Effektorzellen und erfüllen nicht ihre Rolle als Dirigent der spezifischen Immunantwort.

Die Aktivierung der B-Zellen mit zentralen Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Keimzentration und Ig-Klassenwechsel sowie Rescue vor der Apoptose ist ohne CD40 nicht möglich. HIGM1 Patienten zeigen dies ohne jede Redundanz.

Klinisch bedeutet das: Einzig das unspezifische Abwehrsystem und die  $CD8+$  cytotoxischen T-Zellen übernehmen die Verteidigung des Organismus, was die Abwehr intrazellulärer Erreger

## Einleitung

wie Viren (LCMV, PV, LSV) und spezifischer Bakterien (*Listeria monocytogenes*) erlaubt, also CD40 unabhängig möglich ist (Grewal et al. 1998).

Die Bedeutung des CD40 Systems für die Abwehr extrazellulärer Erreger wie Bakterien ist noch unklar. Die Abwehr von *Borrelia burgdorferi* bei CD154 defizienten Mäusen war möglich, während die Anfälligkeit von HIGM-Patienten für bestimmte bakterielle Infektionen auf essentielle Funktionen von CD40 hinweist.

Die besondere Anfälligkeit für Protozoen wie *Pneumocystis carinii* der HIGM1 Patienten zeigt, dass humorale und zelluläre Immunantworten beteiligt sind und die Interaktion zwischen Non-B-Zellen (MAC etc.) und T-Zellen wichtig in der Abwehr dieser Infektion ist.

Durch die genannten Schlüsselfunktionen sind auch die Ergebnisse bei experimentellen Autoimmunerkrankungen (Kollagen induzierte Arthritis, Lupus Nephritis, akute oder chronische graft versus host disease, Multiple Sklerose, Thyreoiditis, experimentell allergische Enzephalomyelitis, Kolitis und Oophoritis) zu erklären, die durch die Gabe von CD154 Antikörpern limitiert werden konnten (Grewal et al.1998). Ähnlich signifikante Ergebnisse wurden bei der Verringerung der Abstoßungsreaktion gegenüber Pankreasinseln und kardialen Transplantaten durch die Gabe von Anti-CD40-Antikörpern (AK) erzielt (Grewal et al.1998).

## 1.2. Atherosklerose

### 1.2.1. Definition, Inzidenz und Mortalität

Die Atherosklerose ist eine langsam fortschreitende, multifaktorielle Erkrankung mit protrahiertem, schließlich sich eigengesetzlich verschlimmerndem Verlauf. Sie kann durch systemische exogene und endogene sowie durch örtliche Risikofaktoren in Gang gesetzt und weiterhin unterhalten werden. Die drei Hauptcharakteristiken der atherosklerotischen Plaques sind Akkumulation von Cholesterol, Formation einer fibrösen Kappe durch vaskuläre glatte Muskelzellen und Bindegewebe und die Infiltration mononukleärer Zellen in die Gefäßwand mit Entzündungsreaktion. Das Resultat sind eine Wandverhärtung und Leistungsminderung der Gefäße. (Ross 1993, Hansson 2005).

Nach Ross (1993) verursachen atherosklerotisch bedingte Herz- und Kreislauferkrankungen 50% der Mortalität in den westlichen Industrienationen, nach Hansson (2005) kardiovaskuläre Erkrankungen 38% aller Todesfälle in Nordamerika. Sie sind die häufigste Todesursache bei Männern unter 65 Jahren und die zweithäufigste Todesursache bei Frauen.

Aufgrund der Daten über den rapiden Anstieg der Prävalenz in den entwickelten Staaten und Osteuropa sowie der steigenden Inzidenz für die Risikofaktoren Adipositas und Diabetes mellitus in der westlichen Welt ist anzunehmen, dass kardiovaskuläre Erkrankungen im Verlauf der nächsten 15 Jahren die hauptsächliche Todesursache werden (Murray et al. 1997).

### 1.2.2. Ätiologie: Risikofaktoren, Umwelteinflüsse und genetische Ursachen

Intensive Forschung der letzten Jahrzehnte hat gezeigt, dass es sich bei der Atherosklerose um eine komplexe, multifaktorielle Erkrankung handelt. In den letzten 50 Jahren wurden epidemiologisch Risikofaktoren ermittelt. Diese bezeichnen erblich genetische oder Umwelteinflüsse, die statistisch das Erkrankungsrisiko in unterschiedlichem Ausmaß erhöhen. Die meisten der genetischen Risikofaktoren (außer Geschlecht und LDL-Konzentration) beziehen multiple Gene mit ein, beispielsweise Diabetes mellitus, Hypertonie oder Übergewicht (Mehrabian et al. 1998).

**Tabelle 3.: Risikofaktoren der Atherosklerose**

---

Erniedrigtes HDL (Gordon et al. 1989)	Erhöhtes Homocystein (Gerhard et al. 1999)
Erhöhtes LDL/VLDL (Hypercholesterinämie) (Assmann et al. 1999)	Diabetes mellitus (Assmann et al.1999)
	Übergewicht (Assmann et al.1999)
Erhöhte Lipoproteine (Kronenberg et al. 1999)	Bewegungsmangel (Assmann et al. 1999)
Metabolisches Syndrom (Assmann et al. 1999)	Fetteiche Ernährung (Assmann et al. 1999)
Systemische Entzündungen (Erhöhte Entzündungsparameter sowie chronisch entzündliche Erkrankungen) (Steinberg et al. 1999)	Erhöhte Gerinnungsparameter (Fibrinogen, Plasminogen-aktivator-inhibitor-typ-1, Thrombozytenreaktivität (Assmann et al. 1999)
Erhöhter Blutdruck (Luft et al. 1998)	Nikotinkonsum (Assmann et al. 1999)
Männliches Geschlecht (Nathan et al. 1997)	Depression und andere „Verhaltensstörungen“
Positive Familienanamnese (Goldbourt 1986)	(Glassmann et al. 1998)

---

Durch epidemiologische Studien, Familien- und Zwillingsstudien, wurde der Einfluss der genetischen und der Umweltfaktoren näher untersucht. Grosse Zwillingsstudien (21004 Zwillinge über 26 Jahre) in Schweden und Dänemark ermittelten den genetischen Einfluss und zeigten eine deutlich höhere Mortalität atherosklerotischer Komplikationen für monozygote als für dizygote Zwillinge (Marenberg et al. 1994). Familienstudien wiesen nach, dass das relative Risiko an einer coronaren Herzerkrankung zu sterben gegenüber der Normalbevölkerung bei Frauen unter 65 Jahren und Männern unter 55 Jahren um das 5 bis 7fache erhöht ist, wenn ein Familienangehöriger 1.Grades daran erkrankt ist (Lusis 2003).

Lusis 2000 fasst Studien zum Anteil der Erkrankung, die durch Genetik zu erklären ist, zusammen und spricht von einem über 50% Anteil an der Ätiologie der Atherosklerose.

Mittlerweile wurden insbesondere durch Assoziationsstudien eine Vielzahl an Genen vorgeschlagen, die Teilaspekte der Entstehung der Atherosklerose darstellen könnten. Allein die Risikofaktoren sind in der Mehrzahl polygen. Daraus folgt für Lusis in einer Abschätzung der an der Entstehung der Atherosklerose beteiligten Gene eine Größenordnung von Hunderten, was die Komplexität des pathologischen Geschehens unterstreicht. Die genetische Grundlage stellt die



## Einleitung

Disposition zur Erkrankung dar, die bei dem Auftreten spezifischer Einflüsse der Umwelt, wie z.B. cholesterinreicher Ernährung, in die Erkrankung mündet.

Mittels tierexperimentellen Vorgehens ist es mittlerweile möglich, über knock-out oder Überexpression spezifischer Genschnitte nähere Einsicht in die Funktion und physiologische Relevanz von Polymorphismen zu gewinnen. Bekannte Beispiele sind die ApoE- knockout Maus sowie atheroskleroseresistente oder -sensible Kaninchen.

Migrationsstudien zeigen den signifikanten Einfluss von Umweltfaktoren unabhängig von der genetischen Disposition.

Bei der Migration in ein Land mit deutlich veränderter Prävalenz für Atherosklerose wird innerhalb von Jahren die Prävalenz des Einwanderungslandes angenommen. Beispiele sind Finnen, die nach Schweden umzogen und nach 20 Jahren die dortige, niedrigere Mortalität der Atherosklerose angenommen hatten (Hammar et al. 2002), Chinesen, deren Umzug nach Australien sich nach 5 Jahren in einer erhöhten Mortalität niederschlug (Hsu Hage et al. 1993) und Japanern, deren Risiko sich in Kalifornien gegenüber ihren einheimischen japanischen Landsleuten verdoppelte (Marmot et al. 1975).

Anzunehmen ist, dass die geschilderten Veränderungen durch Interaktion der Umwelteinflüsse mit der genetischen Disposition des Individuums aus einer Population stattfinden. Grant 2003: „we are more than our genetic make-up by implication that as individuals we can make choices that determine our future wellbeing“. Nach Lusic 2003 gilt „a good environment can overcome bad genes“. So resultieren die meisten Fälle der Atherosklerose und ihrer Komplikationen aus der genetischen Prädisposition der Familie, der Population und dem Geschlecht, dem erhöhten Lebensalter und den Umwelteinflüssen mit den daraus folgenden Risikofaktoren.

Die Interaktion der Risikofaktoren erweitert die Komplexität, denn sie verhalten sich zueinander nicht rein additiv. Dies belegt beispielsweise die Kombination von Bluthochdruck und erhöhtem Serumcholesterin, deren gemeinsames Risiko weit mehr als additiv ist (Lusic et al. 2000).

**Tabelle 4: Zusammenfassung von Genen, die im Zusammenhang mit der koronaren Herzerkrankung und dem Myokardinfarkt stehen und meist in case-control genotype association studies ermittelt wurden (erweitert nach Lusic 2000, Grant 2003):**

Gerinnung	Fibrinogen, FVII, FXII, FXIIIa, PAI-1, tPA, TAFI, Thrombomodulin, Thrombopoetin
Blutdruck	Angiotensinogen, $\beta$ 2 Adrenerger Rezeptor, ACE
Thrombozytenglykoproteine	GPIIb/IIIa, Glycoprotein VI, GPIbX
Adhäsionsmoleküle	E-selectin, P-selectin, PECAM I
Metalloproteinasen	MMP2, MMP3, MMP9, MMP12
Inflammation	CCR5, CCR2, CD18, CD14, IL6, TNF $\alpha$
Lipide	Paraoxonase, Apolipoprotein E
HDL-Level	Hepatic-Lipase, ApoAI-CIII-AIV cluster, Cholesteryl ester transfer protein, Lipoproteinlipase,
Lipoproteine (a)	Apolipoprotein a
Sonstige	Glutathion S Transferase, $\alpha$ -Adducin, Aldosterase-synthase, IGF-1, Gelatinase B, TypIIIKollagen, Enos, RAGE, $\alpha$ -Östrogen R, Glutaminat-cystein, Ligase modifier, TGF $\beta$ , $\beta$ 2-adrenerger Rezeptor

### **1.2.3. Stadieneinteilung**

Der dynamische Prozess der Atheroskleroseentstehung wurde pathologisch vielfältig klassifiziert. Zur Vereinheitlichung dieser Bemühungen haben die World Health Organisation (WHO) in den 50er - (WHO 1958) und die American Heart Association (AHA) in den 90er Jahren (in drei Etappen von 1991-1995) Komitees aufgestellt (Stary et al. 1994, 1995, und Stary 2000), die internationale Maßstäbe setzen und damit die Vergleichbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher Untersucher herstellen sollten. Die präzise Beschreibung und Definition der Stadien sowie ein Vergleich der Klassifizierungen wird im Kapitel Material und Methoden durchgeführt.

#### **Klinische Relevanz der Stadien**

Wie oben erwähnt, erfolgte die Einteilung der AHA nach histomorphologischen Gesichtspunkten. Aussagen über die klinische Relevanz der Stadien der AHA liegen kaum vor, wenngleich die Frage in den letzten Jahren zunehmend gestellt wurde. Stary verfasste 2000 ein Update, in dem er spezifische Korrelationen der Stadien IV-VIII mit klinischen Manifestationen verneint: dieses galt nicht für die Läsionstypen I-III, die immer klein und klinisch stumm waren und bei denen es keine Korrelationen zwischen der Läsionsart, -größe, Lumeneinengung und klinischen Manifestation gab.

Die höhergradigen Läsionstypen IV-VI können Obstruktion und klinische Symptome verursachen oder nicht (Stary 2000). Tendenziell wird für das Stadium IV eine so große Elastizität des Gefäßes angenommen, daß sie eine Außenwölbung erlaubt und eine Obstruktion verhindert. Im Stadium V hingegen nimmt die Bindegewebsbildung durch die eingewanderten VSMCs zu, so dass durch den Elastizitätsverlust die Gefäßeinengung nach innen wahrscheinlicher wird. Eine Zunahme der Stenose kann beim Durchlaufen von Stadium VI erfolgen. In diesem Sinne stellt er die Dynamik der Pathologie in den Vordergrund, nach der sich jenseits von Stadium IV alle weiteren Stadien direkt entwickeln können ohne Durchlaufen der vorhergehenden. Auch kreisende Vorgänge mit Rückentwicklung von Stadium V aus dem Stadium VI bei Ausheilung einer Thrombose (Stadium VI) und erneuten rethrombotischen Ereignissen mit zunehmender Verengung (Wechsel von Stadium IV bis VI) müssen in Erwägung gezogen werden.

Bis zum Stadium III ist eine Regression zum gesunden Gefäß möglich. Für die Regressionsmöglichkeiten jenseits des Stadium III können keine Aussagen gemacht werden.

Mit Virmani 2000 liegt darüber hinaus ein Vorschlag zu einer neuen Einteilung nach dem klinisch maßgeblichen morphologischen Erscheinungsbild vor, das die AHA-Einteilung verbessern will.

#### **1.2.4. Hypothesen der Atheroskleroseentstehung**

Aufgrund der Komplexität der Pathogenese der Atherosklerose sind eine Vielzahl von Hypothesen entstanden. Die zurzeit bekanntesten und für das Thema der CD40-Expression relevanten Hypothesen: Response to injury Hypothese und Immunhypothese werden dargestellt.

##### **1.2.4.1. Response to injury Hypothese**

Es handelt sich um die bekannteste Hypothese, bei der eine Vielzahl einzelner, an der Pathogenese beteiligter Faktoren und mehrere andere Hypothesen in einem Konzept zusammengefasst werden. Sie geht davon aus, dass die Verletzung des Endothels und die daraus resultierende Dysfunktion der entscheidende Faktor der Atherogenese ist (Ross 1993).

##### **Funktionen der Endothelzellen im vaskulären System**

Das Endothel hat verschiedene Funktionen in der Physiologie des Gefäßes: Erhaltung einer nicht thrombogenen Oberfläche, Erstellung einer Permeabilitätsbarriere, die Austausch und aktiven Transport von Substanzen in die arterielle Gefäßwand reguliert, Oxidation von Lipoproteinen, die durch die Gefäßwand transportiert werden, Bereitstellung einer nicht adhärenen Oberfläche für Leukozyten, Erhaltung des Kollagens der Basalmembran und der Proteoglykane darunter, Regulation des vaskulären Tonus, Bildung sowie Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Ross 1993) Regulation von lokalen Entzündungsreaktionen und vaskuläres Remodelling (Lusis 2000).

##### **Endothelverletzung und seine Folgen**

„Aus der Verletzung des Endothels durch die auch als Risikofaktoren bekannten Einflüsse wie oxidiertes (ox.) LDL, hämodynamische bzw. mechanische Kräfte (Scheerkräfte), Homocystein, immunologische Einflüsse, Toxine, Viren, Bakterien etc. resultiert eine Endothelzeldysfunktion. Diese initialen Ereignisse gehen nicht mit einer Denudation einher, sie entwickeln sich auf morphologisch intaktem Endothel“ (Ross 1993). Die Dysfunktion kann zu folgenden Konsequenzen führen: Vermehrter Einstrom von ox. LDL, auch daraus resultierend vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf den EC mit konsekutiver Anlagerung von Lymphozyten und Monozyten, angelockt von Chemoattractants des veränderten Endothels, der Lymphozyten selber (Gerrity 1981) und vielleicht der darunterliegenden VSMCs (Ross 1993). Die Leukozyten migrieren in die Gefäßwand, lagern sich subendothelial an und treiben den weiteren pathologischen Prozess voran: Aktivierung der Monozyten zu Makrophagen, Schaumzellbildung durch Aufnahme von

**Tabelle 5.: Endothelfunktionen in der Pathogenese der Atherosklerose (nach Ross 1993 und Lusis 2000)**

<b>Funktionen</b>	<b>Mediatoren</b>
Regulation des vaskulären Tonus	Konstriktorisch: Endothelin Dilatatorisch: NO, PGI-2
Regulation der Gerinnung	Thrombotisch: PAI-2, TF
	Antithrombotisch: Heparansulfat, NO, PGI-2
	Fibrinolyse: Urokinase
Leukozytenadhäsion	P-Selectin, ICAM-1 (CD54), VCAM-1(106), E-Selectin (CD62)
Antigenpräsentation	MHC II
Leukozytenchemotaxe:	Ox.LDL, MCP-1
Regulation der VSMCs	Migration/Proliferation: IL-8
	Bindegewebsbildung: PDGF, bFGF, IL-1, TNF $\alpha$
Regulation der MAC	Mitogen/Aktivierung: M-CSF, GM-CSF, oxLDL
	Differenzierung: IL-6
Synthese proinflammatorischer Zytokine:	IL-6, IL-8
Synthese matrixdegradierender Enzyme	Metalloproteinasen(MMP): MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-2

oxidiertem LDL (Yla-Herttuala et al.1989), Lipidakkumulation (fatty streaks), Anlockung von VSMCs und ihre Stimulation zu Proliferation und vermehrter extrazellulärer Matrixbildung (fibrofatty lesions und fibrous plaque) (Ross 1993) sowie die weitere Entwicklung der Atherosklerose und ihrer Komplikationen. Dabei bezeichnet R. Ross alle Stadien als prinzipiell reversibel. Mittels der genannten Funktionsbereiche wird die Endotheldysfunktion zum Schlüssel in der Pathogenese der Atherosklerose. Sie spielt in allen Phasen der Erkrankung: Initiierung durch Leukozytenadhäsion und Chemotaxe, weitere Unterhaltung durch Wachstumsfaktoren und Zytokine und Genese der Komplikationen wie Erosion, Ruptur und Thrombosierung eine entscheidende Rolle.

#### **1.2.4.2. Immunhypothese**

„The hypothesis that immunological events also influence atheroma development may seem a superfluous addition to an already complicated story” (Lichtman et al. 1996). However - seit den 90er Jahren wurden zunehmend relevante immunologische Faktoren in der Pathogenese der Atherosklerose gefunden.

### **Vorkommen immunologischer Zellen in atherosklerotischen Läsionen**

Munro et al. zeigten 1987, dass in den fatty streaks, den ersten fassbaren Läsionen der Atherosklerose T-Zellen und Makrophagen in einem Verhältnis von 1:8 vorliegen, dabei sind CD4+ und CD8+ T-Zellen zu finden (Jonasson et al. 1986; Munro et al. 1987). Auch darüberhinaus wurde gezeigt, dass T-Zellen unter den ersten, die Intima infiltrierenden Zellen sind, eventuell sogar vor den Monozyten (Xu et al.1990; Hansson 1988). Die Migration von VSMCs aus der Media in die Intima erfolgt deutlich später (Xu et al.1990). Im fortgeschrittenen Plaque beträgt das Verhältnis von T-Zellen zu Makrophagen 1: 10-50. Die CD4+ T-Zellen sind jetzt zweimal so häufig wie die CD8+ T- Zellen (Hansson et al. 1988 und 1996; Schmitz et al. 1998).

### **T-Zellen und ihre Rolle in der Atherosklerose**

Bei den T-Zellen im atherosklerotischen Plaque handelt es sich meist um Gedächtniszellen die das leukocyte common antigen (CD45RO), MHCII antigene (HLA DR) und IL-2 Rezeptor- $\alpha$ - Ketten (CD25) exprimieren (Hansson et al. 1989 und 1996; Stemme et al.1991, van der Wal et al. 1994). Beide Letztgenannte sprechen für eine kurz vorhergegangene Ag induzierte Aktivierung, da der IL-2 Rezeptor direkt nach Aktivierung exprimiert wird und ohne erneute Aktivierung nur wenige Tage auf der Oberfläche bleibt. (Faruqi et al. 1993; Schmitz et al. 1998). Die T-Zellen exprimieren den Integrin Rezeptor very late antigen-1 (VLA-1)( Hansson et al.1989) und proliferieren aktiv (Rekhter et al.1995), was die Aktivierung der Zellen unterstreicht.

Das T-Zell-Rezeptor-rearrangement Muster ist polyklonal (Stemme et al.1991; Hansson et al. 1989), was die Präsentation verschiedener Antigene oder Epitope nahelegt. Studien, auch mittels Elektronenmikroskopie, zeigen einen engen Kontakt und Zwischenmembranverbindungen (intermembrane-junctions) zwischen T-Zellen und Makrophagen schon in frühen Stadien der Atherosklerose (Shimokama et al. 1991; van der Wal et al. 1989). Verschiedene Oberflächenrezeptoren wie LFA-1/ ICAM-1 sowie CD40 und sein Ligand sorgen für eine enge Zell-Zell-Interaktion. Die CD40 Ligation ist dabei zum T-Zell-Priming notwendig (Grewal et al.1996) und führt zu einer Erhöhung der Produktion von TH1-Zytokinen ( im atherosklerotischen Plaque (Peng et al. 1996; Hansson et al. 1989). Zudem exprimieren beide Zellarten kostimulatorische Moleküle, die Aktivierungsvorgänge beider Zellarten nahelegen (de Boer et al. 1999).

Die T-Lymphozyten in den atherosklerotischen Plaques bilden TH1 Zytokine (IL2, IFN $\gamma$ ), die durch Immunhistochemie und Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen wurden und ebenfalls für eine stattgefundene Aktivierung sprechen (Hansson et al. 1989; Jonasson et al.1985). In mehreren Studien ist das Vorliegen von TH1 Zellen in atherosklerotischen Gefäßen durch den Nachweis des Zytokinmusters von IFN $\gamma$ , IL-2 und Lymphotoxin bestätigt worden (Uyemara et

al.1996; de Boer et al.1999, Frostegard et al. 1999). Diese dirigiert die zellvermittelte Immunantwort, die v.a. gegen intrazelluläre Pathogene nützlich ist. Die TH2 Antwort, die über IL-4 und IL-5 läuft, fördert eher die humorale Immunantwort (O`Garra et al. 1996).

Das bei der TH1-Antwort ausgeschüttete IFN $\gamma$  könnte eine bedeutende Rolle in der Atherogenese spielen, wobei einige Effekte den atherogenetischen Prozess zu fördern, andere zu hemmen scheinen.

**Tabelle 6.: Effekte von IFN $\gamma$  in der Atherogenese**

---

**Atherogene Effekte:**

Erhöhte Rekrutierung der immunkompetenten Zellen durch Hochregulierung der Adhäsionsmoleküle auf EC (Pober et al.1986; Dukas et al. 1990),  
Verstärkung der antigenpräsentierenden Funktion der Makrophagen (Unanue et al. 1989; Harding et al. 1990)  
Induktion der Expression von Matrix degradierenden Metalloproteinasen (Galis et al. et al. 1993 und 1994).

**Antiatherogene Effekte:**

Hemmung der:

- Plaque Formation: durch Blockade der Scavenger Rezeptoren (Geng et al.1992, 1995)
- VSMC Proliferation (Hansson et al. 1988)
- Kollagen Synthese (Amento et al. 1991)
- Endothelzellproliferation (Friesel et al. 1987) auch im Sinne der Gefäßneubildung

---

**Tiermodelle zur Funktion der T-Zellen in der Atherosklerose**

Zu Beginn schienen die Versuche eher für eine schwache, atherosklerose-hemmende Beteiligung der Lymphozyten bei immundefizienten Mäusen (Fyfe et al. 1994) wie auch T-Zell supprimierten (Cyclosporin-A) Cholesterol gefütterten Kaninchen (Roselaar et al. 1995) zu sprechen. Allein die T-Zell defizienten Mäusen von Emeson et al. 1993, gefüttert mit atherogener Diät hatten 70% vergrößerte Läsionen. Mittlerweile sprechen Studien zu IFN $\gamma$  (Gupta et al. 1997), zu Antikörpern gegen ox.LDL Epitope (Shaw et al. 2000) und zu CD40 und CD154 (Schönbeck et al. 2000) für eine eindeutig atherogene Rolle der Lymphozyten. Weitere Studien mit Rag1 $^{-/-}$  Mäusen, unfähig zur Bildung von T-Zell Rezeptoren und Immunglobulinen, gekreuzt mit Apo-E defizienten Mäusen (Dansky et al. 1997), von T-Zell defizienten nu/nu nude Mäusen und Fettdiät (Plasma level 270mg/dl, Reduction of the lesions 90%) (Emeson et al. 1996) und von Mäusen mit einer Depletion von CD4 $^{+}$  T-Lymphozyten, durch 20 wöchige Injektion von CD4-monoclonalen Antikörpern und Fettdiät für 30 Wochen (Emeson et al.1996) zeigten eine deutliche Reduktion der atherosklerotischen Areale. In derselben Weise wie zuletzt geschildert, wurde auch eine CD8 $^{+}$ T-Zell Depletion vorgenommen, die jedoch ohne Effekt blieb.

## Makrophagen und ihre Funktionen in der Pathogenese der Atherosklerose

Makrophagen sind in allen Stadien der Atherosklerose in der Gefäßwand zu finden (Gown et al.1986; Jonasson et al.1986). Die in atherosklerotischen Läsionen vorhandenen Makrophagen exprimieren MHC II und HLA-DR (Hansson et al.1989; Jonasson et al. 1986; van der Wal et al.

**Tabelle 7.: Funktionen von Makrophagen in der Pathogenese der Atherosklerose (nach Ross 1993, erweitert)**

Funktionen	Mediatoren
Antigenpräsentation und Aktivierung	MHC II, HLA-DR, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8
Produktion von Wachstumsfaktoren	Wachstumsagonisten: PDGF, TGF $\beta$ , bFGF, TNF $\alpha$ , GM-CSF, M-CSF, VEGF Wachstumsantagonisten: IL-1, TGF $\beta$ ,
Chemotaxe VSMCs	ox.LDL, TGF- $\beta$ , PDGF
Synthese proinflammatorischer Zytokine	IL-1, MCP-1, IGF-1, M-CSF, GM-CSF, bFGF, IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , PGE, TNF $\alpha$
Chemoattractant-Bildung	GM-CSF, M-CSF, VEGF, bFGF, MCP-1, TGF $\beta$ , PDGF, ox.-LDL
Schaumzellbildung, Phagozytose von modifiziertem LDL, Oxidation von Lipoproteinen	Scavenger Rezeptoren etc.
Synthese matrix-degradierender Enzyme	MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-13
<b>Inhibition durch:</b> IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$	
Gerinnungsregulation	<b>Thrombogen:</b> Tissue Factor

1989) was den aktivierten Zustand zeigt (van der Wal et al.1989). Mit Hilfe weiterer kostimulatorischer Moleküle wie B7-1 und B7-2 können sie Antigene prozessieren und präsentieren und damit CD4+ T-Zellen aktivieren (Sprent 1995).

Makrophagen produzieren eine außerordentliche Vielzahl von Wachstumsfaktoren, im besonderen PDGF (Ross 1993) sowie IL-1 und TNF- $\alpha$  (Libby et al.1991), die zu der sekundären Bildung von PDGF durch Endothelzellen und glatte Muskelzellen führen. Zu den Faktoren, die an der Regulation des Zellwachstums von Endothelzellen, VSMCs und Makrophagen selbst beteiligt sind, gehören als Wachstumsagonisten: PDGF, GM-CSF, M-CSF, VEGF, bFGF, TGF $\alpha$ ; als Wachstums-Antagonisten für EC: IL-1 und TGF- $\beta$ . Darüberhinaus haben Makrophagen auch Wirkungen auf die Migration (Chemotaxe für VSMCs: ox LDL, TGF- $\beta$ , PDGF)

Proliferation und Syntheseigenschaften (u.a. Matrixproteine) der VSMCs und damit auf die Plaque-Zusammensetzung. Als wichtigste Chemoattractants sind GM-CSF, M-CSF, VEGF, bFGF, MCP-1, TGF- $\beta$ , PDGF und ox.LDL zu nennen (Ross 1993).

Interaktionen mit T-Zellen können in wechselseitiger Stimulation der Proliferation durch IL2 der MAC und CSFs der T-Zellen vor sich gehen (Ross 1993). Die in den frühen fatty streaks stattfindende Monozyten-Infiltration durch Vermittlung der Adhäsionsmoleküle und Transformation zu Schaumzellen durch Lipidakkumulation ist mittlerweile breit etabliert (Gerrity 1981; Klurfeld 1985; Jonasson et al. 1986). Cholesterol Depots kommen vor allem im Zentrum der Plaques vor, sind meist intrazellulär und bestehen zum großen Teil aus Schaumzellen, die sich aus

Makrophagen entwickelt haben (Aquel et al.1984; Gown et al.1986; Vedeler et al. 1984). Das Cholesterol wird über Scavenger Rezeptor-vermittelte Aufnahme (Matsukomoto et al.1990) von modifizierten Lipoproteinen angesammelt (Brown et al.1983; Steinberg et al.1989). Daneben wird ein „putative“ ox. LDL-Rezeptor angenommen (Ross 1993). Die Expression der Scavenger Rezeptoren ist Zytokin reguliert. Sowohl IFN- $\gamma$  (Geng et al.1992) als auch TNF $\alpha$  (Van Lenten et al.1992) inhibieren die Expression durch Reduktion des mRNA levels. Dadurch wird die Aufnahme von Lipoproteinen und von Cholesterin reduziert und die Transformation von Makrophagen in Schaumzellen inhibiert (Geng et al.1992). Stattdessen werden immunologische Funktionen aktiviert wie die Expression von MHC-Genen und die Produktion von oxygen Radikalen (Adams et al.1984). Die Freisetzung von MMPs durch MAC ist ein wichtiger Faktor in der Plaque Ruptur (Schönbeck et al. 1997), der ebenfalls durch IFN- $\gamma$  und TNF $\alpha$  gehemmt wird.

### **Tiermodelle zur Funktion der Makrophagen in der Atherosklerose**

Zur Beteiligung von Makrophagen sind die Ergebnisse noch eindeutiger als zu den T-Zellen. MCP-1 (Monozyten chemotactic Protein) oder CCR2 (sein Rezeptor) defiziente Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion ihrer atherosklerotischen Läsionen, was nahe legt, dass die Monozyten-Rekrutierung über diesen Weg eine entscheidende Rolle bei der Atherosklerose spielt. (Gu et al.1998; Boring et al.1998).

Das Zytokin M-CSF stimuliert die Proliferation und Differenzierung von Makrophagen und beeinflusst viele weitere Makrophagen-Funktionen wie die Expression von Scavenger Rezeptoren. Die Kreuzung von Mäusen mit einem defekten M-CSF Gen mit Apo-E<sup>-/-</sup> Mäusen bewirkte eine starke Hypercholesterolämie, jedoch dramatisch verringerte atherosklerotische Läsionen. Ein Ergebnis, das eine obligatorische Rolle von Makrophagen für die Läsionsformation nahelegt (Smith et al.1995).

In einer weiteren Studie von Smith wurden Mäuse mit einer osteopetrotic (op) Mutation im M-CSF Gen und erniedrigten Monozyten und Gewebemakrophagen mit Apo-E<sup>-/-</sup> Mäusen gekreuzt. Gefüttert mit einer low-fat chow diet entwickelten diese Tiere signifikant kleinere Läsionen trotz höherer Serum Cholesterol-Werte von 1300 mg/dl als die ApoE-defizienten Mäuse, was ein Hinweis ist, dass die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen abhängig von den Makrophagen ist (Smith et al.1995).

Durch die genannten Funktionen wird der Makrophage oft als der prinzipielle Entzündungsmediator für Zellen im Plaque Microenvironment angesehen, der durch T-Zell-Funktionen reguliert wird. Die Ergebnisse dieser Tiermodelle unterstreichen diese Hypothese.



## Vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMCs) und ihre Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose

In der Gefäßwand kommen glatte Muskelzellen in zwei Phänotypen vor, die ineinander übergehen: der kontraktile Phänotyp, der auf vasokonstriktische und vasodilatative Substanzen reagiert und der synthetische Phänotyp, der zur Zellteilung und Proliferation fähig ist, auf regulierende Mitogene wie PDGF oder Wachstumsinhibitoren wie TGF- $\beta$  reagiert und die zelluläre Ausstattung zur Synthese wachstumsregulierender Moleküle und extrazellulärer Matrix hat (Kollagen, Elastin und Proteoglykane) (Ross 1993). Mittlerweile ist wahrscheinlich, dass im Rahmen der Atherosklerose der Phänotyp vom kontraktilen zum synthetischen Typ wechselt, der zur Migration aus der Media in die Intima fähig ist (Ross 1993), aktiv (Bildung von bFGF, IGF-1, IL-1, MCP-1, M-CSF, GM-CSF, PGE, TNF- $\alpha$ ) und reaktiv an den komplexen immunologischen Interaktionen teilnimmt und die Hauptrolle in der fibroproliferativen Komponente der Plaques spielt. Das Ausmaß der Migration, Proliferation und synthetischen Aktivität in der Produktion von extrazellulärer Matrix der VSMCs ist eine wesentliche Komponente in der Pathogenese der Atherosklerose und in komplexe immunologische Vorgänge eingebunden. Zudem zeigte sich in den letzten 10 Jahren, dass VSMCs auch immunologische Funktionen in der vaskulären Entzündungsreaktion übernehmen.

**Tabelle 8: Funktionen vaskulärer glatter Muskelzellen in der Pathogenese der Atherosklerose**

Regulatoren	Funktionen	Mediatoren
<b>Stimulation:</b> TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , VCAM-1 IL-1 $\beta$ , ICAM-1	Vermittlung der Leukozytenakkumulation, Aktivierung monozytärer Zellen durch Adhäsionsmoleküle	ICAM-1, VCAM-1
<b>Stimulation:</b> PDGF, IL-1, GM-CSF, TNF $\beta$ , IL8 <b>Inhibition:</b> IFN $\gamma$ , PGE-1, PGE-2 <b>Migration:</b> TNF $\alpha$ <b>Chemotaxe:</b> GM-CSF	Proliferation und chemotaktische Migration	
<b>Stimulation :</b> IL-1, TNF $\alpha$ ,	Synthese proinflammatorischer Zytokine	IL-1, MCP-1, IGF-1, M-CSF, GM-CSF, bFGF, IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , PGE, TNF $\alpha$
<b>Induziert:</b> IFN $\gamma$ <b>Moduliert:</b> TNF $\alpha$ , Lymphotoxin	Antigenpräsentation	MHC II
<b>Stimulation:</b> IL-1, TGF- $\beta$ , PDGF <b>Hemmung:</b> IFN $\gamma$	Synthese der extrazellulären Matrix	Kollagen Typ I und III, Elastin, Proteoglykane.
<b>Stimulation:</b> IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ <b>Inhibition:</b> IFN $\gamma$	Synthese matrixdegradierender Enzyme	MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-13, MMP-9, MMP-2
Nicht bekannt	Inhibition der Matrixdegeneration	TIMP-1, TIMP-2
	Gerinnungsregulation	Thrombogen: Tissue Factor

### **B-Lymphozyten und die humorale Immunantwort**

Für eine humorale Immunantwort im Rahmen der Atherogenese gibt es wenige Hinweise. Eine Ablagerung von Immunglobulinen (Ig) und kolokalisierten Komplementfaktoren sowie eine starke Expression des C3b Rezeptors (CR1) und des C3bi Rezeptors (CR3) auf Makrophagen wird in atherosklerotischen Läsionen aber nicht in gesunden Gefäßen beobachtet (Hollander et al.1979). Eine humorale Immunantwort liegt zwar durch vorliegende Antikörpern gegen ox.LDL, Stress Proteine und infektiöse Agentien nahe (Salonen et al.1992), die verschwindend wenigen B-Zellen in atherosklerotischen Gefäßen aller Stadien (Xu et al.1990) machen es jedoch unwahrscheinlich, dass diese Ig lokal im Gefäß produziert werden.

### **Mastzellen**

Mastzellen sind im atherosklerotischen Plaque zu finden. Eine positive Korrelation der Anzahl mit dem Schweregrad Akuter Koronarsyndrome wurde in Studien belegt und ihre Funktion in den letzten Jahren diskutiert (Kaartinen et al.1994 und 1998; Kovanen et al.1995). Sie könnte in der Abgabe von Neutralen Proteasen Tryptasen und Chymasen, mit Degradierung der extrazellulären Matrix-Komponenten liegen. Durch ihre gegenüber Makrophagen und T-Zellen geringe Anzahl im atherosklerotischen Plaque bleibt ihre Rolle jedoch fraglich (de Boer et al.1999).

## **1.2.5. Atherosklerose –**

### **systemische Entzündungsreaktion und klinische Komplikationen**

Der Zusammenhang einer systemischen Entzündungsreaktion zur Atherosklerose zeigt sich in erhöhten Plasma-Werten für: Leukozyten (Kannel 1992), Fibrinogen, Komplementfaktoren, CRP (De Maat et al.1996; Ridker et al.2002) und IL-6. Die beiden letzteren sind bei troponinpositiven akuten Koronarsyndromen stärker erhöht (Whicher et al. 1999; Hoffmeister et al. 2000; Kokkunen et al.2001). Außerdem stieg die Anzahl der T-Lymphozyten wie auch die Expression von IL-2-Rezeptoren signifikant mit der klinischen Schwere (stabile-, instabile Angina Pectoris, Myokardinfarkt) akuter koronarer Syndrome (Van der Wal et al. 1998 ).

Im Bezug auf die genannten immunologischen Parameter muss man in Betracht ziehen, dass auch andere Faktoren wie hämodynamische Kräfte, Homocysteinspiegel, Geschlechtshormone, systemische Infektionen und Diabetes die immunologische Reaktionsbereitschaft modulieren. Beobachtet wird eine systemische, aus vielen Faktoren bestehende hochregulierte Entzündungsneigung (Lusis 2000). Eine abschließende Beurteilung ihrer klinischen Bedeutung ist zurzeit noch nicht möglich.

## 1.3. Fragestellung

Aus dem bisher Dargestellten geht hervor, dass EC (Yellin et al. 1995), und MAC (Stout et al. 1996) CD40 exprimieren. Direkt zu Beginn dieser Promotion und zugleich mit unseren internen Daten wurde erstmals die CD40 Expression auf VSMCs beschrieben (Mach et al. 1997). Die Daten zur CD40 Expression liegen in vitro und innerhalb von fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen in vivo in einzelnen humanen Stichproben vor. Das Vorkommen des CD40L/CD154 auf T-Zellen ist seit 1992 (Graf et al.) bekannt. Zu der Expression auf MAC, EC und VSMCs bestehen kontroverse Ergebnisse (Mach et al. 1997; Szabolcs et al. 2000; Büchner et al. 2003).

Die Aktivierung von CD40 auf den genannten Zellspezies führt in in vitro zur Expression von: Adhäsionsmolekülen, Proliferationsregulation, Neovaskularisierung, Synthese von Matrix Metalloproteinasen und proinflammatorischen Zytokinen sowie Funktionen der Gerinnungsregulation, also entzündungsrelevanten Prozessen.

Die Frage nach der CD40- und CD154 Expression in den frühen Stadien und besonders im Rahmen der Initiierung der Atherosklerose ist bislang ungeklärt. Auch das Ausmaß der Expression in gesunden Gefäßen mit eventuellen physiologischen Funktionen sowie im Verlauf der Pathogenese der Atherosklerose ist nicht beschrieben. Ebenso liegen zur histopathologischen Beschreibung der CD40 Expression innerhalb der Plaquemorphologie keine systematischen Daten vor.

Bislang sind T-Zellen der hauptsächliche Generator von CD154. Insofern stellt sich die Frage nach der Expression von CD154 im gesunden Gefäß, in der Phase der Initiierung der Atherosklerose, in den frühen Stadien und im Verlauf sowie der Verteilung innerhalb der Plaques.

**Vor diesem Hintergrund werden folgende Fragen untersucht:**

Von welchen Zellspezies: Endothelzellen, Makrophagen, vaskulären glatten Muskelzellen und T-Lymphozyten werden CD40 und CD154 in humanen Gefäßen expremiert ?

Werden CD40 und CD154 von den genannten Zellen in der Initiierungsphase und den frühen Stadien der Atherosklerose expremiert und in welcher Häufigkeit ?

Wie verläuft die Expression von CD40 und CD154 mit dem Fortschreiten der Atherosklerose ?

In welchen Teilen der Gefäßläsionen ist die CD40/CD154 Expression lokalisiert (Lipidkern, Schulter, Fibröse Kappe etc.) ?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

Die Untersuchung wurde mit Gewebeproben von Arteriae iliacae durchgeführt, die von 43 Patienten stammten. Wir erhielten sie mit freundlicher Erlaubnis und Unterstützung von Prof. Dr. med. P. Neuhaus, Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie und Oberarzt PD Dr. med. Utz Settmacher aus zurückbleibendem Material nach Lebertransplantationen der chirurgischen Klinik.

Zur Darstellung von CD154 (CD40 Ligand) wurden uns in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. K. Leder und Herrn Dr. med. P. Lippeck freundlicherweise Kryomaterial von 13 aktivierten Lymphknoten aus der Gewebebank des Institutes für Pathologie, Charite, Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2. Fixierung des Materials

Eingebettet in physiologische Kochsalzlösung, wurden die Gefäße in flüssigem Stickstoff bei  $-120^{\circ}\text{C}$  schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgekühlt aufbewahrt.

Mit Hilfe des Kryostaten wurden aus diesen Präparaten serielle  $5\mu\text{m}$  Schnitte angefertigt. Diese wurden zur Fixierung auf den Objektträgern (Menzel, Superfrost) für 10 min mit Aceton fixiert und 2 Stunden an der Luft getrocknet.

### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Hämatoxylin – Eosin - Färbung

##### Protokoll:

1. Fixieren in Formalin (10 min)
2. Färben in Hämatoxylin nach Mayer (5 min)
3. Spülen mit Aqua dest.
4. Bläuen in Aqua dest. bei  $30^{\circ}\text{C}$  (2min)
5. Färben mit Eosin (2 min )
6. Spülen mit Aqua dest.
7. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100%, je 3 min)
8. Entalkoholisieren in Xylol (5 min)
9. Eindecken mit Kaysers Glycerin – Gelatine (erwärmt)

### 2.2.2. Fettfärbung mit Sudan III (Kryostatschnitte)

#### Protokoll:

1. in 50% Alkohol einlegen (3 min)
2. Färben mit Sudan III (gekühlt, 30 min)
3. Spülen mit Aqua dest.
4. Kerngegenfärbung mit Hämalaun (5 min)
5. Spülen mit Aqua dest. (5 min)
6. Bläuen in fließendem Leitungswasser
7. Eindecken mit Kaysers Glycerin–Gelatine (erwärmt)

### 2.2.3. Immunhistochemische Methoden

Diese erfolgen für die CD40 Expression und die Abgrenzung der Zellarten in der **APAAP (Alkalische Phosphatase anti alkalische Phosphatase)** Technik. Diese Färbungen wurden mit Hilfe des Dako, Tech mate 500 Plus, hergestellt. Die Schnitte wurden dazu auf Kapillarspaltobjektträger, 75 µm, Dako aufgezogen.

Das verwendete Programm war APAAP I („Friedo“ - interner Name des Institutes für Pathologie, Charite Universitätsmedizin Berlin), ohne Wiederholung.

Die Färbungen von Hand zur Darstellung von CD154 und der Koexpression von CD40, ICAM-1, VCAM-1 und MMP-2 erfolgten zusätzlich mit dem „Histostain Plus Kit“, des „Zymed second Generation Lab-Sa Detection System“ für ein breites Antikörperspektrum, mit dem Maus- und Kaninchenantikörper angewendet werden können. Dieses System arbeitet mit der **Labeled Streptavidin Biotin Methode**.

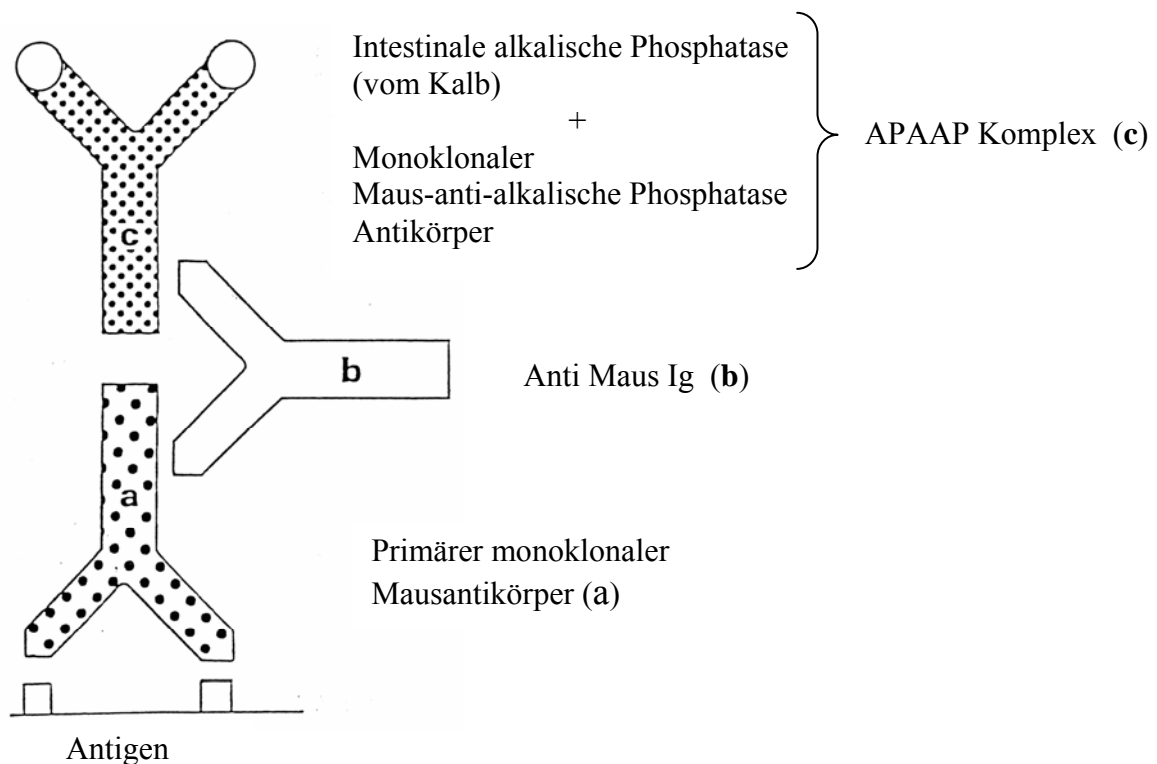
Die **Avidin Biotin Complex Methode (ABC)** wurde zur Darstellung von CD154 ebenfalls im Dako Tech mate 500 als eigenes Programm durchgeführt.

#### 2.2.3.1. APAAP (Alkalische Phosphatase anti alkalische Phosphatase) Methode

Die APAAP-Methode beruht auf einer Antigen-Antikörperreaktionen. Es werden drei Reagenzien verwendet: Primärantikörper, Sekundär- oder Brückenantikörper und der APAAP – Komplex. Dieser Komplex besteht aus dem Enzym alkalische Phosphatase (AP), das letztendlich in einer Enzym-Substratreaktion mit dem zuletzt zugeführten Chromogen und einem gegen AP gerichteten Antikörper die Farbreaktion hervorruft. Der Primärantikörper, ein monoklonaler (muriner) Antikörper ist spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichtet. Der APAAP-Komplex enthält ebenfalls Maus-Immunglobulin der IgG-Klasse. Der Brückenantikörper (Anti-Maus-Ig) kann sich deshalb sowohl an den Primärantikörper als auch an den An-

tikörper des APAAP Komplexes binden. Der Brückenantikörper wird im Überschuss zugefügt, deshalb bindet sich nur eines seiner zwei Fab-Fragmente an den Primärantikörper, das zweite bleibt frei zur Bindung an den Antikörper des APAAP-Komplexes. Je nach benötigter Spezifität und Sensitivität können verschieden viele Inkubationen durchgeführt werden. Es entsteht dabei ein mehr oder weniger großer „Baum“ aus Tertiärantikörpern und dadurch ein stärkeres Signal (s. Abb2 und 3). Das Enzym alkalische Phosphatase wird im letzten Schritt durch eine Substrat-Chromogenreaktion sichtbar gemacht.

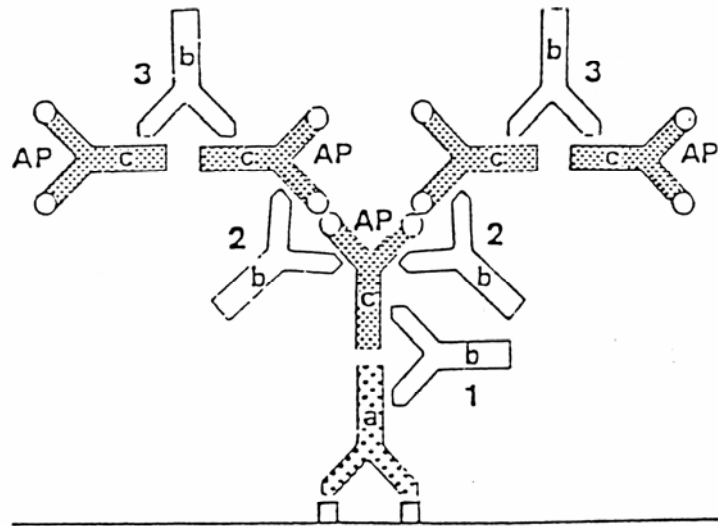
**Abb. 2: Schematische Darstellung der APAAP Technik**



**a** = Primärer monoklonaler Antikörper, **b** = Anti-Maus Ig, **c** = APAAP Komplex

APAAP-Methode: Der Primärantikörper und der Antikörper des APAAP-Komplexes müssen von derselben Tierart (in diesem Fall Maus) stammen, damit der Brücken-anti-Maus-Antikörper die beiden binden kann. Der vorgeformte APAAP-Komplex reagiert zuletzt mit dem Chromogen zur Farbreaktion.

**Abb. 3: Schematisches Diagramm der amplifizierten APAAP Technik**



**a** = Primärer monoklonaler Antikörper,    **b** = Anti-Maus Ig,    **c** = APAAP Komplex  
1,2,3 = Anzahl der Inkubationszyklen (Vergrößerung des Baumes)

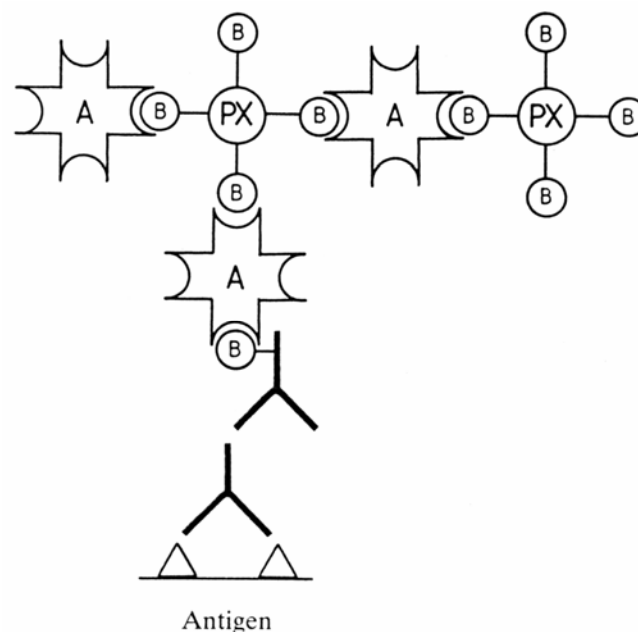
Liegt für den Primärantikörper kein Mausantikörper vor, wie in dieser Studie der CD3-Antikörper (rabbit), muss ein Verbindungsantikörper zugesetzt werden. Anti-CD3 beispielsweise ist ein polyklonaler Kaninchen-anti-Mensch Antikörper und benötigt einen Mäuse-anti-Kaninchen Antikörper als Zwischeninkubation (informell „Mausifizierung“), so dass daraufhin die beiden Mäuse-Antikörper mit dem normalen Sekundärantikörper wieder verbunden werden können.



### 2.2.3.2. Streptavidin - Biotin Amplifikation

Avidin ist die Grundlage dieser Methode. Es ist ein Glykoprotein, das aus Hühnerei gewonnen wird und eine hohe Affinität zu Biotin hat. Streptavidin wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidii* isoliert, besitzt keine Kohlenhydratseitenketten und hat einen isoelektrischen Punkt im neutralen pH Bereich. Daher hat Streptavidin eine geringe Neigung zu unspezifischen Bindungen. Freie Bindungsstellen am Avidin des Avidin-Biotin- oder Streptavidin-Biotin-Komplexes oder enzymgekoppeltes Avidin binden sich an das Biotin des Brückenantikörpers. Dieser muss nicht im Überschuss zugegeben werden, da freie Fab-Teile nicht zur Bindung benötigt werden. An den primären Antikörper eines breiten Spektrums bindet ein sekundärer Antikörper, der schonend an Biotin gekoppelt ist. An das Biotin wird „enhanced horseradish peroxidase conjugated Streptavidin“ (HRP-SA) oder Avidin zusammen mit einer Peroxidase gebunden. Diese Enzyme entwickeln mit Hilfe des Chromogens das farbige Signal. Eine Fehlermöglichkeit dieser Methode liegt in der endogenen Peroxidase, die z.B. in roten und weißen Blutkörperchen vorkommt. Die Substrat Chromogenreaktion färbt diese mit. Dies führt zu einer unspezifischen Hintergrundreaktion. Zur Vermeidung kann man die physiologische Peroxidase vor der Färbung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blockieren (s. umseitiges Protokoll).

**Abb.4: Streptavidin- Biotin-Komplex Methode**



A= Avidin, B = Biotin, PX = Peroxidase, Primärantikörper in Bindung zum Antigen, Biotinylierter Sekundärantikörper, der den Biotin-Streptavidin-Peroxidasekomplex bindet.

## Protokoll:

1. Inkubation mit „Peroxidase quenching solution“ (besteht für Kryostat Schnitte aus 1 Teil 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 5 Teilen Methanol ) zur Elimination der im Präparat vorhandenen endogenen Peroxidase für 10 min
2. Waschen mit PBS (2-3 mal)
3. trockene fixierte Schnitte mit Protein blocking solution vollständig bedecken. (Von jetzt an darf der Schnitt nicht mehr trocken werden)
4. Blocking solution abklopfen, nach jedem feuchten Schritt rundherum mit Kim Wipes vorsichtig trocken wischen
5. Den mit „antibody diluent“ verdünnten **Primärantikörper** (Verdünnungen der Primärantikörper s. Tab. 9) auf den Schnitt aufbringen und 24 h bei 4°C inkubieren
6. Den Primärantikörper abklopfen und mit PBS spülen (3 mal)
7. **Biotinylierten Sekundärantikörper** aufbringen und 10-15 min. inkubieren
8. Abklopfen, mit PBS Spülen (3 mal)
9. **Enzymkonjugat** auf den Schnitt auftragen und 10 min. inkubieren
10. Abklopfen, mit PBS Spülen (3 mal)
11. **Chromogen Substrat** / AEC-Single Solution aufbringen, 5-7 min inkubieren
12. Abklopfen, mit Aqua dest. spülen
13. Schnitte in Hämatoxylin gegenfärben
14. Objektträger mit 2 mal 60 Dipps in Aqua dest. spülen
15. Schnitte mit erhitzter Kaisers Glycerin Gelatine eindeckeln
16. Zur Stabilisierung am nächsten Tag die Deckglasränder mit durchsichtigem Nagellack versiegeln

**Darstellung der einzelnen Zelltypen mittels monoklonaler Antikörper gegen:**

<b>Zelltypen:</b>	<b>Zellspezifische Antikörper:</b>
VSMCs	$\alpha$ -smooth muscle actin
Makrophagen	CD68
Endothelzellen	von Willebrandt Faktor / F8
T-Zellen	CD3

Als **Negativkontrolle** diente:

eine Behandlung mit Verdünnungsmedium ohne Antikörper bei der APAAP-Methode am Tech mate und mit unspezifischem Immunglobulin G1 (Sigma) bei der Streptavidin- Biotin Methode.

**Tab. 9.: Monoklonale (murine) Antikörper:**

<b>Antikörper gegen:</b>	<b>Hersteller:</b>	<b>Code :</b>	<b>Clone :</b>	<b>Verdünnung :</b>
Von Willebrandt Faktor (Faktor 8)	Dako (Glostrup/ Denmark)	M616	F8 / 86	1 : 7000
$\alpha$ -Smooth muscle aktin	Dako	M0851	1 A4	1 : 200
CD68	Dako	M0718	EBM 11	1 : 300
CD3 (polyklonal, rabbit anti human)	Dako	A452	Lot 035	1 : 700
CD40	Santa Cruz Biotechnology (Santa Clara Californien)	Sc-975	5C3	1 : 400
MMP-2	Santa Cruz	Sc-6838	C19	1 : 1000
VCAM-1	Santa Cruz	Sc-1504	C19	1 : 1000
ICAM-1	Santa Cruz	Sc-107	15.2	1 : 1000
Immunglobulin 1 control antibody	Sigma (Saint Louis, Missouri)	P4685	MOPC 21	1 : 1000
Mouse anti Rabbit-Ak	Dako	M0 730	MR12/53	1 :200
CD40 Ligand (CD154)	genzyme	MAB617	40 80 4	1 : 25 - 1 :200
	Immunotech	1842	TRAP-1	1 : 25 - 1 :200
	Calbiochem	217595	24-31	1 : 25 - 1 :200
	Santa Cruz	Sc-1593	D-19	1 : 25 - 1 :200

### **2.3. Histologische Auswertung der Präparate**

Die Präparate wurden lichtmikroskopisch anhand der HE- und Sudanfärbung in Stadien klassifiziert und anhand der immunhistochemischen Färbungen ausgewertet.

Die Stadieneinteilung erfolgte nach den Kriterien der American Heart Association (AHA) und der World Health Organisation (WHO) unter Aufsicht von Frau Dr. K. Leder und Herrn Dr. P. Lippeck, Mitarbeiter des Pathologischen Instituts der Charite, Campus Virchow Klinikum, Humboldt Universität Berlin.

Die Infiltrate, definiert als Ansammlung von mehr als 10 lymphomonocyitären Zellen pro Quadrat bei 100facher Vergrößerung, wurden in dem gesamten Gefäßquerschnitt gezählt.

Die relative Intimadicke wurde bei 400facher Vergrößerung nach Lautsch et al., die relative Mediadicke ebenfalls bei 400facher Vergrößerung gemessen und der Intima / Media-Quotient als Verhältnis dieser beiden Parameter bestimmt (Lautsch et al. 1953).

### **2.4. Stadieneinteilungen im Vergleich**

Der kontinuierliche, dynamische Prozess der Atheroskleroseentstehung wurde zur pathologischen Einteilung vielfältig klassifiziert. Zur Vereinheitlichung dieser Bemühungen haben die World Health Organisation in den 50er - (WHO 1958) und die American Heart Association in den 90er Jahren, Komitees aufgestellt, die internationale Maßstäbe setzen sollten (Stary et al. 1994, 1995, 2000). Beide Ansätze beruhen auf morphologischer, makroskopischer und mikroskopischer Klassifizierung. Die gängigste Version ist die der WHO. Am ausführlichsten ist die von Stary und Komitee entwickelte Stadien-Einteilung der AHA, von der eine von Gown et al. zusammengefasste Version besteht (Gown et al. 1986). Ein Vergleich der Einteilungen liegt in der Tabelle auf Seite 42 vor.

Mit der Festlegung der heterogenen Morphologie atherosklerotischer Läsionen nach definierten Kriterien in die V-VIII Stadien wurde ein Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher Untersucher möglich.

#### **2.4.1. Stadieneinteilung der American Heart Association**

Angefertigt als AHA Medical/Scientific Statement vom AHA SAC/ Steering Committee in drei Etappen von 1991-1995. Auf der Grundlage der zusätzlichen physiologischen Veränderungen werden die atherosklerotischen Plaques in 8 Stadien eingeteilt.

### **Physiologische Veränderungen**

Unabhängig von der Stadieneinteilung des pathologischen Geschehens wird von der AHA die Intimaverdickung und „Atherosclerosis Prone Region“ betrachtet. Hiernach kommt eine Intimaverdickung häufig in den gesunden Gefäßen von Patienten aller Altersstufen vor und repräsentiert die physiologische Adaptation der Intima an einen veränderten Durchfluß oder erhöhte Wandspannung. Meist liegen hämodynamische Ursachen wie erhöhte Pulsfrequenz, erhöhter Blutdruck, Durchflussrate, „tensile Stress“ oder reduzierte Scherkräfte zugrunde. Eine Intimaverdickung kommt vor allem an Bifurkationen und Abzweigungen von Gefäßen vor. Sie ist entweder exzentrisch (relativ abrupte, fokale Verdickung, an Abzweigungen oder Öffnungen, meist halbmondförmig) oder diffus (meist die gesamte Circumferenz betreffend, weiter ausgebreitet, nicht bestimmten Stellen des Gefäßbaumes zuzuordnen).

Funktionelle Veränderungen, die damit einhergehen sind ein erhöhter turnover der Endothelzellen (EC) und vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) sowie eine erhöhte Konzentration von LDL und anderen Plasmabestandteilen in der verdickten Intima.

Die Intimaverdickung ist zunächst eine gesunde Anpassungsreaktion der Gefäße. Zugleich werden fortgeschrittene Atherosklerosestadien hauptsächlich an den Stellen adaptiver Intimaverdickung gefunden. Zur weiteren pathologischen Entwicklung sind zusätzliche Schädigungen notwendig. Diese können z.B. in erhöhten LDL-Konzentrationen bestehen.

Die Intimaverdickung ist jedoch keine notwendige Voraussetzung zur Entwicklung der Atherosklerose, beispielsweise bei stark erhöhtem Plasma-LDL sind atherosklerotische Läsionen auch an nicht verdickten Stellen lokalisiert. Gefäße mit Intimaverdickung markieren nur die besonders sensiblen Stellen zur Einflussnahme atherogener Einflüsse.

### **Die histologische Einteilung erfolgt in acht Stadien**

#### **Typ I Frühe Läsionen („Initial lesion“):**

Vereinzelte Makrophagen und erste mikroskopisch und chemisch analysierbare Lipideinlagerungen, mit intrazellulären Lipidtropfen sind sichtbar. Dieser Typ tritt besonders in Regionen mit Intimaverdickungen auf.

#### **Typ II Fettstreifen („Fatty streak“):**

Die lipidbeladenen Makrophagen konfluieren hier zu Schaumzellbeeten, die auch lipidbeladene VSMCs, wenige T-Lymphozyten und vereinzelte Mastzellen beinhalten. Makroskopisch sind diese „fatty streaks“ häufig als gelbe Flecken oder Streifen sichtbar. Im Tierexperiment ist hier der turnover aller Zellen erhöht. Neben den für diese Läsionen typischen intrazellulä-

ren Lipidtropfen treten jetzt auch elektronenmikroskopisch nachweisbare extrazelluläre Lipidtropfen auf. Stary unterscheidet einen fortschreitenden („progression prone“) Typ IIa in der adaptiven intimalen Verdickung von einem („progression-resistant“) Typ IIb in der diffusen intimalen Verdickung.

### **Typ III Intermediäre Läsion (Präatherom):**

Charakteristisch für diese Übergangs- oder Typ III-Läsion, das Präatherom, ist die Akkumulation von mikroskopisch sichtbaren **extrazellulären** Lipidtropfen, zusätzlich zu den für den „fatty streak“ geltenden Kriterien. Eine Intimaverdickung liegt immer vor. Lipidtropfen liegen direkt unter den Schaumzellschichten, ersetzen die interzelluläre Matrix aus Proteoglykanen und verschiedenen Fasern und zerstören die Kohärenz struktureller VSMCs.

### **Typ IV Atherom:**

Diese Phase ist die erste, die als fortgeschrittene Läsion gilt, da sie sowohl die Akkumulation von Lipiden, Zellen und Matrix-Komponenten als auch den strukturellen Umbau und die Reparatur des Gefäßes beinhaltet. Oberflächendefekte oder -veränderungen wie Fissur oder Thrombose gehören nicht zu diesem Stadium.

Durch Konfluenz der Lipidpools entsteht ein lipidreicher Kern mit fester Lokalisation, gleichzeitig liegt ein erhöhter Bindegewebsanteil vor. Weiterhin liegt eine zelluläre Beteiligung von Schaumzellen, fettbeladenen VSMCs, Lymphozyten und wenigen Mastzellen vor.

Es ist hier von einer hohen klinischen Relevanz auszugehen, da die Bindegewebskappe noch relativ dünn ist, aber die Makrophagen schon proteolytische Aktivität ausüben. Es besteht die Gefahr der Rupturierung und des direkten Überganges in Typ VI.

### **Typ V Fibroatherom :**

Hier handelt es sich um die typische fortgeschrittene Läsion, bei der zu dem Atheromkern eine prominente Bindegewebsneubildung hinzutritt, die sogenannte fibröse Kappe, die das Atherom zum Lumen hin abgrenzt.

Die **Media** ist in diesem Stadium immer mit einbezogen, die VSMCs sind disarrangiert und in der Zahl vermindert. Hinzu kommt eine Infiltration von Lymphozyten, Makrophagen und Schaumzellen. Besonders im Randbereich zur Adventitia kommt es zur Anhäufung von Immunzellen, wie auch in dieser selber.

Desweiteren werden drei Unterkategorien beschrieben:

**Typ Va** stellt das Fibroatherom dar, bestehend aus verschiedenen Lagen von Lipidkernen und Bindegewebsschichten (multilayered).

**Typ Vb** beinhaltet einen höheren Anteil an Kalzifizierungen.

**Typ Vc** bezeichnet die fibrotische Läsion mit wenig oder keiner Fetteinlagerung und einem hohen Bindegewebsanteil.

**Typ VI Komplizierte Läsion:**

Hier geht es um thrombohämorrhagische Komplikationen, welche in der Regel durch einen Einriß der fibrösen Kappe entstehen.

- **VIa** : Rupturierung der Oberfläche mit gleichen Anteilen an Thrombus und Hämorrhagie
- **VIb** : Hämatom, Hämorrhagie, hämorrhagische Plaqueeinblutung
- **VIc** : Thrombose, murale oder okklusive thrombotische Komponente
- **VIabc** : Kombination von allen drei.

**Typ VII: Kalzifizierende Läsion:**

Das Kriterium dafür ist das Dominieren kalzifizierender, in der Regel im Atheromkern gelegener, nekrotischer Areale.

**Typ VIII: Fibrotische Läsion:**

Ein zellarmes, kollagenes Bindegewebe bestimmt das Bild. Insgesamt eher als narbiger Ausheilungszustand, denn als Komplikation anzusehen.

**2.4.2. Modifikation der AHA Klassifikation**

Diet et al. haben 1996 auf der Grundlage von Gown et al. (1986) die Klassifikation der AHA zur leichteren praktischen Anwendung in vier Stadien zusammengefasst:

**Klasse I Keine Atherosklerose (Nonlesional Areas) :**

Entspricht normalen, gesunden Gefäßen und der AHA Klassifikation, Typ I

**Klasse II Fibröse-lipidreiche-Läsionen (Fibro-fatty lesions):**

Korrespondiert mit der AHA Klassifikation Typ II und III

**Klasse III Fibröser Plaque (Fibrous Plaque):**

Entspricht der AHA Klassifikation Typ IV, Va und Vb

**Klasse IV Fortgeschrittener Plaque:**

Entspricht AHA Klassifikation Vc und VI.



### **2.4.3. WHO Klassifikation:**

Die WHO schlägt eine einheitliche Terminologie für folgende Stadien vor (WHO Tech Rep Series, 1958 ):

#### **Stadium 0 : Normale Arterie**

Sie ist charakterisiert durch keine oder eine diffuse (konzentrische) Intimaverdickung und eine intakte Media. Nur wenige Makrophagen befinden sich auf der Intima.

#### **Stadium 1: Frühe Läsion:**

Fettstreifen („fatty streak“) treten als erste sichtbare, oberflächlich gelbliche Flecken auf. Das Stadium ist charakterisiert durch Schaumzellen und erste extrazelluläre Fetteinlagerungen, Vermehrung von lockerem Bindegewebe und kleinen Gruppen von zusammenliegenden Makrophagen. Die luminale endotheliale Lage ist variabel intakt, die Media unverändert.

#### **Stadium 2: Fortgeschrittene Läsion:**

Es liegt ein fibröser Plaque, eine umschriebene, erhabene, feste und grauweiße Intimaverdickung sowie ein Atherom – ein atherosklerotischer Plaque mit prädominanter „fettiger“ Erweichung - vor. Charakteristisch ist eine fibröse Kappe, die über einem hypozellulären oder azellulären Lipidkern liegt. Es finden sich Makrophagen, T-Lymphozyten, Gefäßneubildungen und Kalzifizierungen in verschiedenem Ausmaß. Vermehrt sind VSMCs zu finden. Über dem fibrösen Plaque ist die F8-positive Endothelzellschicht nur in seltenen Fällen präsent.

#### **Stadium 3: Komplizierte Läsion:**

In den Läsionen treten zusätzliche Veränderungen wie Blutung, Thrombose, Ulzeration und Verkalkung auf. Diese Klasse ist ein Sammelbecken für ein breites morphologisches Spektrum. Es beinhaltet eine massive Intimaverdickung, Lumeneinengung, extensive Kalzifizierungen, frische und reorganisierte Gefäßthromben. Makrophagen und VSMCs liegen stark vermehrt vor. Außerdem sind auch Lymphozyten deutlich sichtbar, die mit den Makrophagen an der Plaque Schulter zu Haufen angesammelt sind (Infiltrate). Die Lamina elastica interna ist unterbrochen, die Media in ihrer Architektur zerstört. Eine stärkere Vaskularisierung in Intima und Media liegt vor. Die meisten Schnitte weisen keine Endothellage mehr auf.

Die Entsprechungen zur AHA Klassifikation sind der Tabelle auf Seite 43 zu entnehmen.

## **2.5. Analyse der CD40-Expression**

Die CD40-Expression der einzelnen Zelltypen wurde ausgewertet: die Zellarten wurden anhand der spezifischen Morphologie und mittels der speziellen immunhistochemischen Färbung in den 5µm Serienschnitten bestimmt. Jeweils 9 zufällige Gesichtsfelder (High-Power-Fields/ HPF, Vergrößerung 400x ) wurden ausgezählt. Sowohl die Gesamtzahl der einzelnen Zellen einer Spezifität als auch die Anzahl der CD40 exprimierenden Zellen unter ihnen wurden ermittelt.

Daraus wurden die Mittelwerte und der prozentuale Anteil der CD40 exprimierenden Zellspezies berechnet.

Dieses Verfahren wurde in Bezug auf die Auswertung der Intima und der Media angewendet.

## **2.6. Statistische Analyse**

Mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests für nicht-parametrische Tests wurde der Anstieg der Intimadicke, die Anzahl der Infiltrate und die prozentuale CD40-Expression von Stadium zu Stadium analysiert.

Die Korrelation der prozentualen CD40-Expression einer Zellspezies zur Intimadicke und Anzahl der Infiltrate als Parameter der Progression der Atherosklerose wurde unter Anwendung der Rangkorrelation nach Spearman berechnet. Ein p-Wert < 0,05 galt als statistisch signifikant.

# Stadieneinteilungen der Atherosklerose

American Heart Association (Stary et al. 1994-2000)	Histologie	Einteilung nach Diet und Gown et al. 1986	Einteilung der WHO 1958	Klinische Relevanz	Reversibilität
<b>0</b> Gesundes Gefäß		<b>Klasse I No Atherosclerosis</b> Keine oder nur konzentrische neointimale Verdickung. Intakte Media.	<b>Stadium 0</b> <b>Normale Arterie</b>	Läsionen klein und klinisch stumm (AHA)	ja
<b>I</b> Initial lesion	Einzelne Schaumzellen, intrazelluläre Lipidtropfen, chemisch analysierbar	Keine oder sehr wenige MACs.			ja
<b>II</b> Fatty streak	Konfluierende Schaumzellbeete, hauptsächlich intrazelluläre Lipidtropfen	<b>Klasse II Fibrofatty lesions</b> Intra- und extrazelluläre Fetteinlagerung Endothel intakt,	<b>Stadium 1</b> <b>Frühe Läsion</b> Fettstreifen, erste sichtbare oberflächliche gelbliche Flecken.		ja
<b>III</b> Intermediate Lesion / "Präatherom"	Mikroskopisch extrazelluläre Lipidakkumulation, neointimale Verdickung	Gruppen von MACs lockeres Bindegewebe.			unbekannt
<b>IV</b> Atherom	Kern aus extrazellulären Lipiden und dünne Fibroseschicht	<b>Klasse III Fibrous Plaque</b> Hypozellulärer Lipidkern mit Bindegewebs-Kappe, Microvessels, MACs, VSMCs, T-Zellen, bei Fortschreiten Kalk.	<b>Stadium 2</b> <b>Fortgeschrittene Läsion</b> Erhabene, feste, grauweiße Intimaverdickung und Atherom, fibröser Plaque.	Keine eindeutige klinische Korrelation mehr. IV Lumen kaum eingengt, dünne fibröse Kappe, Plaquerupturrisiko hoch. Direkter Übergang zu VI möglich.	unbekannt
<b>V Fibrous Plaque</b> <b>Fibroatherom</b>	a. Fibroatherom: Lipidkern und fibrotische Areale	<b>Klasse IV Advanced Plaque</b> Media nicht intakt. Lamina elastica interna zerstört, Endothel nur partiell intakt.			Unbekannt
	b. Kalkeinlagerungen				
	c. Ausgeprägte Fibrose				
<b>VI Complicated lesion</b>	Massive Intimaverdickung, heterogene Plaquemorphologie a. Ruptur / Fissur b. Thrombus c. Einblutung/ Hämorrhagie		<b>Stadium 3</b> <b>Komplizierte Läsion</b> Blutung, Thrombose, Ulzeration und Verkalkung.		unbekannt

### 3. ERGEBNISSE

43 Präparate humaner Arteriae iliacae wurden in dieser Untersuchung auf ihre CD40 Expression hin analysiert. Dazu fand mit Hilfe der Färbungen Hämatoxylin-Eosin und Sudan-III-Rot die Klassifizierung in die Stadien der WHO statt: 9 Arterien wurden als Stadium 0, 13 als Stadium 1, 9 als Stadium 2 und 12 Arterien als Stadium 3 klassifiziert. Außerdem wurden die Anzahl der Infiltrate und die Mediadicke bestimmt.

**Tabelle 11. Übersicht der untersuchten Parameter und Ergebnisse**  
(Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM)

<b>Atherosklerose- stadien WHO</b>	0	1	2	3
<b>Anzahl Art. iliacae</b>	9	13	9	12
<b>Intimadicke (mm)</b>	0,03 $\pm$ 0,004	0,31 $\pm$ 0,045	1,4 $\pm$ 0,21	2,47 $\pm$ 0,25
<b>Anzahl der Infiltrate (n/HPF)</b>	0	1,69 $\pm$ 0,35	4,00 $\pm$ 1,19	9,67 $\pm$ 1,50
<b>Mediadicke (mm)</b>	0,58 $\pm$ 0,14	0,77 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,10	0,36 $\pm$ 0,04

Untersucht wurden Intima und Adventitia immunhistochemisch in bezug auf die CD40-Expression in Makrophagen (MAC), Glatten Muskelzellen (vascular smooth muscle cells / VSMCs) und Endothelzellen (EC). Eine Auswertung fand im Bezug auf die Histomorphologie und als semiquantitative Analyse statt.

Zudem wurde eine statistische Analyse der prozentualen Expression von CD40 und deren Korrelation zu den Stadien der Atherosklerose sowie der Intimadicke und der Anzahl an Infiltraten durchgeführt.

Gesondert fand eine Untersuchung des CD40Liganden/CD154 in Kryo-Lymphknotenschnitten und in atherosklerotischen komplizierten Läsionen statt. Dazu wurden Lymphknoten mit drei verschiedenen immunhistochemischen Verfahren untersucht (s. Material und Methoden).

### **3.1. Histomorphologische Beschreibung der Resultate in der Intima**

#### **3.1.1. Histomorphologie der Gefäßschnitte im WHO-Stadium 0**

Es handelt sich bei dem WHO-Stadium 0 um Gesunde Gefäße (n = 9). Für diese ist eine schmale, intakte Intima, bestehend aus einer Lage Endothelzellen, mit minimalem subendothelien Raum, ohne neointimale Veränderungen, entzündliche Infiltrate oder Lipideinlagerungen charakteristisch. Eine geringfügige, konzentrische Intimaverdickung, von der AHA als physiologische Intimaverdickung oder „Atherosclerosis Prone Region“ bezeichnet, kann vorliegen.

Die Intimadicke in diesem Stadium beträgt im Mittelwert  $0,03 \pm 0,004$  mm.

Die Media ist intakt und nimmt mit  $0,58 \pm 0,14$  mm den Großteil des Gefäßdurchmessers ein.

#### **Verteilung der Zelltypen:**

In den immunhistochemischen Färbungen zeigt sich in der Intima ein geschlossener Monolayer aus intakten Endothelzellen und keine oder nur minimale intimale Zellen, die VSMC-Marker ( $\alpha$ -smooth muscle actin) exprimieren. Auch CD68/EBM11-positive Makrophagen (MAC) liegen nicht vor. Migration in das gesunde Gefäß ist in diesem Stadium nicht oder nur sehr vereinzelt sichtbar.

Die Media besteht aus einer Schicht dichter, gleichmäßiger VSMCs, ohne das Vorliegen von MAC.

In der Adventitia liegt eine gleichmäßige Infiltration mit MAC vor, die zu den Vasae vasorum hin zunimmt.

#### **CD40- Expression**

Da keine VSMCs oder MACs in der Intima vorliegen, wird durch die immunhistochemischen Färbungen für CD40 auf VSMC und MAC im Stadium 0 keine Expression nachgewiesen.

Die CD40 Expression der Adventitia wird im Verlauf gesondert geschildert.

### 3.1.2. Histomorphologie der Gefäßschnitte im WHO-Stadium 1

In den Arterien des WHO-Stadiums 1 (n = 13) zeigt sich eine exzentrische Intimaverdickung und weiter fortgeschrittene Entwicklung der Neointima.

Die Intimadicke nimmt zu ( $0,31 \pm 0,045$  mm). Der Intima /Media Quotient beträgt im Mittelwert  $0,42 \pm 0,05$ . In der Sudan III - Fettfärbung sind intra- und extrazelluläre Lipide sichtbar, die in Tropfen vorliegen und teilweise zu makroskopischen Streifen („fatty straks“) konfluieren. Ebenfalls liegen gehäuft Schaumzellen vor.

Sowohl VSMCs als auch MACs sind in diesem Stadium in die Intima migriert und durch die entsprechenden Primärantikörper nachweisbar. Wenige T-Zellen liegen vor. In der Intima sind monolymphozytäre Infiltrate als Ausdruck der beginnenden Immunreaktion sichtbar (Mittelwert  $1,69 \pm 0,35$  Infiltrate/Gefäßschnitt).

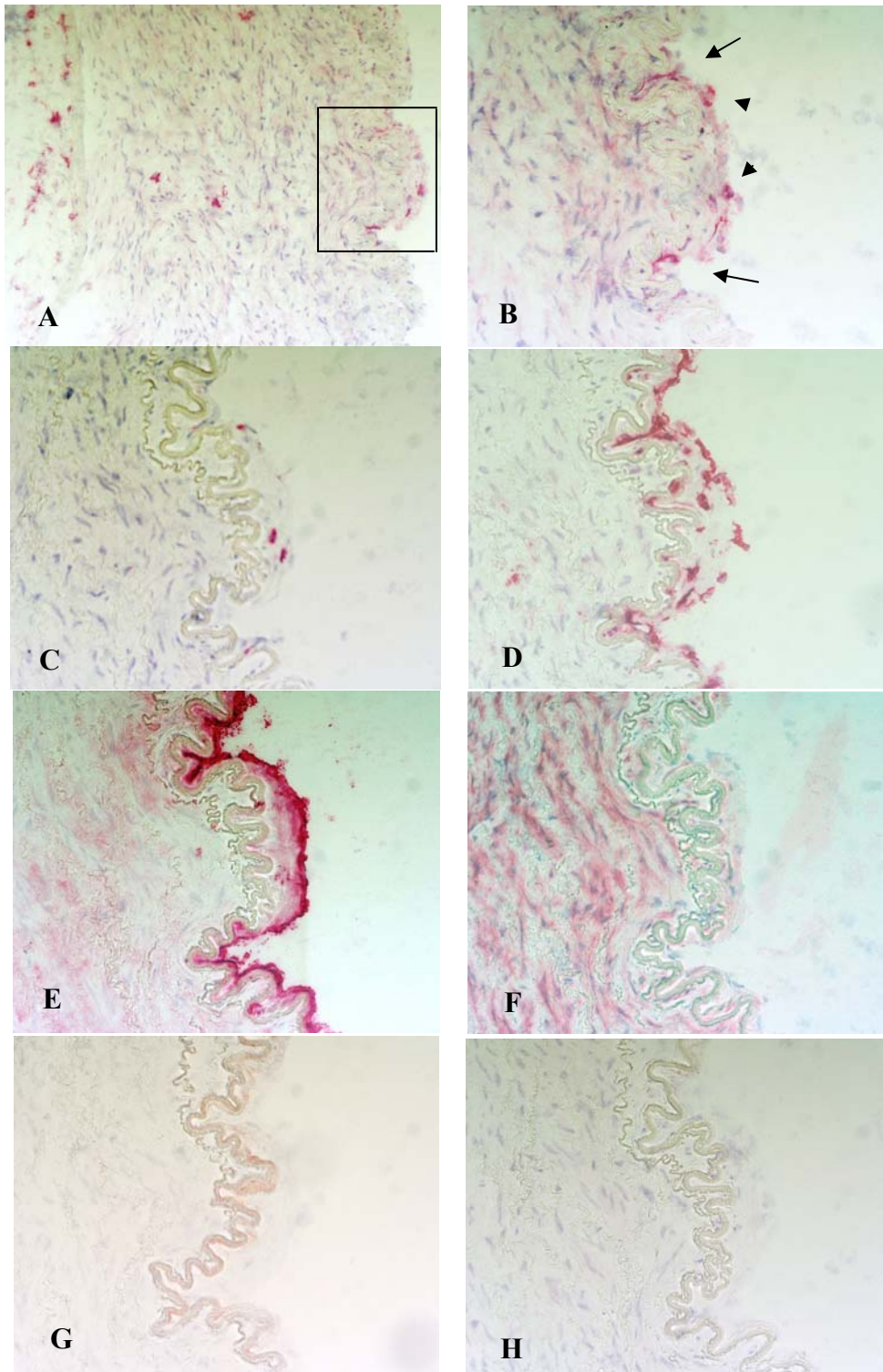
Die Lamina elastica interna und die Media sind weiterhin histomorphologisch intakt.

Die Adventitia ist wie zuvor beschrieben gleichmäßig mit MAC durchsetzt, die zu den Vasae vasorum hin zunehmen.

#### **Zelldifferenzierung:**

Wie genannt ist die spezifische Unterscheidung von MACs und VSMCs anhand der Markierung mit spezifischen immunhistochemischen Antikörpern auf den  $5\mu\text{m}$  Serienschnitten ( $\alpha$ -smooth muscle actin als Marker der VSMCs und CD68/EBM11 als Marker der MAC) und entsprechendem Vergleich der seriellen Präparate möglich. Ebenfalls charakteristisch ist die Morphologie dieser Zellspezies.

**Makrophagen** (MAC) variieren in ihren morphologischen Charakteristika in Abhängigkeit von ihrer Funktion und Lokalisation. Die freien Makrophagen sind  $12\text{-}20\mu\text{m}$  groß und in ihrer Oberfläche in der Regel irregulär. Es sind polymorphe, oft gelappte Zellen, die etwas plumper sind als Fibrozyten. Es kommen kurze, dicke Pseudopodien vor, aber auch Fältelungen, Protrusionen und Einstülpungen der Zellmembran (Erscheinungen, die mit der Phagozytose in Zusammenhang stehen). Ihr Kern ist rund und chromatinreich, das Zytoplasma meist hell-basophil. Ortsständige Makrophagen (Histiozyten) sind spindel- oder sternförmig und haben einen ovalen Kern mit dichtem Chromatin. Häufig liegen sie interzellulären Fasern an. Sie ähneln Fibroblasten.



**Abb.5:**  
**CD40 Expression im frühen Stadium der exzentrischen Intimaverdickung auf Endothelzellen und Makrophagen, WHO Stadium 1 (AHA II-III). Alle Fotos außer A. 200fach vergrößert, Reduktion 75%.**  
**A.** (100x) Übersicht über den Gefäßquerschnitt. CD40-Expression in der Adventitia, Media und Intima. Ausschnitt vergrößert. **B.** CD40-Expression auf Makrophagen (  $\blacktriangleright$  ) und Endothelzellen (  $\rightarrow$  ). **C.** EBM11 Färbung zeigt zwei migrierende Makrophagen. **D.** HLA-DR positive EC und MAC. Teilweise Koexpression mit CD40. **E.** F8 zeigt den intakten EC-Monolayer. **F.**  $\alpha$ -SMA Media, VSMCs sind bisher nicht in die Intima eingewandert. **G.** Sudan III Färbung, feine Fetteinlagerung entlang der Lamina elastica interna an der Intimaverdickung. **H.** Negativ-Kontrolle.

## Ergebnisse

Die Vorläuferzellen der Makrophagen, die im Blut kursieren, **Monozyten**, sind große Zellen von 12-18 µm Durchmesser mit einem hufeisenförmigen Zellkern.

Die **Glatten Muskelzellen** der Arterien (griechisch: Arteria, Luftröhre, im klassischen Griechenland hielt man die Arterien für Luftleiter) vom muskulären Typ (Vascular Smooth muscle cells / VSMC) sind langgezogene helle Zellen mit meist verwaschenen Zellgrenzen. Ihre Länge beträgt in Blutgefäßen 15-20 µm, ihre Dicke liegt zwischen 5-10µm. Sie variiert je nach Kontraktionszustand und Anschnitt. Jede Zelle weist einen zentral gelegenen, spindelförmigen Zellkern auf.

Sind in späteren Stadien vermehrt Zellen in die Intima eingewandert, kann auch das histologische Verteilungsmuster hinzugezogen werden (s. Stadium 3).

### **Verteilung der Zelltypen im WHO-Stadium 1:**

Sowohl MAC als auch VSMCs liegen disseminiert in der Neointima vor. Vorzugsweise sind sie im Bereich der extrazellulären Lipidtropfen und Schaumzellbeete zu finden.

Die MACs liegen locker verteilt vor allem in Endothelnähe und gruppieren sich an der Plaque-Schulter mit anderen lymphomononukleären Zellen zu Haufen von 7-20 Zellen zusammen (Infiltrate).

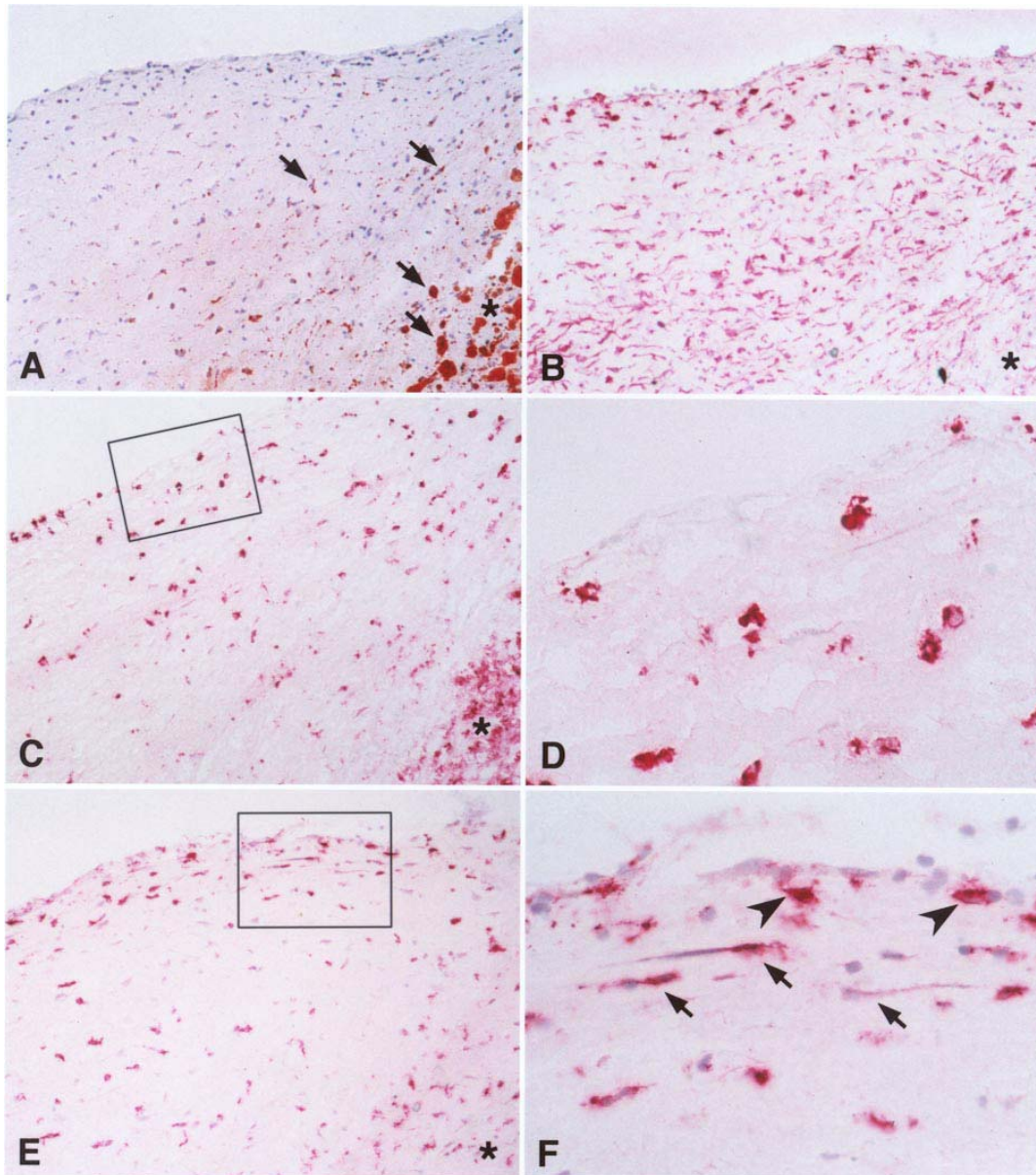
Die VSMCs liegen vermehrt am Grund der atherosklerotischen Läsionen zur Media hin. In geringerer Zahl ziehen sie sich bis luminal unter das Endothel. In diesem Stadium liegen sie vereinzelt vor, vorzugsweise am Rande der Lipideinlagerungen.

### **CD 40 - Expression:**

Im WHO-Stadium 1 zeigt sich eine deutliche CD40 Expression der gerade in die Intima migrierenden Zellen. Die Verteilung von CD40 ist disseminiert, wie die eben beschriebene Lage der VSMCs und MACs. Nur luminal und an der Plaque-Schulter sammeln sich vermehrt CD40+ Zellen an, was für den höheren Anteil CD40 exprimierender MAC im Gegensatz zu VSMCs spricht. Schon bei geringer exzentrischer Intimaverdickung oder Lipideinlagerung liegt eine Expression von CD40 in den migrierenden MACs oder VSMCs vor.

Auch Endothelzellen weisen schon in diesen sehr frühen Stadien eine CD40 Expression auf (s.Abb 1). Eine gesonderte Beschreibung der CD40 Expression auf Endothelzellen findet sich im Verlauf.





**Abb. 6 :**  
**CD40 Expression in humanen atherosklerotischen Läsionen. Repräsentative Kryoschnitte (5µm) in der Neointima einer Schulterregion im WHO-Stadium 2 (AHA IV-V).**

- A. Sudanfärbung mit intra- und extrazellulärer Lipidablagerung (Pfeile) (x100).
- B. Immunhistologische Färbung für Vaskuläre glatte Muskelzellen mit  $\alpha$ -smooth muscle actin (x100)
- C. und für Makrophagen mit EBM11(x100).
- D. Starke Vergrößerung (x400) der Makrophagenspezifischen Färbung. Das Areal zeigt die typische Makrophagenmorphologie
- E. Eine niedrige Vergrößerung (x100) eines Schnittes nach CD40-Färbung zeigt die CD40 Immunoreaktivität vor allem in der Neointima und der Schulterregion.
- F. Vergrößerung des umgrenzten Areals (x400) zeigt CD40 positive VSMCs mit der typischen Spindelzellmorphologie (**Pfeile**) und CD40 positive Makrophagen (**Pfeilkopf**) in derselben Färbung wie E. Der **Asterisk (\*)** markiert die nekrotischen Gebiete der atherosklerotischen Plaques.

### 3.1.3. Histomorphologie der Gefäßschnitte im WHO-Stadium 2:

Im WHO-Stadium 2, den so genannten fortgeschrittenen Läsionen der WHO (n = 9) sind in der Sudanfärbung konfluente, extrazelluläre Lipide sichtbar, die den Atheromkern bilden. Erste Gefäßneubildungen liegen in der stark verdickten Intima von  $1,37 \pm 0,21$  mm, vor. Um den Lipidkern herum sind mit  $4,00 \pm 1,19$  im gesamten Gefäßschnitt vermehrt Rundzellularinfiltrate zu finden. Bedingt durch den erhöhten Bindegewebsanteil kann die Intima verschieden stark aus fibrösem Material bestehen (fibröser Plaque). Dieses kann je nach Läsion zellreich mit lokalen Schwerpunkten und typischen Verteilungsmustern von VSMCs oder MACs, oder sehr zellarm sein und dann nur vereinzelte VSMCs oder MACs aufweisen.

Die Intima / Media - Grenze ist an einigen Stellen verwaschen und von entzündlichen Infiltraten durchsetzt, die Lamina elastica interna durchbrochen.

Die **Media** kann fakultativ einbezogen sein. Es finden sich in diesem Fall verminderte VSMCs, eine disarrangierte Gewebsarchitektur und eine Infiltration von Lymphozyten, MAC und Schaumzellen. Die Mediadicke nimmt in diesem Fall ab. Auch in der Media kommt es zur Neovaskularisation.

#### **Verteilung der Zellarten:**

Die **VSMCs** liegen in lockeren Zügen oder Richtungen, wie Fischschwärme angeordnet, in den Bindegewebsmassen des Plaques. Ein luminaler schmaler Streifen hat einen deutlich geringeren Anteil an glatten Muskelzellen.

Die zentrale Zone der Fettansammlung (lipidcore), der Lipidkern, spart alle Zellen aus. Hier bildet sich ein zunehmend hypo- bis azellulärer Bereich.

Die **MACs** liegen locker verteilt um das Atherom, teilweise zu Gruppen und Infiltraten mit anderen Rundzellen zusammen. Ihr Hauptanteil ist jedoch an der Plaqueschulter und an den Seiten des Fettkernes sichtbar.

### **CD40 - Expression:**

#### **Makrophagen:**

Die CD40-Expression ist vor allem in den Infiltraten der Plaque-Schulter und um den Fettkern herum zu finden. Dies entspricht dem oben geschilderten Makrophagen-Verteilungsmuster. Die Dominanz dieser Verteilung ist durch zwei Ursachen zu erklären. Zum einen trägt ein größerer Anteil an MAC CD40 auf seiner Oberfläche als an VSMCs (s. Statistik). Zum anderen bewirken die MAC durch ihre beträchtliche Größe (10-15µm) in der APAAP Technik eine großflächige, intensive, grobkörnige Färbung.

#### **Glatte Muskelzellen:**

In einem feineren Farbton liegt die immunhistochemische Färbung für CD40 auf den VSMCs vor. Deutlich CD40 positiv sind einzelne Zellen innerhalb der typischen lockeren VSMC-Schwärme, jedoch besonders an deren Rand- und Überschneidungsgebieten mit den MAC-Zonen,

In höheren Vergrößerungen zeigt sich die CD40-Expression auf den VSMCs in Richtung des Fischeschwarm-Verteilungsmusters und einzeln liegender, deutlich gefärbter, langgezogener Zellen mit spindelförmigem Kern (s. Abb. 6).

In der Nähe der Rundzellinfiltrate der Plaqueschulter treten auch CD40 positive VSMCs häufiger auf als in den anderen Bereichen der Plaquemorphologie.

Die CD40 Expression ist um die Rundzellinfiltrate herum so intensiv, da hier CD154 exprimierende T-Lymphozyten liegen. Eine gegenseitige Aktivierung mit den Makrophagen findet anhand der Antigenpräsentation durch letztere statt. Durch diese wechselseitige Aktivierung kommt es zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und zur Hochregulation der CD40 Expression auf den MACs.

Auch HLA-DR positive Zellen konnten in der Neointima, v.a. der Schulterregion, festgestellt werden. Die MHCII-Expression betrifft vor allem MAC, jedoch auch VSMCs und ECs (s. Abb. 5).

### **3.1.4. Histomorphologie der Gefäßschnitte im WHO-Stadium 3**

Die atherosklerotischen Läsionen im Stadium 3 (n=12) sind durch zusätzlich vorliegende Komplikationen gekennzeichnet. Es liegt eine komplexere Morphologie mit Plaque Organisation, Kalzifizierung, Fissuren, Ulzera, Rupturen, Dissektionen, Hämorrhagien und Thrombosen vor. Der Grundaufbau in Schulterregion, fibröse Kappe und Lipidkern, wie bei dem Atherom in Stadium 2, bleibt gleich. Die Intimadicke nimmt mit  $2,47 \pm 0,25$  weiter zu und es kommt zunehmend zu Gefäßneubildungen.

In den 12 Gefäßen dieser Untersuchung liegen vor allem Kalzifizierungen vor. Diese nehmen den Hämatoxylin-Kernfarbstoff stark auf, erscheinen blau, brechen teilweise aus und hinterlassen große Löcher im Gewebe. Diese Stellen liegen meist in den lipidreichen Zonen. In selteneren Fällen liegen Fissuren, Thrombosen und Hämorrhagien oder aneurysmatische Entwicklungen vor. Die Intimaverdickung hat meist so ein enormes Ausmaß erreicht, dass es zur Lumeneinengung (um 50-80%) kommt. Die Fetteinlagerung variiert in den Plaques, je nach Plaqueart und Lokalität: Lumenwärts liegt oft eine feinere Einlagerung vor, die in Richtung Media, zum Lipidkern hin, grober wird, zu immer größeren Tropfen konfluiert und in dem Lipidkern Cholesterinkristalle bildet (s. Abb.6).

Die Media ist in diesem Stadium stark in den pathologischen Prozess der Atherosklerose einbezogen. Auch in der AHA-Klassifikation wird ab dem Stadium V, was dem WHO-Stadium 3 entspricht, ein obligatorischer Befall der Media beschrieben. Dies zeigt sich in Form verringerter, disarrangierter VSMCs, vielen Rundzellinfiltraten, einer Neovaskularisation und konsekutiver Ausdünnung der Media, als verringerte Dicke messbar.

#### **Verteilung der Zellarten**

##### **Makrophagen**

In der Intima ähnelt die Verteilung dem WHO-Stadium 2: die MAC sammeln sich vermehrt in einem Streifen hinter der Plaque an der Mediagrenze und liegen vor allem in Infiltraten seitlich des Plaques und in Ansammlungen an der Plaqueschulter. Sehr oft sind die MAC-Haufen koloka-

## Ergebnisse

lisiert mit den Fettansammlungen. Ansonsten sind sie diffus in der ganzen Plaque verteilt, mit deutlicher Reduktion in den fibrösen Arealen.

In der Media nimmt die Infiltration mit MAC deutlich zu. Diese ziehen sich vor allem als Bestandteil streifiger Rundzellinfiltrate entlang der neugebildeten Gefäße und liegen in geringer Zahl einzeln verteilt vor.

Die Adventitia ist wie in den anderen Stadien gleichmäßig und sehr zahlreich von MAC durchsetzt. Die Dichte der diffusen MAC- Infiltration übertrifft in allen Stadien die der Intima. An den Vasae vasorum der Adventitia sammeln sich die MAC mit anderen Zellen (Mastzellen, T-Zellen) zu Rundzellinfiltraten, die mit den Stadien zunehmen und größer werden.

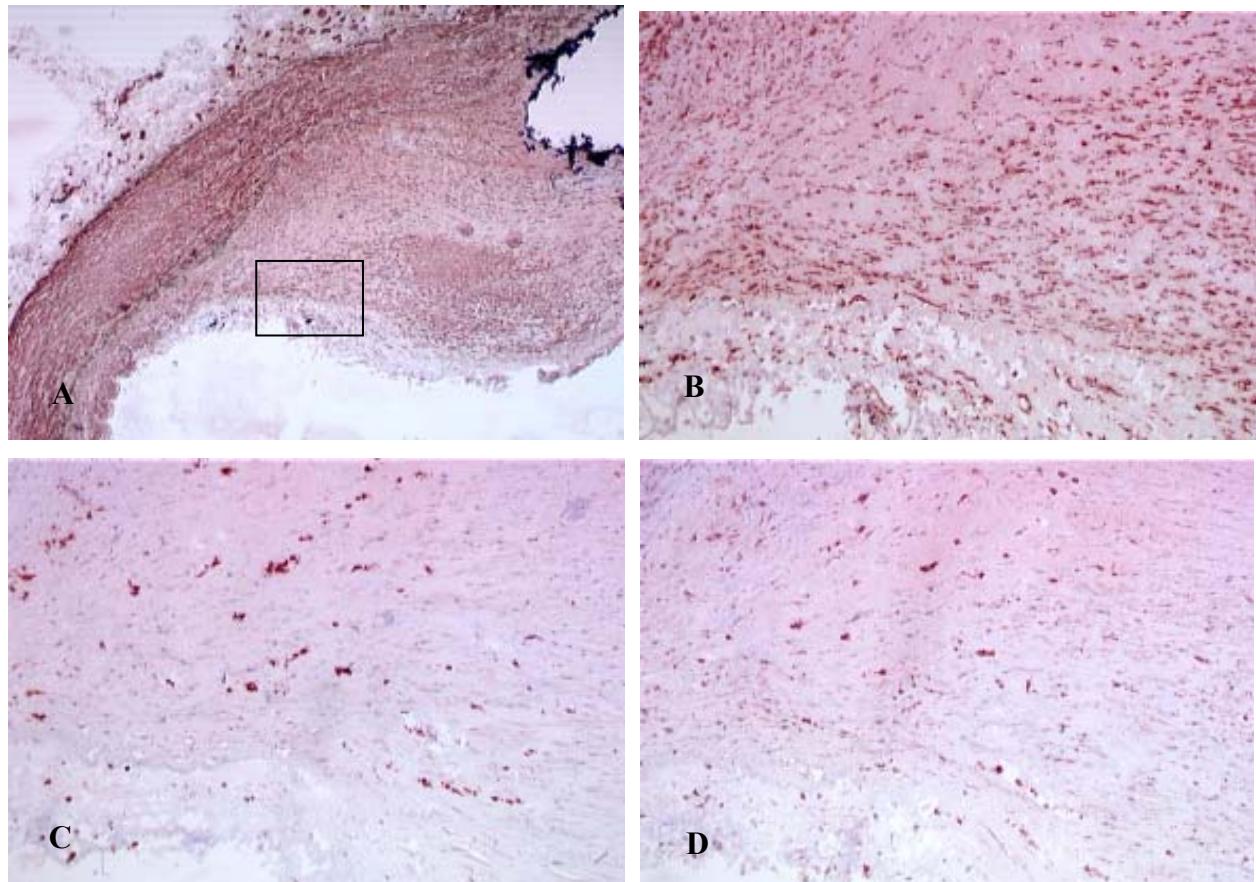
### **Glatte Muskelzellen**

In den fibrösen Stellen liegen sie vor allem in den beschriebenen lockeren, meist zirkulären, teilweise schrägen Zügen vor. Ansonsten findet man sie vereinzelt in allen Teilen der Plaques.

Das Hauptverteilungsgebiet liegt also an anderen Stellen als das der MAC und es bestehen Überschneidungsbereiche.

### **CD40-Analyse**

Die Analyse der immunhistochemischen Färbungen von CD40 ergab die deutlichste Expression in den Rundzellinfiltraten und um diese herum, sowie in den MAC-Streifen an der Media Grenze. Die VSMCs sind weiterhin sowohl einzeln in den Schwärmen als auch zu Vielen in den Grenzgebieten zu den Infiltraten CD40 positiv (s. Abb. 7). Jedoch geht die Expression über kleine Gruppen nicht hinaus.



**Abb. 7**

**CD40 Expression in der Neointima von humanen iliakalen Arterien im WHO-Stadium 3 (AHA VI).**

Niedrige Vergrößerung eines repräsentativen Kryo-Schnittes (5 $\mu$ m) durch die Schulterregion einer komplizierten Läsion mit Verkalkungszone rechts oben.

- A.** Immunhistochemische Färbung für VSMCs mit AK gegen  $\alpha$ -smooth muscle actin in niedriger Vergrößerung
- B.** und stärkerer Vergrößerung des umgrenzten Feldes (x100)
- C.** Darstellung der Makrophagen mit AK gegen EBM 11 (x100), ebenfalls im umgrenzten Feld
- D.** In der CD40-Färbung ist die CD40-Immunreaktivität hauptsächlich in der Neointima der Schulterregion verteilt. Es zeigen sich CD40-positive VSMCs mit der typischen Spindelzellmorphologie und CD40-positive Makrophagen (Vergrößerung x 100, Reduktion 25%).

### 3.2. Media

#### **Histomorphologische Veränderungen:**

Die histomorphologischen Veränderungen der Media in der Pathogenese der Atherosklerose sind in dem Kapitel Material und Methoden beschrieben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in Stadium 0 und 1 kaum Veränderungen oder Infiltrationen vorliegen. Nur von der Adventitia aus findet eine geringfügige Einwanderung von Makrophagen bis in den Grenzbereich, ungefähr ein Drittel der adventitianahen Media statt.

In Stadium 2 (Atherom) kommt es teilweise zu einer deutlicheren Auflösung der Grenzen: Die Lamina elastica externa ist durchbrochen und von MAC durchsetzt. Teilweise liegen einzelne oder meist in Gruppen angeordnete MAC zwischen den VSMCs vor. Diese gruppieren sich vor allem um die zunehmend einsprossenden neovaskulären Gefäße, die ebenfalls vor allem in der äußeren Mediahälfte vorliegen.

Die Einwanderung von adventitiellen MAC in die Media über die Lamina elastica externa nimmt im Verlauf der Stadien zu und damit die Anzahl der Makrophagen.

Im Stadium 0 liegen dort fast keine vor, im Stadium 3 gibt es pro Gefäß mehrere Infiltrate. Die durchschnittliche Anzahl der Makrophagen / Gesichtsfeld steigt von  $1,46 \pm 0,41$  auf  $13,79 \pm 3,69$  (Mittelwert  $\pm$  SEM / HPF).

Die Lamina elastica interna ist an vielen Stellen zerstört. Besonders seitlich und direkt unterhalb des Atheroms ist die Grenze diskontinuierlich.

Die VSMCs liegen an den pathologischen Stellen, vor allem unter dem Plaque, lockerer, disarrangiert und weisen Löcher im Gewebeverband auf. Aufgrund der Atrophie nimmt die Mediadicke ab.

Im WHO-Stadium 3 verstärken sich diese Phänomene. Bei jedem der 12 Gefäßschnitte sind streifige Rundzellinfiltrate entlang der Gefäßeinsprossungen zu finden. Die kalkhaltigen Plaques wölben sich in die Media vor, so dass eine Reduktion der Dicke von im Durchschnitt  $0,58 \pm 0,14$  mm in Stadium 0 auf  $0,36 \pm 0,04$  mm im Stadium 3 resultiert. Die ansonsten dichte, gleichmäßige Schicht glatter Muskelzellen wird unruhig und weist Substanzdefekte auf.

## **CD40-Expression**

### **Makrophagen**

Durch die immunhistologischen Färbungen und die typische Morphologie erwies sich der Großteil der Zellspezies der Infiltrate, als auch einzelner, disseminierter Zellen in der Media als Makrophagen. Wie in der Intima, liegt die farblich intensivere Färbung nicht auf den VSMCs, sondern auf den MAC vor. Sowohl die Infiltrate um die Gefäßneubildungen als auch die disseminiert liegenden Makrophagen der Media sind durch die Stadien hindurch häufiger, und zunehmend CD40 positiv. Die maximale, anteilige CD40-Positivität liegt im Stadium 3 mit  $63,75 \pm 6,19\%$  vor. Auch in der Media sind damit die MAC zu einem hohen Prozentsatz CD40 positiv.

### **Vaskuläre glatte Muskelzellen**

Im Stadium 0 sind nur äußerst vereinzelte Zellen mit VSMC-Morphologie und Positivität für  $\alpha$ -smooth muscle actin mit anti CD40 anfärbbar.

Das nimmt in Stadium 1 leicht zu.

Ab dem Stadium 2 sind die spindelförmigen Zellen, die an die Infiltrate angrenzen, sowie einzelne disseminierte VSMCs in dem Gesamtverband der glatten Muskelschicht deutlich und anteilig zu  $7,33 \pm 2,70\%$  CD40 positiv, im Stadium 3 zu  $11,26 \pm 1,79\%$  CD40 positiv.

Man muss den Einfluss der hier gewählten prozentualen Darstellung an der Gesamtmenge der Zellen bedenken, da die Media aus dichtgelagerten VSMCs besteht. Auch bei gleicher CD40 positiver Zellzahl wie in der Intima, ist die Menge der VSMCs im HPF circa doppelt so hoch wie in der Intima, die anteiligen CD40-positiven Zellen damit deutlich verringert im Vergleich zur Intima.



### **3.3. Adventitia**

#### **Histomorphologische Veränderungen im Verlauf der Atherogenese**

Die Adventitia besteht aus lockerem Bindegewebe, diffus verteilten Fibroblasten und Vasae vasorum, bestehend aus Endothel und sehr schmaler VSMC-führender Media. Sie ist von vielen, gleichmäßig verteilten EBM11 positiven MAC sowie einigen Mastzellen durchsetzt. Die Makrophagen nehmen zur Media hin zu. An den Vasae vasorum liegen sie gehäuft vor.

Vom Stadium 0 bis zum Stadium 3 verändert sich die Morphologie der Adventitia qualitativ kaum.

Quantitativ scheinen die EBM11+ MAC geringfügig zuzunehmen. Die Infiltrationen von MAC um die Vasae vasorum herum werden größer.

Die Einwanderung von Makrophagen in die Media aus der Adventitia deutet durch deren Lage in der Media an. Die Makrophagen liegen besonders nahe der Adventitia und in den späten Stadien nahe den neu eingesprossenen Gefäßen.

#### **CD40-Expression**

Vasae vasorum: Die Endothelzellen der Vasae vasorum sind durch alle Stadien hindurch intensiv und vollständig CD40 positiv!

Die VSMCs liegen in so geringem Maß vor, dass eine Beurteilung schwierig ist, zumal die Färbung von den stark positiv erscheinenden EC nicht ganz sicher abzugrenzen ist. Einige VSMCs sind eindeutig als CD40 negativ zu identifizieren.

Tendenziell gehen wir davon aus, dass keine CD40 Expression auf den VSMCs der Adventitia vorliegt.

In dem lockeren Bindegewebe sind sowohl Zellen mit großen runden Kernen und EBM11-Positivität als auch kleine Zellen mit dreieckigem oder spindelförmigen Kern und EBM11- sowie  $\alpha$ SMA-Negativität, CD40 positiv. Das Verteilungsmuster dieser beiden Zellarten ist diffus. Es handelt sich demnach um MAC und Fibroblasten, die CD40 exprimieren. Die Expression liegt durch alle Stadien hindurch gleichmäßig und besonders bei den MAC in hohem Maße vor.

## Ergebnisse

Die anteilige CD40 Positivität und eine eventuelle Zunahme durch die Stadien hindurch wäre quantitativ zu prüfen.

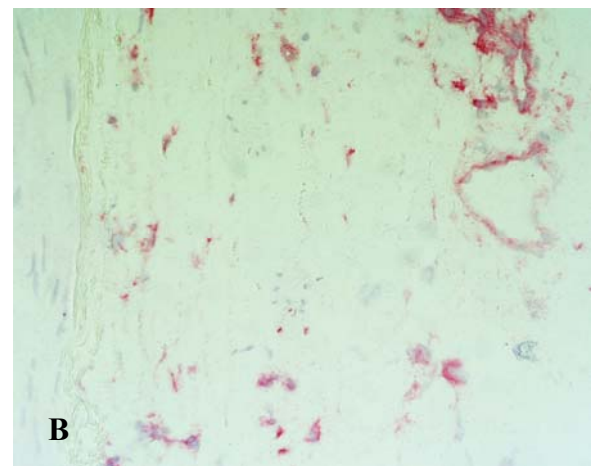
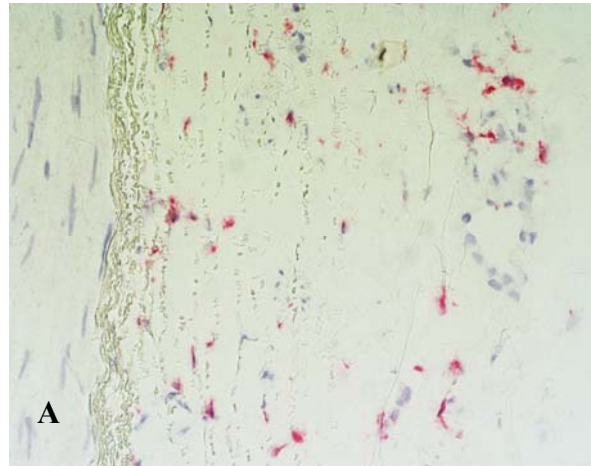
Dasselbe Phänomen liegt auf den Endothelzellen der Neovessels vor. Neovaskuläre Bildungen liegen in den atherosklerotischen Plaques häufig vor.

### **Abb. 8** **CD40 - Expression der** **Adventitia**

Immunhistologische Darstellung  
(x100) der

- A** Makrophagen mit AK gegen EBM 11
- C** Endothelzellen mit AK gegen F8 und der
- B** CD40 Expression beider Zellspezies

Auf den Endothelzellen der Vasae vasorum und den Makrophagen des lockeren Bindegewebes liegt durch alle Stadien hindurch gleich bleibend eine nahezu vollständige CD40- Positivität vor.



### **3.4. Endothelzellen**

#### **Histologische Veränderungen im Verlauf der Atherosklerose**

Gefäße im Stadium 0 zeichnen sich durch eine intakte luminale Endothelzellschicht aus. Eine Lage flacher Endothelzellen kleidet die Arterien einschichtig aus. Ihre Höhe beträgt 0,1-1µm mit leichten Vorwölbungen im Bereich des Zellkerns und in ihrer Ausdehnung polygonaler Form. Die Zellkerne sind länglich und orientieren sich parallel zum Gefäßverlauf.

Charakteristisch sind sogenannte Weibel-Pallade-Körper, ca. 0,6 µm lange osmiophile Gebilde mit Mikrotubuli; sie enthalten den Willebrandt-Faktor (F8, Kofaktor der Blutplättchenaggregation) und Endothelin, ein vasoaktives Peptid.

Mit dem Fortschreiten der Atherosklerose und zunehmender Bildung von Neointima ist auch das Endothel der 5µm Serienschnitte zunehmend angegriffen. Stellenweise ist die Endothelzellschicht zerrissen, streckenweise auf der luminalen Oberfläche der Plaques nicht mehr vorhanden. Das ist ein bekanntes Phänomen (Gown et al. 1986) und erschwert eine zuverlässige Auswertung. Hinzu kommt, dass eine unspezifische Färbung vor allem an Überlappungs- oder Übergangsstellen erfolgt, so dass gerade der lumenwärtige Grenzbereich kritisch zu beurteilen ist.

#### **CD40 - Expression**

Deskriptiv ist zu sagen, dass das Endothel der gesunden Gefäße im Stadium 0 keine oder nur in den seltensten Fällen vereinzelt CD40-Expression aufweist. Im Stadium 1 und auch schon an den ersten Stellen der Intimaverdickung ohne Lipideinlagerungen ist luminal der Intimaverdickung vereinzelt oder streckenweise eine immunhistologisch nachweisbare CD40-Expression zu finden (s.Abb. 5).

Das setzt sich im Stadium 2 und 3 fort, ist jedoch quantitativ durch die oben beschriebenen Einschränkungen schwer analysierbar. Deskriptiv liegen diese Färbungen meist im Endothel über dem Plaque und über den Plaqueschultern.

### **CD40-Expression auf den Endothelzellen der Vasae vasorum und der Gefäßneubildungen**

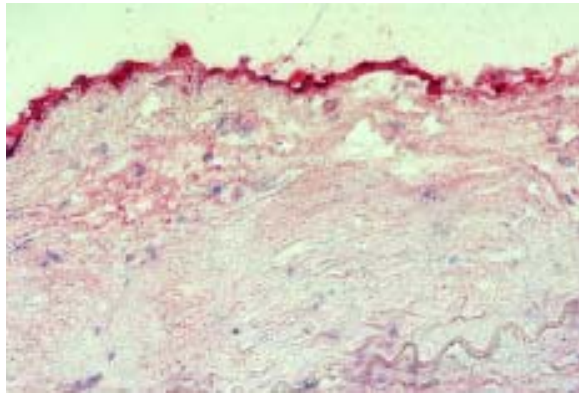
Das Endothel der Gefäßneubildungen im Rahmen der Atherosklerose ist überwiegend CD40 positiv und zwar sowohl in der Intima als auch in der Media. Die CD40-Expression dieser kleinen Gefäße ist damit der der Vasae vasorum der Adventitia vergleichbar. In der deskriptiven Auswertung ist eine Zunahme der Expression in den Stadien 2 und 3 nicht zu sehen, da sie schon zuvor vollständig anfärbbar sind. Für eine genauere Aussage würde man eine quantitative Analyse benötigen

### **3.5. Kolokalisation von CD40, ICAM-1, VCAM-1 und MMP-2 auf Endothelzellen**

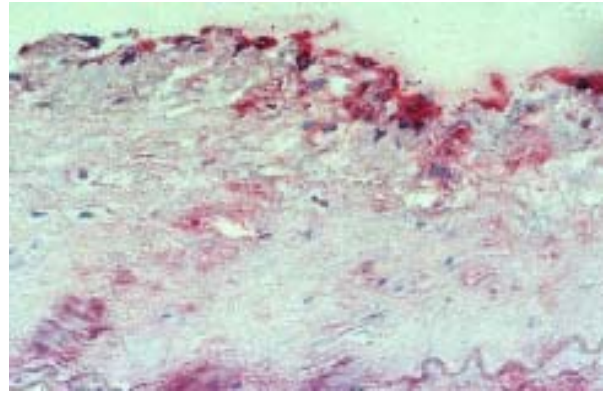
Des Weiteren wurde die Kolokalisation von CD40 mit anderen immunmodulatorischen, in der Pathogenese der Atherosklerose wichtigen Molekülen untersucht. Dazu wurde das Endothel von Gefäßschnitten mit F8/V. Willebrandt-Faktor immunhistochemisch markiert. Auf weiteren seriellen Schnitten wurde dasselbe Gefäß mit ICAM-1, VCAM-1, MMP-2 und CD40 gefärbt und die Verteilung analysiert.

Die Ergebnisse zeigen eine teilweise Lokalisation von CD40, ICAM-1, VCAM-1 und MMP-2 in den Endothelzellen derselben Gefäßabschnitte in atherosklerotischen Plaques höherer Stadien.

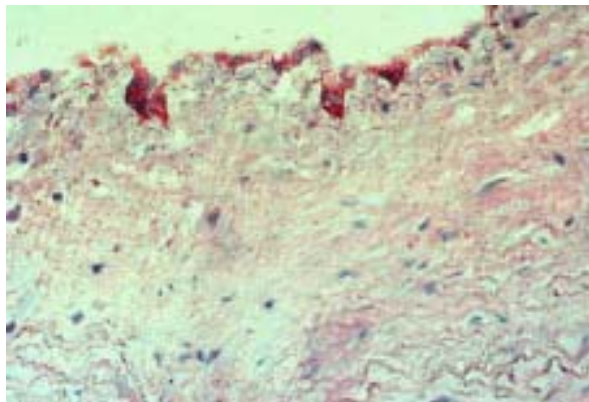
Da CD40 ICAM-1, VCAM-1 und MMP-2 hochreguliert, ist eine häufige Kolokalisation in den atherosklerotischen Plaques anzunehmen.



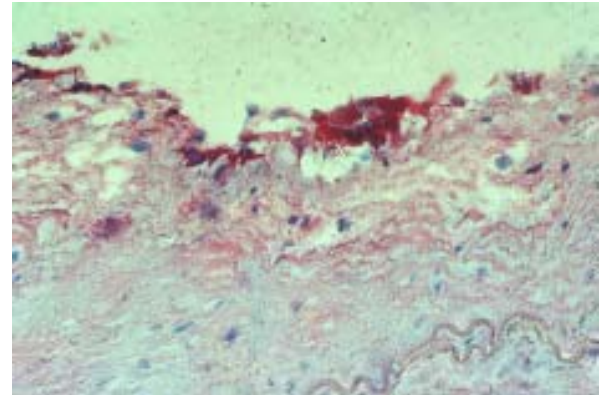
VCAM-1



CD40



MMP-2



ICAM-1

**Abb. 9**

**Koexpression von CD40 und ICAM-1, VCAM-1 sowie MMP-2.**

Hier dargestellt in der Neointima eines atherosklerotischen Plaques. Das Gefäßlumen ist jeweils oben im Bild.

„High power view“ (Vergrößerung x 200, Reduktion um 25%) der Schulterregion einer fortgeschrittenen Läsion im WHO-Stadium 2 (AHA V) mit CD40-Expression und Expression von VCAM-1, ICAM-1 und MMP-2.

### **3.6. CD40 Ligand / CD154**

Zur Analyse der Expression des CD40-Liganden/CD154 auf T-Zellen untersuchten wir als Positivkontrollen Kryo-Lymphknotenschnitte. Auf T-Zellen ist die Expression von CD154 im aktivierten Zustand gesichert (Lederman et al., Graf et al.; Spriggs et al.; Hollenbaugh et al.; Armitage et al. je 1992). Die Expression von CD154 auf MAC, VSMCs und ECs liegt als Publikation von Mach et al. 1997 vor.

Unser Ziel war es, eine semiquantitative Analyse der CD154-Expression für die exprimierenden Zellspezies vorzunehmen, wie wir sie für CD40 erstellt haben. Vier Antikörper für CD154 wurden auf 13 Lymphknotenpräparaten getestet (s. Tab. 12). Die immunhistologische Markierung der T-Lymphozyten erfolgte durch einen Anti-CD3 Primärantikörper, zur Abgrenzung gegenüber B-Zellen und Makrophagen.

#### **Zellmorphologie**

Lymphozyten sind mit ihren 6-8µm Durchmesser kleine Zellen mit rundlichem oder nur schwach eingekerbtem Zellkern ohne sichtbaren Nukleolus. Umgeben ist dieser nur von einem schmalen Rand basophilen Zytoplasmas.

#### **Histologie des Lymphknotens**

Die Sekundärfollikel liegen im Rindenbereich des Lymphknotens (LK). Ihre zentrale Aufhellung entspricht dem Reaktionszentrum, in dem B-Zellen aktiviert werden und sich zu Plasmazellen entwickeln. Die lymphozytenreichen Areale zwischen und unter den Follikeln sind die T-Zell-Regionen, die parakortikale Zone. Vereinzelt kommen auch im Keimzentrum der Follikel T-Zellen vor.

#### **Expression von CD154**

Die immunhistologische Darstellung erfolgte mit mehreren Verfahren: der Streptavidin-Biotin-Methode (Histostain plus Kit, Zymed) der APAAP-Technik mit ein und zwei Inkubationszyklen im Tech-mate (Pathologie, Virchow Klinikum) und der Avidin Biotin Complex (ABC)-Methode im Tech-mate (Pathologie, Virchow-Klinikum).

Mit diesen Methoden wurden die vier in der Literatur (Mach et al. 1997) empfohlene Antikörper gegen CD154 (genzyme, Immunotech, Calbiochem und Santa Cruz) getestet. Die Inkubationszeit

## Ergebnisse

lag zwischen 1-3 Tagen, die Konzentrationen von 1:25 - 1:200. Als Material verwendeten wir Kryoschnitte von 13 Lymphknoten der Gewebekbank des Instituts für Pathologie, Charite-Universitätsmedizin, Berlin.

Mit Hilfe der genannten Methoden konnten CD154 positive T-Zellen in der parakortikalen Zone nachgewiesen werden. Die Ergebnisse waren jedoch nicht zuverlässig reproduzierbar.

Eine zweite Versuchsreihe erfolgte mit Gefäßschnitten atherosklerotischer Gefäße im WHO-Stadium 3 (komplizierte Läsionen) mit ausgeprägter immunologischer Aktivität und einer hohen Anzahl lymphomonozytärer Infiltrate. Es konnten CD3-positive T-Zellen, jedoch kaum eine CD154-Expression dieser Zellen festgestellt werden. Wenn CD154-positive Zellen auftraten, handelte es sich um T-Lymphozyten in den Infiltraten der Plaque-Schulter. In keinem Fall wurde die Expression auf Makrophagen, Vaskulären glatten Muskelzellen oder Endothelzellen beobachtet. Die starke, von Mach et al. 1997 beschriebene Expression von CD154 auf MAC, EC und VSMCs, konnten wir nicht reproduzieren

### Tab. 12. :

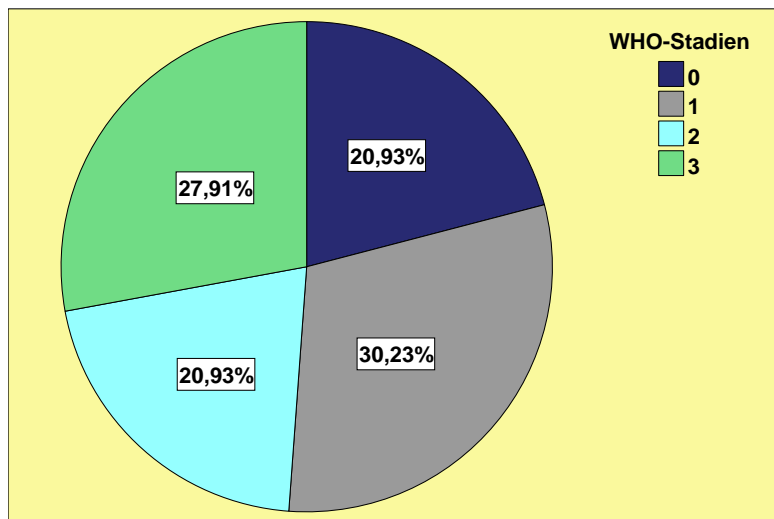
#### Methoden zum Nachweis von CD154:

Gewebe 5µm Kryoschnitte	Antikörper CD40 Ligand / CD154	Clone	Verdün- nung	Methoden	Valider im- munhistologi- scher Nach- weis
1.) Aktivierte Lymphknoten	genzyme	40 80 4	1:25- 1:200	1.) APAAP Tech- nik (Dako Tech mate)	negativ
	Calbiochem	24-31			negativ
	Immunotech	TRAP-1			negativ
	Santa Cruz	D-19			negativ
2.) Atheroskleroti- sche Gefäße, WHO Stad. 4				2.) Streptavidin Biotin Amplifika- tion (von Hand)	
				3.) Avidin Biotin Komplex Methode (Dako Tech mate)	

### 3.7. Analyse / statistische Ergebnisse (Intima)

#### 3.7.1. Verteilung:

**Abb. 10:** Prozentuale Verteilung der Gefäßschnitte auf die WHO-Stadien:



Die Schnitte der Iliakalgefäße wurden nach der WHO-Klassifikation der Atherosklerose eingeteilt. Es ergab sich eine prozentuale Verteilung der Anzahl der Gefäße auf die WHO-Stadien zwischen 20,93 und 30,23%.

#### 3.7.2. Stadienabhängiger Anstieg der Intimadicke, Infiltrate und Makrophagen

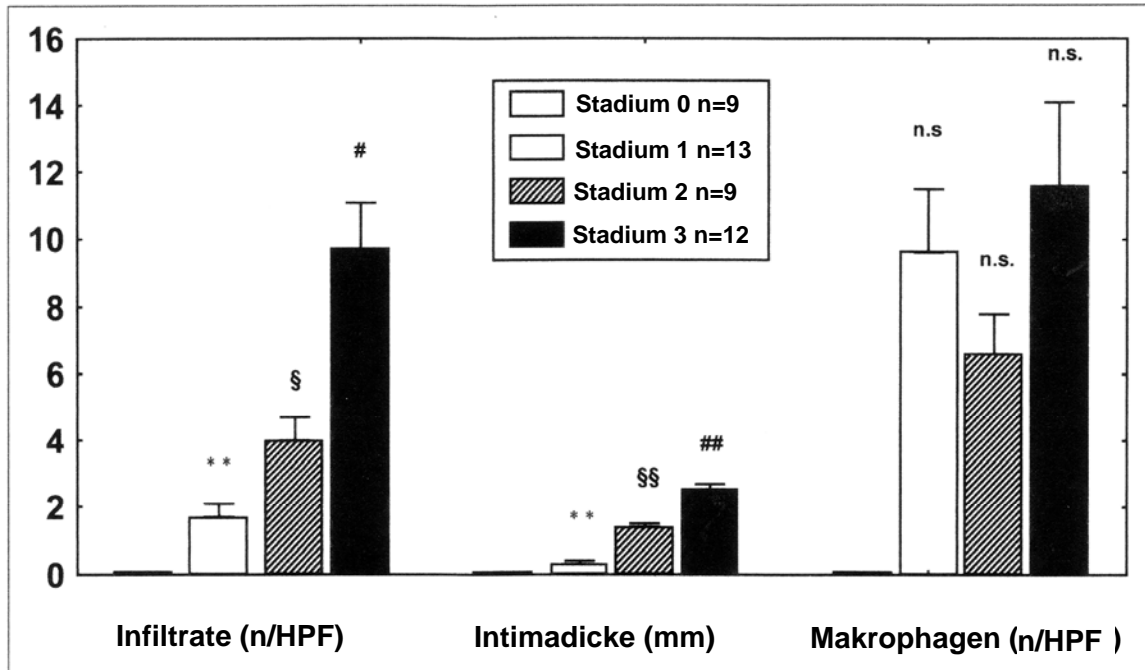
In jedem WHO-Stadium der Atherosklerose wurde für die Gefäßschnitte die Intimadicke nach Lautsch (1953) gemessen und die Anzahl der atherosklerotischen Infiltrate und der MAC ermittelt.

Mit der Progression der Atherosklerose und den Stadien zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Intimadicke (s. Abb.11). Ein 10facher Anstieg fand sich zwischen Stadium 0 und 1 ( $p < 0,005$ ) und ein vierfacher Anstieg zwischen Stadium 1 und 2 ( $p < 0,005$ ). Zwischen Stadium 2 und 3 verdoppelte sich die Intimadicke nahezu ( $p < 0,005$ ).

Nichtatherosklerotische Arterien beinhalten keine Infiltrate. Mit der Progression der atherosklerotischen Stadien 1, 2 und 3 wurde mit dem Anstieg der Intimadicke, wie erwartet, ein signifikanter Anstieg der Infiltrate beobachtet ( $p < 0,05$ ). Die Anzahl der Infiltrate verdoppelt sich von Stadium zu Stadium ungefähr.



Abb.11



Anzahl der Infiltrate (n/Gesichtsfeld (HPF)), Intimadicke (mm) und Makrophagen (n/HPF) in verschiedenen Atherosklerosestadien nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifiziert. Das Material bestand aus humanen Iliakalarterien von 43 Patienten. Die Werte werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt.

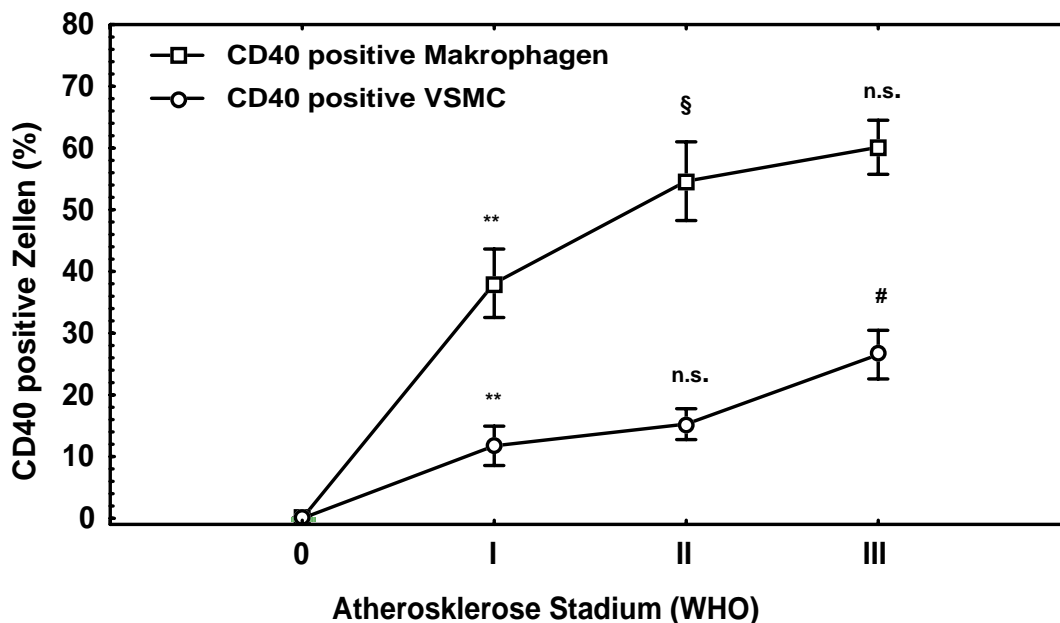
\*\*  $p < 0,005$  bezeichnet die statistische Signifikanz im Vergleich zu Stadium 0  
 § / §§ zeigt die Signifikanz im Vergleich zu Stadium 1; §§  $p < 0,005$   
 # / ## zeigt die Signifikanz im Vergleich zu Stadium 2, ##  $p < 0,005$ ,  
 definiert nach dem Mann-Whitney U test.

Im gesunden Gefäß lagen keine Makrophagen im Endothel vor. Schon im Übergang zum Stadium 1 sind dann nahezu 10 MAC pro Gesichtsfeld (HPF) eingewandert. Eine Zahl, die sich im Verlauf der Atherosklerose ungefähr hält (6,6-11,6). Die hohe Streuung ergibt sich durch die heterogene Plaquemorphologie (Fibrose, Verkalkung, Thrombose, Plaqueschulter mit Infiltraten etc.) mit teilweise großen azellulären Bezirken und andererseits Bereichen mit ausgeprägten Rundzellinfiltraten und aus diesem Grund sehr unterschiedlicher Anzahl an MAC. Aufgrund der Streuung ist der Anstieg der Makrophagen nicht signifikant, obgleich der Sprung vom gesunden Gefäß zu den frühen Stadien der Atherosklerose, also von Stadium 0 zu 1, sehr hoch ist.

### 3.7.3. Semiquantitative Analyse der CD40-Expression

Eine semiquantitative Analyse der Läsionen wurde für CD40 auf MAC und VSMCs mit Differenzierung der Zelltypen durch Zellmorphologie und zellspezifische Antikörper vorgenommen. Mit dem Anstieg der Stadien konnte eine zunehmende CD40-Expression auf MACs und VSMCs beobachtet werden. Der stärkste Anstieg der CD40-Expression wurde in den frühen Stadien 0 zu 1 und zu 2 beobachtet (Abb.7). Am häufigsten wurde CD40 von Makrophagen expremiert. Ein Verhältnis von 3:1 zwischen MACs und VSMCs in der Expression von CD40 blieb annähernd konstant während der Progression durch die Stadien hindurch.

Abb.12 :

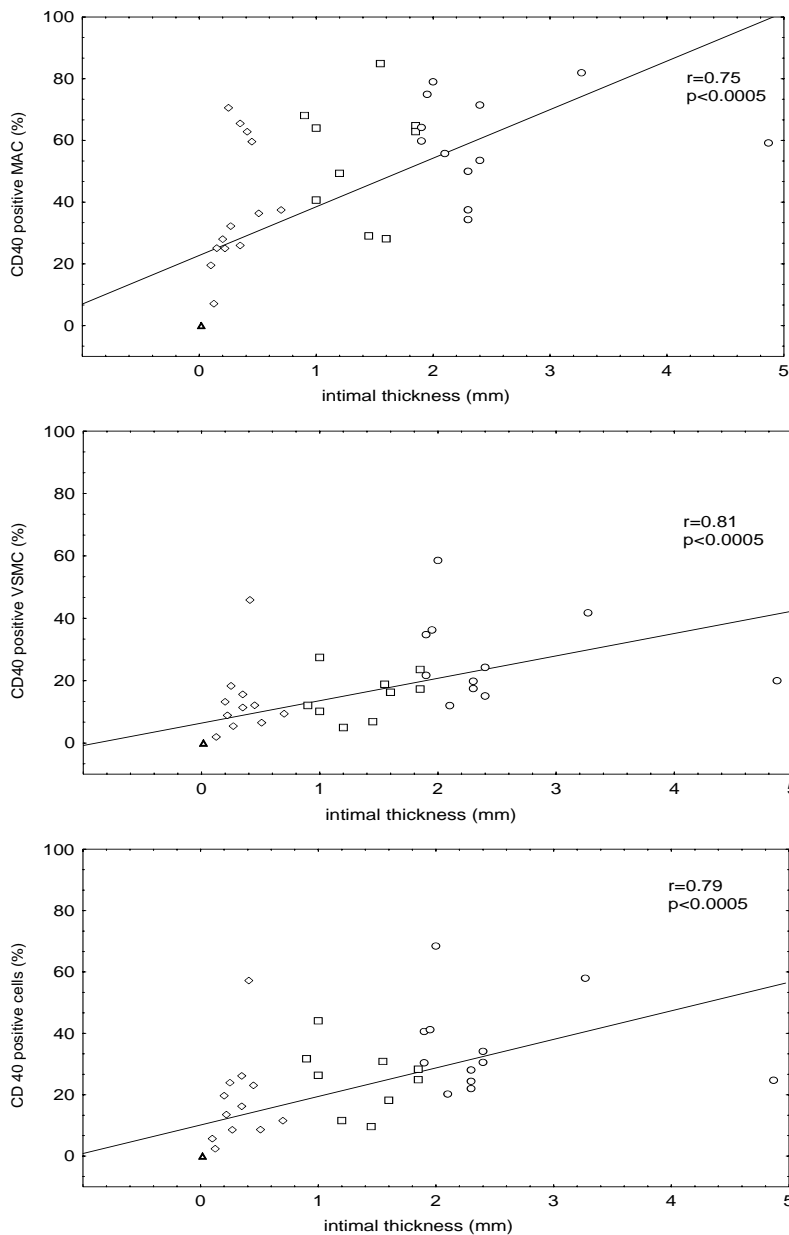


Zunahme der CD40-Expression mit dem Fortschreiten der atherosklerotischen Stadien, klassifiziert nach den WHO-Kriterien. Für die humanen Iliakalgefäße von 43 Patienten wurden jeweils 9 Gesichtsfelder (HPF) analysiert. Gezählt wurden Makrophagen und Vaskuläre glatte Muskelzellen und die jeweils CD40 positiven Zellen der beiden Zellarten. Daraus wurde die prozentuale CD40-Positivität bestimmt und in der Graphik aufgeführt. Die CD40 positiven Makrophagen (Quadrate) und CD40 positiven VSMCs (Kreise) sind als Mittlere Prozentzahl  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. \*\*  $p < 0,0005$  zeigt statistische Signifikanz verglichen mit Stadium 0, § Signifikanz verglichen mit Stadium 1 ( $p < 0,05$ ), # verglichen mit Stadium 2 ( $p < 0,05$ ), definiert nach dem Mann-Whitney U Test.

### 3.7.4. Korrelationen

#### Korrelation der Intimadicke

Berechnet mit der Rangkorrelation nach Spearman ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen der Intimadicke und den CD40-positiven Gesamtzellen ( $r = 0,79$ ,  $p = 0,0005$ ) sowie deren Differenzierung in CD40-positive Makrophagen ( $r = 0,75$ ,  $p < 0,0005$ ) und in CD40-positive vaskuläre glatte Muskelzellen ( $r = 0,81$ ,  $p < 0,0005$ ).



**Abb. 13**

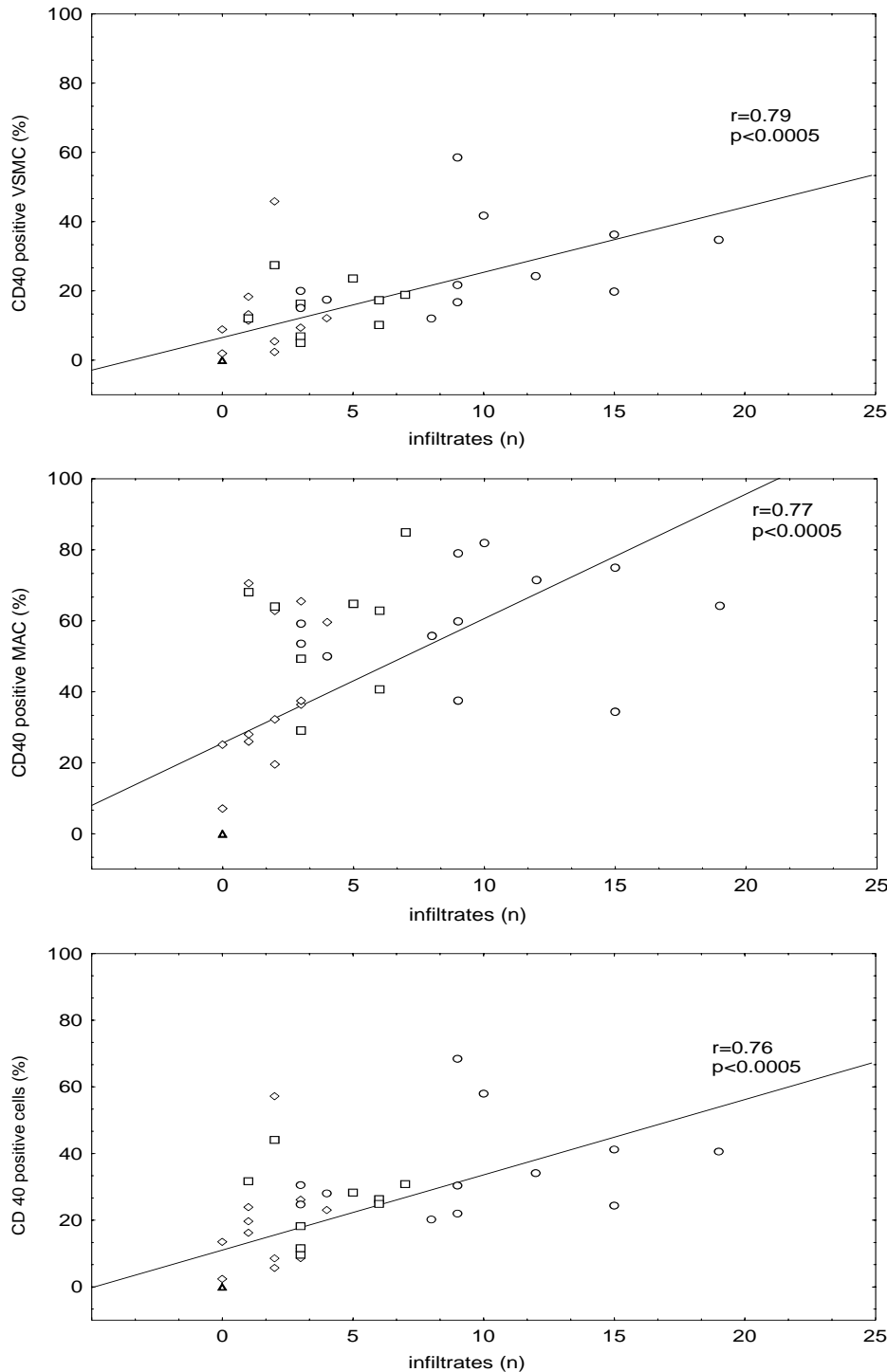
Abbildung der Korrelation der Intimadicke mit den CD40-positiven Gesamtzellen, MACs und VSMCs. Die Werte wurden klassifiziert nach den Atheroskleroestadien der WHO dargestellt

- (  $\triangle$  = WHO 0
- $\diamond$  = WHO 1
- $\square$  = WHO 2
- $\circ$  = WHO 3 )

Ein p-Wert von  $< 0.05$  wurde als statistisch signifikant angenommen.

### Korrelation der Infiltrate

Ebenfalls eine signifikante Korrelation bestand zwischen der Anzahl der Infiltrate und den CD40-positiven MAC ( $r = 0,77$ ,  $p < 0,0005$ ), den CD40-positiven VSMCs ( $r = 0,79$ ,  $p < 0,0005$ ) und den CD40-positiven Gesamtzellen ( $r = 0,76$ ,  $p = 0,0005$ ).



**Abb.14 :**

Abbildung der Korrelation der Infiltrate mit den CD40-positiven Gesamtzellen, MAC und VSMCs. Die Werte wurden nach den Atheroskleroestadien der WHO-Klassifikation dargestellt.

- (  $\triangle$  = WHO 0
- $\diamond$  = WHO 1
- $\square$  = WHO 2
- $\circ$  = WHO 3 )

Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angenommen, definiert durch die Rangkorrelation nach Spearman.

## 4. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, die Häufigkeit und Verteilung der CD40 und CD154 Expression auf EC, VSMCs, MACs und T-Zellen in der Gefäßwand und im Verlauf der Pathogenese der Atherosklerose zu untersuchen. Die Studie umfasste die immunhistologische Untersuchung von Gewebe aus 43 humanen Arterien (Arteriae iliacae). Mit Hilfe einer semiquantitativen Analyse der Schnitte, die mit CD40, CD154 und anderen immunhistologischen Oberflächenmarkern gefärbt waren, wurde die prozentuale CD40-Expression einzelner Zellspezies ermittelt.

### 4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Die vorliegenden Ergebnissen demonstrieren erstmals *in vivo*, dass CD40 in fortgeschrittenen intimalen Läsionen von maximal  $26,52\% \pm 4,12$  der VSMC (WHO-Stadium 3) und  $60,13\% \pm 4,58$  der MAC (WHO-Stadium 3) (Mittelwerte  $\pm$  SEM) exprimiert wird. Präparate mit normaler Wandmorphologie (gesunde Gefäße) zeigen keine signifikante CD40-Expression in der Intima oder Media. Der Anstieg der CD40-Expression auf VSMCs und MAC beginnt mit den frühesten Läsionen (WHO-Stadium 1), den „fatty streaks“. Der Anstieg der relativen CD40 Expression ist in den früheren Stadien stärker als in den späteren. Der steilste Anstieg zeigt sich zwischen Stadium 0-2. Die genannten maximalen Expressionswerte liegen im WHO-Stadium 3 vor.

Zwischen dem WHO-Stadium der Atherosklerose und der prozentualen Expression von CD40 auf MACs und VSMCs liegt eine signifikante Korrelation vor. Ebenfalls korreliert die relative Expression mit der zunehmenden Intimadicke und der Anzahl der Infiltrate signifikant.

Diese Daten legen *in vivo* einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen dem Fortschreiten der Atherosklerose und der Expression von CD40 in der Gefäßwand nahe. Die frühe Aktivierung CD40-vermittelter Funktionen in dem Stadium der „fatty streaks“ der VSMCs und MACs weisen auch auf eine Bedeutung für den Entstehungsprozess der Atherosklerose hin. Die Korrelation mit der Anzahl der Infiltrate stellt dies in den Zusammenhang vaskulärer inflammatorischer Prozesse. Interessanterweise beträgt die Ratio zwischen CD40 positiven MACs und VSMCs recht konstant 3:1 in allen Stadien, was die Dominanz der Makrophagen innerhalb des entzündlichen Prozesses der Atherogenese betont.

Zudem demonstrieren wir die gemeinsame Expression von CD40, ICAM-1, VCAM-1 und MMP-2 in der Neointima des atheromatösen Plaques. Dadurch könnte die CD40-Ligation in

VSMCs in situ die Inflammation, Leukozytenadhäsion und Migration in die Gefäßwand verstärken.

Auch die Verteilung der CD40+ Zellen innerhalb der Gefäßwand wird untersucht und zeigt ein typisches Bild für verschiedene Stadien (Daten nicht gezeigt). Die Expression dieses Rezeptors zeigt auffälligerweise keine Variabilität von Patient zu Patient. Die Intensität der CD40-Expression korreliert mit dem Stadium der Plaques, intraindividuell und im Vergleich der 43 Patientenproben untereinander, die in dieser Studie untersucht werden.

### **4.2. CD40 Expression der vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs)**

Die vorliegende Studie zeigt erstmals in vivo eine relevante CD40 Expression der VSMCs in atherosklerotischen Läsionen über kleine Stichproben hinaus (Mach et al.1997). Schon der Übergang vom gesunden Gefäß zum WHO-Stadium 1 bringt eine anteilige Expression von CD40 auf  $11,74 \% \pm 3,07$  der in die Intima migrierten Zellen mit sich, die sich bis auf maximal  $26,51 \% \pm 4,12$  in den fortgeschrittenen Läsionen (WHO Stadium 3) steigert.

Der starke Anstieg in den frühen Läsionen stellt die Frage nach einer Bedeutung für die frühen pathologischen Prozesse der Atherosklerose wie: Phänotypwechsel zum synthetischen Typ, Proliferation, Chemotaxe und Migration aus der Media. Zur Regulation dieser Funktionen durch CD40 liegen bisher kaum Daten vor.

Hinweise auf dieses frühe Funktionsspektrum sind die CD40-abhängige Hochregulierung der Bildung von IL-8 und IL-6 durch VSMCs und ECs, und die resultierende Förderung der Proliferation und Migration der VSMCs (Mach et al.1997; Raines et al.1995). Weitere Funktionen sind die CD40-abhängige Bildung des Tissue factors durch mehrere vaskuläre Zellspezies, unter anderem mit Regulationsfunktionen im Bereich der Angiogenese (Slupsky et al.1998), der VSMC-Migration und der Kontrolle der Integrität des Gefäßes durch Regulationsvorgänge in der Reifung der vaskulären Muskelschicht (Carmeliot et al.1998).

Die Daten zeigen die signifikante Korrelation der steigenden CD40-Expression mit der Anzahl der entzündlichen Infiltrate und der zunehmenden Dicke der Intima durch Lipideinlagerung und Ansammlung extrazellulärer Matrix (s. Abb.12 und 13). Auffällig ist auch eine höhere CD40 Expression im Bereich der entzündlichen Infiltrate, vor allem im Schulterbereich der Lipidbeete, mit möglichem Kontakt zu T-Zellen. Diese in vivo Daten korrelieren mit der Anregung der proinflammatorischen Reaktionen durch die CD40-Ligation auf VSMCs. Die Bildung von Zytokinen wie IL-6, IL-8 und IL-1 $\beta$  (Schönbeck et al.1997, Mach et al.1997 und 1998) gehört dazu. IL-6 ist an der Aktivierung von T-Zellen und der Differenzierung von MAC beteiligt und aktiviert die Koagulation (Raines et al.1996). IL-8 führt zur Rekrutierung

von Lymphozyten und zur Proliferation und Migration von VSMCs. Über CD40 wird auch die Induktion der Bildung von Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und VCAM-1 auf VSMCs (Braun et al. 1999) hochreguliert, welche die Leukozytenakkumulation durch Chemotaxe, Aktivierung monozytärer Zellen und die Regulation von Zellzyklus und Proliferation bewirken (Raines et al. 1996).

Es ist bekannt, dass die synthetische Leistung der VSMCs an extrazellulärer Bindegebewebmatrix wie Kollagen Typ I und III (Amento et al. 1991) sowie Elastin und Proteoglykanen (Ross 1993) bestimmend für den Aufbau der Plaques ist. Obgleich wenig über die klinischen Konsequenzen verschiedener Plaque-Formationen bekannt ist, wird der Vorteil der fibrösen Plaques mit höherer Stabilität und geringerem Risiko der Plaque Ruptur in den Vordergrund gestellt (Schönbeck et al 1997, Mach et al. 1997). Tierexperimentell wurde beobachtet, dass die CD154-Inhibition einen kollagenreichen Plaque fördert (Lutgens et al. 1999 und 2000). Da über die CD40-Hemmung die Bildung von  $IF\gamma$  reduziert wird, stimmen die Ergebnisse mit denen überein, die eine  $IFN\gamma$ -getriggerte Hemmung der Kollagen I- und -III Synthese durch T-Zellen beschreiben (Amento et al. 1991). Indem die Hemmung von CD40 in allen Tiermodellen (Lutgens et al. 1999 und 2000) zu einer Reduktion der Anzahl an MAC, stärkeren Dominanz von VSMCs und konsekutiven Veränderung des Plaque-Typus im Sinne eines bindegewebsreichen, stabileren Plaques geführt hat, ist die Wirkung von CD40 in Richtung einer Hemmung der von MAC ausgelösten Proliferation der VSMCs, sozusagen einer Stärkung der TH-1-lymphozytären Effekte, über  $IFN\gamma$  anzunehmen. Eine Hemmung der Kollagensynthese durch die CD40-Ligation läge in diesem Kontext nahe. Diesen Funktionen wurde bisher weder in vivo noch in vitro nachgegangen.

Auch die Bildung von Matrixmetalloproteinasen auf VSMCs wird über CD40 reguliert. Die CD40-Ligation führt zur vermehrten Synthese der interstitiellen Kollagenase (MMP-1), Stromelysin (MMP-3) und Gelatinase B (MMP-9) und die Gelatinase-A (MMP-2) wird in ihrer aktiven Form abgegeben (Schönbeck et al. 1997). Die CD40 Ligation induziert die Expression dieser Enzyme in größerem Maße als die maximal effektiven Konzentrationen der etablierten Agonisten  $TNF\alpha$  und  $IL-1\beta$  (Schönbeck et al. 1997, Mach et al. 1997 und 1998). Alle drei MMPs der interstitiellen Kollagenasen MMP-1, MMP-8 und MMP-13 werden in humanen atheromatösen Gefäßen exprimiert (Hermann MP et al. 2001). Durch die Matrixdegradation kommt es zur Lockerung des Bindegewebes, was vielseitige Effekte für die Leukozytenbeweglichkeit bei Migration und Abtransport, Angiogenese und Umbildung der Plaqueformation hat. Somit findet über die CD40-Ligation der VSMCs die Regulation der extrazellulären Matrix-Komponente im Sinne des Aufbaus und der Degeneration statt.

### 4.3. CD40 Expression der Makrophagen

Das Vorkommen von MAC in frühen Stadien („fatty streak“) der Atherosklerose ist seit 1987 bekannt (Munro et al.1987). Der in den vorliegenden Daten beschriebene hochsignifikante Anstieg der CD40 Expression der MAC in der Intima von 0 auf  $38,09 \% \pm 5,35$  in der frühen Pathogenese der Atherosklerose von WHO-Stadium 0 zu 1 (gesundes Gefäß zu früher Läsion mit „fatty streaks“), sagt aus, dass fast 40% der in die Intima migrierenden Monozyten als MAC in der Gefäßwand unmittelbar CD40 exprimieren. Bekannt ist, dass die in atherosklerotischen Gefäßen gefundenen MAC MHCII und HLA-DR sowie die kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 exprimieren, was ihren Aktivitätszustand und die Fähigkeit Antigene zu prozessieren und zu präsentieren anzeigt (Hansson et al.1989, Jonasson et al. 1986, van der Wal et al. 1989). Die in der vorliegenden Untersuchung gezeigte hochgradige Expression von CD40 komplettiert das Bild der aktivierten, zur Antigenpräsentation an die CD4+ T-Zelle fähigen, differenzierten Zelle. Damit ist gezeigt, dass die MAC die Schlüsselstellung zur Aktivierung der T-Zellen in der Gefäßwand einnehmen können.

Der weitere Anstieg auf  $60,12 \% \pm 4,58$  im WHO-Stadium 3, beschreibt eine quantitative Zunahme im Verlauf der Gefäßwandpathologie, die entweder die Höherregulation der CD40 vermittelten Funktionen oder eine Hinzunahme weiterer Funktionen im Krankheitsverlauf beinhaltet. Für die Progression der Pathogenese wesentlich sind viele CD40 vermittelte Funktionen über die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-6, IL-8, p40 Il-12 (Kiener et al. 1995, Kato et al.1996) sowie IFN $\gamma$ , NO und IL-12 (Stout et al. 1996; Tian et al.1995; Flawell et al. 1998). Die entzündliche Reaktion im Plaque wird verstärkt und durch die IL-12-Generierung eine TH-1 Antwort begünstigt. Ebenfalls CD40 vermittelt ist eine erhöhte Expression von ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD80), B7-2 (CD86), MHCII und CD40 selber (Kiener et al.1995), was unter anderem zur Adhäsion der Leukozyten an die endotheliale Seite der Gefäße und Migration in die Gefäßwand dient.

Unsere Daten zeigen, dass die MAC durch alle Stadien hindurch circa dreimal so viel CD40 wie die VSMCs exprimieren, was die Bedeutung dieser Zellart für die lokale Entzündungsreaktion unterstreicht.

Auch die CD40-positiven MAC liegen vor allem in der Schulterregion der Plaques in den Infiltraten bei fortgeschrittenen Läsionen, häufig auch neben den Gefäßneubildungen. Die hohe immunologische Aktivität in der Schulterregion und insbesondere die Bildung von Metalloproteinasen wird für die Rupturgefahr verantwortlich gemacht. Mittlerweile ist bekannt, dass auch bei MAC viele MMPs durch die CD40-Ligation hochreguliert werden: interstitielle



Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13) (Herman et al.2001), Stromelysin (MMP-3), (Mach et al.1997 und 1999, Schönbeck et al.1997) und die Matrix Metalloelastase (MMP-12) (Wu et al. 2000). Über die direkte Bildung hinaus führen oben genannte, CD40 getriggerte Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) zur weiteren Anregung der Produktion von Metalloproteinasen sowohl durch MAC selber als auch durch VSMCs und ECs. Diese Funktion ist im Zusammenhang mit der weiteren Steigerung der CD40 Expression in die späteren Stadien hinein zu sehen.

#### **4.4. CD40 Expression der Endothelzellen**

In der vorliegenden Untersuchung konnte eine CD40 Expression der EC schon in der sehr frühen Phase der subendothelialen Fettansammlung beobachtet werden (s. Abb 5). Funktionell ist damit die Hochregulierung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106) und E-Selectin (CD62E) sowie die Migration der Leukozyten verbunden (Karmann et al.1995; Hollenbaugh et al.1995; Yellin et al.1995). Ihre differenzierte Expression reguliert zudem die Selektion der migrierenden Zellspezies (Kotowitz et al.2000). Ebenfalls dient die Bildung CD40 regulierter chemotaktischer Faktoren wie monocyte chemoattractant protein (MCP-1) und RANTES (Mach F et al.1997) der Migration. Diese Funktionen sind als initiiierende Faktoren atherosklerotischer Läsionen und als Schrittmacher der Atherosklerose zu sehen.

Leider war es nicht möglich die CD40 Expression auf EC zu quantifizieren. Das Vorkommen in allen Stadien wurde jedoch von uns und anderen (Mach et al. 1997) nachgewiesen. Im Verlauf der Pathogenese der Atherosklerose ist CD40 auf EC an der Regulation folgender Funktionsgebiete beteiligt: Gerinnung (erhöhte Synthese von Tissue Factor und PAI-1/ Mach et al.1997; Miller et al. 1998), Chemotaxe (Hochregulation von ox.LDL und MCP-1 (Ross 1993) Bildung proinflammatorischer Zytokine wie erhöhte Produktion von IL-6, IL-8 und Expression von aktivem IL-1 $\beta$  ( Schönbeck et al. 1997; Mach et al.1997 und 1998) und Bindegewebsdegradation z.B. im Rahmen der Angiogenese durch MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-2, sowie VEGF (Mach et al.1997 und 1999), alles Funktionen der proinflammatorischen Reaktion im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose.

Mit der Koexpression von CD40, VCAM-1, ICAM-1 und MMP-1 wurde im Rahmen dieser Untersuchung in vivo ein zusätzlicher Hinweis auf den genannten funktionellen Zusammenhang zwischen CD40, der Expression von Adhäsionsmolekülen und der Matrixdegeneration durch Metalloproteinasen gegeben.

#### **4.5. CD40-Expression der Endothelzellen der Adventitia**

Erstaunlich waren die Ergebnisse der CD40 Expression der EC der Adventitia. Diese sind durch alle Stadien hindurch hochgradig positiv. Dasselbe gilt für die Gefäßneubildungen (Neovessels) in den Plaques. Die hochgradige Aktivierung spricht für eine starke immunologisch inflammatorische Aktivität in diesen Gefäßabschnitten. Welchen funktionellen Zusammenhang dies in der Adventitia hat, wäre Gegenstand weiterer Studien.

#### **4.6. CD40 und CD154 Expression der T-Zellen**

Als eines der frühesten Ergebnisse zur Entzündungsreaktion der Atherosklerose wurde 1986 von Jonasson sowie Hansson et al. das Vorkommen von T-Zellen in der Gefäßwand beschrieben, die zu den ersten, die Intima infiltrierenden Leukozyten gehören (Hansson 1988; Xu et al. 1990).

Der CD40 Ligand/ CD154 wurde erstmals 1992 von Graf et al. auf CD4+ T-Zell Oberflächen gefunden. Seither gilt der T-Lymphozyt als die hauptsächliche Quelle von CD154 und wurde neben Mastzellen, Basophilen (Gauchat et al. 1993) und Eosinophilen (Gauchat et al. 1995) 1998 von Henn et al. auch auf Thrombozyten gefunden. Da die T-Zelle in der Gefäßwand dennoch die hauptsächliche CD154 exprimierende Zellart ist, war ihre Untersuchung ebenfalls Ziel der vorliegenden Studie.

Obwohl die genannten Methoden der Immunhistochemie (APAAP, Streptavidin Biotin und Avidin Biotin Complex Methode) in allen anderen Fällen gute Ergebnisse mit soliden positiv- und negativ-Kontrollen erbrachten, war es mit allen vier (genzyme, Immunotech, Calbiochem, Santa Cruz) erhältlichen und in der Literatur sowie in Material und Methoden genannten Antikörpern nicht möglich, den CD40Liganden/CD154 in Lymphknoten oder in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques mit vielen aktivierten T-Zellen als Positivprobe valide darzustellen. Einzelne positive Resultate konnten nicht sicher wiederholt werden, so dass wir die Bilder nicht verwerteten.

Da es sich um etablierte Methoden handelt, sind die genannten Methoden als Fehlerquelle unwahrscheinlich. Bezüglich der Antikörper lagen saubere Negativkontrollen vor. Die Spezifität war gewährleistet. Die Ursache der wechselnden Ergebnisse lag wahrscheinlich an der Sensitivität der neu auf den Markt gekommenen Anti CD40Ligand/CD154 Antikörper.

Irritierend waren die Untersuchungsergebnisse von Mach et al. 1997 mit der Darstellung des CD40Liganden auf nahezu allen Zellspezies der Gefäßwand. Mittlerweile sind weitere Studien durchgeführt worden, die das Problem illustrieren: Während Mach et al. CD154 auf

HUVECs, VSMCs, MAC – als Koexpression mit CD40 - darstellen konnten und zwar auf der Ebene der mRNA (PCR), der Proteine (Western blot und radioimmunoprecipitation Analyse) und in vivo (FACS-Analyse und Immunhistochemie) (Mach et al.1997), zeigen die Ergebnisse von Scabolcs et al. 2000 CD154 im atherosklerotischen Plaque als streng auf T-Lymphozyten begrenzt, belegen dieses allerdings rein immunhistochemisch. Büchner et al. arbeiten 2003 die Fragestellung nochmals durch alle methodischen Ebenen hindurch auf. Ihre Ergebnisse zeigen eine Beschränkung der CD154 Expression auf T-Zellen (im Plaque hauptsächlich CD4+ T-Zellen) und auf Thrombozyten. Nach den Daten ihrer Arbeitsgruppe ist der verwendete Antikörper (Mab 24-31) unspezifisch, was auf der Ebene der Immunhistologie und der Flow Cytometrie eine Erklärung der Ergebnisse von Mach et al. darstellen würde. Offen bleibt die Diskrepanz auf der Ebene der m-RNA, da unter identischen Konditionen die RT-PCR Ergebnisse nicht reproduzierbar waren. Auch im Western-blot und der Radioimmunoprecipitation blieben die Ergebnisse different. Trotzdem vereinzelt Koexpressionen im Rahmen der Transplantat Abstoßung beschrieben sind (Raul et al.1997, Gaweco et al.1999) bleiben die Daten divergent.

Wir konnten keine reproduzierbare CD154 Expression in atherosklerotischen Geweben zeigen. Vereinzelt war eine CD154 Expression auf T-Zellen in Lymphknoten sowie in atherosklerotischen Plaques zu sehen. Eine Darstellung auf EC, MACs und VSMCs kam nicht vor. Die Schwierigkeit in der validen Darstellung des Liganden steht darüber hinaus unter Verwendung derselben Antikörper (polyklonaler anti CD40L/CD154 Antikörper von Santa Cruz Biotechnology), jedoch anderer immunhistochemischer Methoden (APAAP statt Vectastain Avidin Biotin peroxidase Komplex (ABC) kit ) mit den 1997 publizierten Ergebnissen von Mach der Arbeitsgruppe P. Libby in Divergenz, obschon sich die Daten zur CD40 Expression mit denselben Methoden decken.

Ein weiteres Problem erschwert eventuell die Darstellung von CD154 in vivo. Bei der Untersuchung der Kinetik der CD154 Expression auf Thrombozyten wurde von Henn et al. 2001 gezeigt, dass der CD40L/CD154 sofort nach der Ligation mit CD40 (koexprimiert auf Thrombozyten) als lösliche Form abgegeben wird. In T-Zellen liegt CD154 die meiste Zeit intrazellulär vor. Wird er durch einen MHC-restringierten Stimulus auf die Oberfläche gebracht, interagiert er nur kurz mit CD40 auf den Partnerzellen. Daraufhin wird er entweder internalisiert (Yellin et al.1994) oder in einer löslichen Form abgestoßen (Graf et al.1995). Trotz der kurzen Interaktionszeit ist die Wirkung beeindruckend in ihrer Schlüsselfunktion und Effektivität, z.B. in der Notwendigkeit für den Immunglobulin-Klassenwechsel der B-Zellen. Auf-

grund dieser biologisch effektiven und weitreichenden regulatorischen Funktionen muss die Wirkung von T-Zellen streng kontrolliert werden, da sonst eine massive inflammatorische Reaktion oder der Trigger zur Entwicklung eines Lymphoms entstehen kann (Dunn et al.1997).

Die kurze Halbwertszeit auf der Zelloberfläche von T-Zellen aber auch Thrombozyten in vivo sind eine weitere Erklärung, warum sich die immunhistologische Darstellung des CD40-Liganden CD154 so schwierig gestaltete.

### **4.6.2. Antigen Diskussion**

Immunhistologische Studien wie die vorliegende, zeigten aktivierte Makrophagen (MHC II, B7-1, B7-2, CD40-Expression) und aktivierte CD4+ T-Zellen in den Plaques in allen Stadien (Hansson et al.1988; Hansson et al.1989; van der Wal et al.1989). Die Art der Aktivierung und das Zytokinmuster weisen auf eine spezifische polyklonale TH1 Immunreaktion im Plaque hin (de Boer et al. 2000). Im Bezug auf die Frage, ob es sich bei den immunologischen Reaktionen im Rahmen der Atherosklerose um unspezifische Epiphänomene oder eine spezifische Immunreaktion mit relevantem Einfluss handelt, sprechen diese Daten entschieden für eine spezifische zellvermittelte Immunantwort. Dass die T-Zellen polyklonal sind, weist auf multiple Antigene oder Epitope hin. Bis jetzt ist die Frage nach möglichen Antigenen und der Intraplaque Immunaktivierung jedoch hypothetisch und ungeklärt (De Boer et al. 2000) und bedarf der weiteren Untersuchung.

### **4.7. Effekte der CD40 Ligation auf die Pathogenese der Atherosklerose**

In einer Studie von Mach 1998 zeigte sich, dass die Gabe von Antikörpern gegen CD154 an 8 Wochen alte, hyperlipidämische Mäuse (LDL-Rezeptor defizient), nach 12 Wochen cholesterinreicher Diät zu einer Abnahme der aortalen Läsionen um 59% und des Lipidgehaltes um 79% führte; außerdem fanden sich in den Atheromen signifikant weniger Makrophagen (64%) und T-Zellen (70%) und es lag eine verringerte Adhäsionsmolekülexpression vor.

Anknüpfend an diese Ergebnisse wurden die Konsequenzen einer Unterbrechung des CD154 Gens in Apo E<sup>-/-</sup> Mäusen auf die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen in frühen und späten Phasen geprüft (Lutgens et al.1999). Während hier bei initialen Läsionen keine Veränderungen der CD154 knock-out Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt werden konnten, reduzierten fortgeschrittene Atherome ihre Ausdehnung um 550%. Die Plaque Morpho-

logie veränderte sich, indem sie anstelle der Lipide mehr Kollagen enthielten. Es zeigte sich ein stabiler Plaque Phänotyp mit reduzierten T-Lymphozyten und Makrophagen.

Ebenfalls in ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen wurde 2000 eine Anschlussstudie von Lutgens durchgeführt. Um die Effekte in der frühen und späten Phase der Atherogenese zu kontrollieren, wurden CD154-Antikörper in einer Gruppe ab der 5. Woche, in einer zweiten Gruppe ab der 17. Woche gegeben. In beiden Gruppen konnte keine Reduktion der Plaque-Area gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. In beiden Gruppen war der T-Zell-Gehalt der Plaques reduziert und der Gehalt an Kollagen, VSMCs, und die Dicke der fibrösen Kappe erhöht. In der spät behandelten Gruppe verringerte sich der Gehalt an MACs und an Lipidansammlungen.

Fokussierend auf die späten Stadien wurde 2000 von Schönbeck Anti CD154 in der zweiten Hälfte einer 26 wöchigen Cholesterol Diät bei LDL-Rezeptor-defiziente Mäusen gegeben, nachdem sich schon atherosklerotische Plaques gebildet hatten. Es zeigte sich nach 13 Wochen keine Regression der Läsionen im Vergleich zum Vorbefund, jedoch eine signifikant verringerte Zunahme im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Darüber hinaus wurden die vorbekannten Veränderungen der Plaque Morphologie mit weniger Makrophagen und Lipiden sowie relativ mehr glatten Muskelzellen und Kollagen beschrieben.

Ester Lutgens schließt 2003, dass die Hemmung des CD40 Systems nicht die Initiierung der Atherosklerose verhindert und nicht die Regression fördert, jedoch den Plaque Phänotyp verändert. Die Entwicklung eines lipidarmen, kollagenreichen stabilen Plaque Phänotyps wird im Verlauf gefördert und die Transformation bei schon bestehenden Plaques bewirkt. Dies legt nahe, dass die CD40 Interaktion bei der Plaque Progression vom frühen zum fortgeschrittenen Typ – wie Makrophagenakkumulation, Formation des Lipidkernes und Destabilisierung des Plaques - wichtig ist, jedoch keine pathogenetische Bedeutung für die initialen Vorgänge hat.

### **4.7.2. Funktionsspektrum von CD40/CD154 in der Pathogenese der Atherosklerose**

Unsere Ergebnisse zeigen die starke CD40 Expression schon in den frühen Stadien. Angesichts der genannten tierexperimentellen Daten, die in der Initiation keinen Effekt für CD40 finden, stellt sich die Frage nach den Funktionen in den initialen Stadien neu.

Die in der Atherogenese CD40 regulierten Funktionen wie: Chemotaxe, Adhäsionsprozesse, Leukozytenakkumulation, Proliferation, Migration und Angiogenese, Matrixdegeneration und -neubildung, Thrombozytenaggregation und Gerinnungshemmung, Aufnahme und Abräumung von Cholesterin und nekrotischem Material, Regulation und Interaktion durch Zytokine, proinflammatorische Reaktionen sind allgemeine biologische Funktionen, die auch in reparativen Prozessen, wie z.B. der Wundheilung essentiell sind (Singer et al.1999).

Es ist bekannt, dass das Immunsystem vaskuläre Reparatursprozesse kontrolliert und Zytokine Gewebsreparaturen modulieren. Beispielsweise haben T-Lymphozyt-defiziente Ratten signifikant größere Läsionen nach Verletzungen als normale Ratten der Kontrollgruppe (Hansson et al. 1991).

Die von uns festgestellte starke Expression von CD40 in den frühen Stadien der Atherosklerose, in denen auch eine Plaque-Regression noch möglich ist, kann ein Hinweis für dieses Funktionsspektrum sein (Stary et al. 1992-95 AHA / Stary et al. 2000). Die Ergebnisse der Tierversuche könnten auch Gleichgewichtsprozesse von atherogenen und reparativen Funktionen von CD40 mit Betonung reparativer Funktionen in den frühen Stadien und atherogener Funktionen in den späten Stadien widerspiegeln.

Die Frage nach weiteren antiatherogenen/reparativen Funktionen von CD40, wurde bisher weder in Studien noch in der Interpretationen der vorliegenden Daten untersucht.

## **4.8. CD40/CD154 und klinische Komplikationen**

### **4.8.1. CD40/CD154 und thrombotische Ereignisse**

Der prozentuale Anteil der thrombotischen Läsionen am atherosklerotischen, kardialen Herztod liegt in Obduktionsstudien zwischen 52% (Virmani et al. 2000) und 81% (Davies et al. 1992). Die Daten beziehen sich auf akute thrombotische Ereignisse.

Bei ca. 40% der an thrombotischen Ereignissen im Rahmen eines plötzlichen Herztodes Verstorbenen fand sich eine Erosion (charakterisiert nur durch das Fehlen der endothelialen Innenschicht) unter dem Thrombus und keine Plaque-Ruptur (Virmani et al. 2000). Dieses Ergebnis unterstreicht die hohe thrombogene Potenz der frühen Stadien der Atherosklerose.

Viele in vitro wie in vivo Studien schlagen eine zentrale Rolle für CD40/CD154 Interaktionen in der Regulation des thrombotischen Potentials der frühen CD40 Expression und der späteren Atherome vor. So induziert die Ligandierung von CD40/CD154 auf ECs, VSMCs und MACs sehr potent die Expression des prokoagulant tissue factors in vitro (Schönbeck et al. 2000; Mach et al. 1997; Zhou et al. 1998; Lindmark et al. 2000). Tissue factor ist einer der kritischen Initiatoren der Gerinnung. Mit seiner großen extrazellulären Domäne bindet er an die Faktoren VII und X und setzt dadurch den extrinsischen Weg der Blutgerinnung in Gang (Schönbeck et al. 2000). Ebenfalls kommt es über die CD40 Ligandierung zur reduzierten Expression von Thrombomodulin, dem antikoagulatorischen Rezeptor für Thrombin, was ebenfalls auf eine Regulation von CD40 in einen prokoagulant Status hinweist. Ein Effekt der thrombozytären CD40

Ligation auf die Thrombozytenaktivierung oder Thrombozytenaggregation konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Henn et al.2001).

Bezüglich der Förderung antithrombotischer Eigenschaften durch die CD40-Ligation wurden bisher keine Untersuchungen durchgeführt.

### **4.8.2. CD40/CD154 und die Plaque Ruptur**

Wie erwähnt kann gesagt werden, dass CD40 in der Schulterregion des Plaques seinen präferierten Expressionsort hat und dieses Areal bekannt dafür ist, die vulnerable Stelle für Plaque Rupturen zu sein. Der Spielraum der vorliegenden Studie umfasste nicht instabile oder rupturierte Plaques zu analysieren.

Die Plaque Ruptur wird definiert als eine Unterbrechung der fibrösen Kappe, bei der der aufliegende Thrombus mit dem nekrotischen Kern in kontinuierlicher Verbindung steht (Virmani et al. 2000). Bis heute gilt dieses Ereignis als die Haupttodesursache im Rahmen des plötzliche Herztodes. Die Ergebnisse verschiedener Studien an Autopsien und angiographischen Studien liegen zwischen 73% (Davies et al. 1992), 60 % (van der Wal et al. 1994) und 31% (Virmani et al. 2000). Auch wenn die aktuelleren Erhebungen die niedrigeren Werte darstellen, bleibt die Ruptur des Plaques doch die hauptsächliche Todesursache unter den Komplikationen kardialer atherosklerotischer Erkrankungen. Gleichzeitig wurde in einer Autopsiestudie festgestellt, dass bei 10% der nicht an kardiovaskulären Ursachen Verstorbenen Plaque Rupturen vorlagen (Arbustini et al.1991). Damit zeigt sich, dass Rupturen als Ursache fataler Folgen in seinem Anteil am plötzlichen Herztod entgegen der Annahmen der letzten Jahre (u.a. Ross 1993) kritisch diskutiert werden muss.

Wie bereits von Mach et al. 1999 und Schönbeck et al. 1997 berichtet, induziert die CD40-Ligation auf Makrophagen, ECs und VSMCs die Expression matrix-degradierender Metalloproteinasen wie MMP-1, MMP-2 und MMP-9 sowie MMP-3. CD40-CD154 signalling ist dadurch an der Regulation der Verdauung von extrazellulärer Matrix beteiligt und fördert die Instabilität des Plaques und die Rupturgefährdung mit dem Risiko des thrombotischen Ereignisses.

#### **4.8.3. Klinische Studien zu CD40/CD154**

In einer serologischen Untersuchung am Menschen von Aukrust und Gullestad konnte 1999 gezeigt werden, dass Patienten mit instabiler Angina Pectoris gegenüber der Kontrollgruppe mit stabiler Angina Pectoris signifikant erhöhte lösliche (s) CD154-Serumspiegel hatten. Die Thrombozyten der Patientengruppe mit instabiler Angina Pectoris zeigten verringerte CD154-Spiegel intrazellulär und eine verringerte Abgabe von sCD40 nach Stimulation mit SFLLRN (thrombin rezeptor agonist peptid), was möglicherweise auf einen erhöhten Anteil degranulierter Thrombozyten hinweist. Die T-Zellen dieser Patienten wiesen eine erhöhte CD154 Oberflächenexpression auf. Rekombinantes CD154 sowie Serum der Patienten mit erhöhtem CD154 induzierten bei mononukleären Zellen eine erhöhte Abgabe von monocyte chemoattractant peptide-1 (MCP-1), einem für die Pathogenese der Atherosklerose wichtigen CC-Chemokin.

Der Funktionszusammenhang einer erhöhten sCD154-Konzentration im Serum wurde von Tsakiris 2000 untersucht, der eine Assoziation mit erhöhten Werten an löslichem VCAM-1, Thrombomodulin und Trends zu erhöhtem löslichen P- und E-Selektin feststellte.

Die CD154 Expression auf aktivierten Thrombozyten ist während akuter koronarer Syndrome erhöht, bei stabiler Angina Pectoris normal und zeigt bei komplexeren Läsionen und Gefäßokklusionen eine Tendenz zu erhöhten Werten (Lee et al. 1999). Diese Ergebnisse wurden 2001 von Garlichs et al. bestätigt, die ebenfalls eine erhöhte CD154 Expression auf Thrombozyten und in löslicher Form sCD154 im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms oder instabiler Angina Pectoris feststellte.

Der erhöhte CD154 Spiegel im Serum, sowie auf Thrombozyten und T-Zellen könnte MMPs auf den vaskulären Zellen aktivieren und durch die Degradierung der Extrazellulären Matrix in die Pathogenese akuter koronarer Syndrome involviert sein.

Bezüglich der Risikofaktoren konnte in einer Studie von Garlichs et al. 2001 ein signifikanter Anstieg des CD154 und P-Selectin auf Thrombozyten sowie des CD40 auf Monozyten im Vergleich zu gesunden Personen bei moderater Hypercholesterolämie gezeigt werden. Das lösliche sCD154 zeigte einen nicht signifikanten Trend für höhere Plasmaspiegel. Die biologische Aktivität von CD154 auf Thrombozyten liegt beispielsweise in der Steigerung der Abgabe von MCP-1 sowohl in einer Thrombozyten-EC-Kokultur als auch im Serum von Patienten. Durch einen HMG-CoA Reduktase Inhibitor wurde CD40 auf Monozyten und die Serumlevel für MCP-1 verringert. Diese Hochregulierung des CD40-Systems bei moderater Hypercholesterolämie könnte zu dem proinflammatorischen, proatherogenen und prothromboti-



schen Milieu dieser Patienten beitragen. Diese Ergebnisse untermauern die klinische Relevanz des CD40 Systems sowohl in der Entwicklung eines akuten koronaren Syndroms als auch in der Langzeitentwicklung der koronaren Herzerkrankung. Sie schließen sich nahtlos an die Hinweise zur Beteiligung des Immunsystems an der Angina Pectoris und ihrer Stabilitätsgrade an.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen der CD154-Inhibierung in der Atherosklerose und dem Effekt auf Progression und Phänotyp konnte keine signifikante Verbesserung bei Transplantations-Atherosklerose gefunden werden. Die Inhibierung des CD40-CD154-Signalling verbesserte das Überleben von Herz-, Haut- und aortalen Allografts, war jedoch nicht effektiv in der Prävention der Transplant Atherosklerose (Larsen et al. 1996; Shimizu et al. 2000; Sun et al. 1997). Auch die Neointimabildung verhält sich gegensätzlich zur primären Atherosklerose. Collar induced neointima formation in der Arteria carotis war bei CD154<sup>-/-</sup> Mäusen erhöht im Vergleich zu normalen Mäusen (Remskar et al. 2001). Diese Resultate entsprechen denen bei immunologisch eingeschränkten Mäusen (Hansson et al. 1991). Ein Mechanismus zur Erklärung dieser Ergebnisse wäre der reduzierte IF $\gamma$  Gehalt durch die CD154 Defizienz, der die Inhibierung der VSMC Proliferation und die Dedifferenzierung bewirkt (Lutgens et al. 2002).

### **Grenzen der Studie:**

In der vorliegenden Studie wurden von uns Proben humaner peripherer Iliakalarteien analysiert. Obwohl keine Koronararterien untersucht wurden, nehmen wir an, dass unsere Ergebnisse übertragbar sind und auch dort mit der Progression der Atherosklerose eine zunehmende Expression von CD40 beobachtet werden kann.

## Zusammenfassung:

Ziel dieser Studie war es, die Häufigkeit und Verteilung der CD40- und CD154-Expression auf Endothelzellen (EC), vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC), Makrophagen (MAC) und T-Zellen im Verlauf der Pathogenese der Atherosklerose zu untersuchen. Die Studie umfasste die immunhistologische Untersuchung humaner Arteriae iliacae von 43 Patienten. Fünf- $\mu$ m Kryoschnitte wurden mit Antikörpern gegen CD40, CD154 und spezifisch gegen die genannten Zellarten gefärbt und mikroskopisch untersucht. Die prozentuale CD40-Expression einzelner Zellspezies wurde ermittelt und ihre statistische Korrelation mit der WHO-Klassifikation der Atherosklerose, der Intimadicke und der Anzahl der Infiltrate bestimmt.

Das Vorkommen von CD40 auf Zellen der Gefäßwand wurde zuvor in vivo nur vereinzelt in fortgeschrittenen Stadien beschrieben (Hollenbaugh et al. 1992). Bezüglich der Expression von CD154 waren die Nachweise bisher divergent (Mach et al. 1997; Büchner et al. 2003).

Die vorliegenden Ergebnissen demonstrieren erstmals systematisch in vivo die CD40 Expression auf MAC und VSMCs von den frühesten Läsionen an (WHO-Stadium 1) mit einer maximalen Expression von  $26,52 \pm 4,12$  % der VSMC und  $60,13 \pm 4,58$  % der MAC in fortgeschrittenen intimalen Läsionen (WHO-Stadium 3). Gesunde Gefäße zeigen keine CD40-Expression. Der Anstieg der relativen CD40-Expression war in den früheren Stadien stärker als in den späteren. Der steilste Anstieg zeigte sich zwischen Stadium 0 bis 2. Zwischen dem WHO-Stadium, der Intimadicke, der Anzahl der Infiltrate und der prozentualen Expression von CD40 auf MAC und VSMCs liegt eine signifikante Korrelation vor.

Die CD40 Expression auf EC war in allen Stadien darstellbar, konnte jedoch aufgrund der Endothelverletzungen nicht quantifiziert werden. Wir demonstrierten die Koexpression von CD40, ICAM-1, VCAM-1 und MMP-2 auf EC der Neointima der atheromatösen Plaques.

Die CD154 Expression konnte auf T-Lymphozyten in Lymphknoten und fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques gezeigt werden. Die Ergebnisse waren jedoch nicht valide nachvollziehbar. Eine CD154-Expression auf VSMCs, MACs oder ECs stellte sich nicht dar.

CD40 reguliert auf EC, VSMCs und MACs folgende Funktionsbereiche: Adhäsionsmoleküle und damit Leukozyten-Akkumulation und Aktivierung monozytärer Zellen (Hollenbaugh et al. 1995), Matrix Metalloproteinasen (Schönbeck et al. 1997), proinflammatorische Zytokine (Schönbeck et al. 1997) und Funktionen der Gerinnung wie den Tissue Factor (Mach et al. 1997). Vor dem Hintergrund dieser funktionellen Ergebnisse liegt mit unseren Daten ein pathogenetischer Zusammenhang zwischen der Expression von CD40 in der Gefäßwand und der Entstehung, dem Fortschreiten und den Komplikationen der Atherosklerose im Rahmen vaskulärer inflammatorischer Prozesse nahe.

**Literaturverzeichnis:**

- Adams DO, Hamilton TA.** The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol.* 1984;2:283-318.
- Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC and Spriggs MK.** CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *Journal of Experimental Medicine* 1993; 178: 669-674.
- Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P.** Cytokines and growth factors positively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 1232-1230.
- Aqel NM, Ball RY, Waldmann H, Mitchinson MJ.** Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 1984; 53: 265-271.
- Arbustini E, Grasso M, Diegoli M et al.** Coronary atherosclerotic plaques with and without thrombus in ischemic heart syndromes: a morphologic, immune-, histochemical, and biochemical study. *Am J Cardiol.* 1991; Sep3/68:36B-50B.
- Armitage RJ, Fanslow WC, Stockbine L et al.** Molecular and biological characteristics of a murine ligand for CD40. *Nature* 1992; 357:80-2.
- Assmann G, Cullen P, Jossa, F, Lewis B, Mancini M.** Coronary Heart Disease: Reducing the Risk: The Scientific Background to Primary and Secondary Prevention of Coronary Heart Disease. A Worldwide View. American Heart Association 1999; 19:1819-1824.
- Aukrust P, Müller F, Ueland T et al.** Enhanced levels of soluble and membrane bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T-lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 1999;100:614-620.
- Banchereau J, Bazan F, Blanchard D.** The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 1994;12:881-922.
- Becker AE, de Boer OJ, van Der Wal AC.** The role of inflammation and infection in coronary artery disease. *Annu Rev Med* 2001; 52: 289-97.
- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF.** Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 894-897.
- Borrow P, Tishon A, Lee S, Xu J, Grewal IS, Oldstone MB, Flavell RA.** CD40L-deficient mice show deficits in antiviral immunity and have an impaired memory CD8<sup>+</sup> CTL response. *J Exp Med.* 1996 May 1;183(5):2129-42.
- Braun M, Pietsch P, Schroer K, Baumann G, Felix SB.** Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Res.* 1999; 41(2): 395-401.
- Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Doucet CH, Jasmin C and Azzarone B.** Chemokines and CD40-Expression in human fibroblasts. *Eur J Immunol* 2000; 30:914-919.
- Brown MS, Goldstein JL.** Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52:223-61.
- Büchner K, Henn V, Gräfe M, de Boer OJ, Becker A, Kroczeck RA.** CD40 ligand is selectively expressed on CD4<sup>+</sup>T-cells and platelets: implications for CD40-CD40L signalling in atherosclerosis. *J Pathol* 2003;201:288-295.
- Campbell GR, Campbell JH.** The phenotypes of smooth muscle cells expressed in atheroma. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 598:143-158.
- Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G et al.** A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J Exp Med.* 1997 Jun16; 185(12):2053-60.
- Carmeliet P, Collen D.** Tissue factor. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30(6):661-7.
- Cocks BG, de Waal Malefyt R, Galizzi JP, de Vries JE, Aversa G.** IL-13 induces proliferation and differentiation of human

B cells activated by the CD40 ligand. *Int Immunol.* 1993 Jun;5(6):657-63.

**Dansky HM, Charlton SA, Harper MM, Smith JD.** T- and B-lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(9):4642-6.

**Davies MJ.** Anatomic features in victims of sudden coronary death. Coronary artery pathology. *Circulation* 1992; 85 (Suppl 1): 119-24.

**de Boer OJ, van der Wal AC, Becker AE.** Atherosclerosis, inflammation, and infection. *J Pathol.* 2000 Feb;190(3):237-43. Review.

**De Boer OJ, van der Wal AC, Teeling P, Becker AE.** Leukocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization ? *Cardiovasc Res* 1999;41:443-449.

**De Maat MP, Pietersma A, Kofflard M, Sluiter W, Kluft C.** Association of Plasma fibrinogen levels with coronary artery disease, smoking and inflammatory markers. *Atherosclerosis* 1996; 121:185-91.

**Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ.** Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 1996 Dec 1;94(11):2756-67.

**Doerr W.** New and critical thoughts on myocardial infarct. *WienMed Wochenschr.* 1974; 124(37):525-7.

**Dukas J, Pober JS.** IFN- $\gamma$  enhances endothelial activation induced by tumor necrosis factor but not IL-1. *J Immunol* 1990; 145: 1727-1733.

**Dunn T.** Oxygen and cancer. *NC Med J.* 1997 Mar-Apr;58(2):140-3. Review.

**Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD and Noelle RJ.** The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunology Today* 1994, 15(9): 406-410.

**Emeson EE, Robertson AL.** T-lymphocytes in aortic and coronary intimas. Their potential role in atherogenesis. *Am J Pathol* 1988; 130: 369-76.

**Emeson EE, Shen ML, Bell CG, Qureshi A.** Inhibition of atherosclerosis in CD4 T-cell-ablated and nude (nu/nu) C57BL/6 hyperlipidemic mice. *Am J Pathol.* 1996; 149(2):675-85.

**Emeson EE, Shen ML:** Accelerated atherosclerosis in hyperlipidemic C57BL/6 mice treated with cyclosporin A. *Am J Pathol* 1993; 142: 1906-1915.

**Faruqi RM, Di Corleto PE.** Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation. *Br Heart J.* 1993; 69(1Suppl):19-29.

**Fitzpatrick LA.** Gender-related differences in the development of atherosclerosis: studies at the cellular level. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1996; 23: 267-269.

**Foy TM, Laman JD, Ledbetter JA, A-ruffo A, Claassen E, Noelle RJ.** gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J Exp Med* 1994; Jul 1;180:157-163.

**Fries KM, Sempowski GD, Gaspari AA, Blieden T, Looney RJ, Phipps RP.** CD 40 expression by human fibroblasts. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995;77(1):42-51

**Friesel R, Komoriya A, Maciag T.** Inhibition of endothelial cell proliferation by  $\gamma$ -interferon. *J Cell Biol* 1987;104: 689-696.

**Frostegård J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Andersson U, Hansson GK.** Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis.* 1999 Jul;145(1):33-43.

**Fuster V, Badimon L, Badimon JJ and Chesebro J.** The Pathogenesis of Coronary Artery Disease and the acute coronary syndromes (2), *N Engl J Med.*1992; 326 (5): 310-318.

**Fuster V.** Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation.* 1994; 90: 2126-2146.

**Fyfe AI, Qiao JH, Lusis AJ.** Immune deficient mice develop typical atherosclerotic fatty streaks when fed an atherogenic diet. *J Clin Invest.* 1994; 94:2516-2520.

- Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Libby P.** Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Ann NY Acad Sci* 1993; 748: 501-507.
- Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Unemori EN, Amento E, Libby P.** Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res.* 1994; 75: 181-189.
- Galy AH, Spits H.** CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J Immunol.* 1992;149(3): 775-82.
- Garlachs CD, John S, Schmeisser A et al.** Upregulation of CD40 and CD40 ligand in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation* 2001; 104(20):2395-2400.
- Gaspari AA, Sempowski GD, Chess P, Gish J, Phipps RP.** Human epidermal keratinocytes are induced to secrete Interleukin-6 and co-stimulate T-lymphocyte proliferation by a CD40-dependent mechanism. *Eur J Immunol.*1996; 26(6):1371-7.
- Gauchat JF, Henchoz S, Fattah D et al.** CD40 is functionally expressed on human eosinophiles. *Eur J Immunol.*1995; 25(3): 863-5.
- Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G et al.** Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophiles. *Nature* 1993; 365:340-343.
- Gaweco AS, Mitchell BL, Lucas BA, McClatchey KD, Van Thiel DH.** CD40 expression on graft infiltrates and parenchymal CD154 (CD40L) induction in human chronic allograft rejection. *Kidney Int.*1999; 55(49):1542-52.
- Geng YJ, Hansson GK.** Interferon- $\gamma$  inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 1992; 89: 1322-1330.
- Geng YJ, Holm J, Nygren S, Bruzelius M, Stemme S, Hansson G.** Expression of the macrophage scavenger receptor in atheroma: relationship to immune activation and T cell cytokine, interferon- $\gamma$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1995-2002.
- Gerhard GT, Duell PB.** Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1999; 10: 417-429.
- Gerrity RG.** The role of the monocyte in atherogenesis; I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 1981;103: 181-190.
- Glassman AH, Shapiro PA.** Depression and the course of coronary artery disease. *Am J Psychiatry* 1998; 155: 4-11.
- Goldbourt U, Neufeld HN.** Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 6: 357-377.
- Gordon D, Schwartz SM.** Replication of arterial smooth muscle cells in hypertension and arteriosclerosis. *Am J Cardiol* 1987; 59:44A-48A.
- Gordon D.** In: *Leukocyte Typing III.* Mc Michael AJ.(ed) Oxford Press 1987; UK 426-430.
- Gordon DJ, Rifkind BM.** High-density lipoprotein – the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med.* 1989;321: 1311-1316.
- Gown AM, Tsukada T, Ross R.** Human Atherosclerosis II. Immunocytochemical Analysis of the Cellular Composition of Human Atherosclerotic Lesions *Am J Pathol* 1986, 125:191-207.
- Graf D, Korthäuser U, Mages HW, Sennger G, Kroczeck RA.** Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T-cells. *Eur J Immunol* 1992; 22:3191-3194.
- Graf D, Muller S, Korthauer U et al.** A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol* 1995; 25:1749-54.
- Grammer AC, Bergman MC, Miura Y, Fujita K, Davis LS, Lipsky PE.** The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses. *J Immunol.* 1995 May 15;154(10):4996-5010.
- Grant PJ.** The genetics of atherothrombotic disorders: a clinician's view. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1381-90.
- Grewal IS, Flavell RA.** A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4<sup>+</sup> T-

cell responses. *Viewpoint Immunology Today* 1996;17:410-414.

**Grewal IS, Flavell RA.** CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 111-35.

**Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ.** Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein-deficient mice. *Mol Cell* 1998; 2: 275-281.

**Gupta, S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C.** IFN- $\gamma$  potentiates atherosclerosis in apoE knock-out mice. *J Clin Invest*. 1997; 99: 2752-2761.

**Hammar N, Kaprio J, Hagstrom U, Alfredsson L, Koskenvuo M, Hammar T.** Migration and Mortality: a 20 year follow up of Finnish twin pairs with migrant co-twins in Sweden. *J Epidemiol Community Health* 2002; 56(5):362-6.

**Hansson GK, Geng YJ, Holm J, Hardhammer P, Wennmalm A, Jennische E.** Arterial smooth muscle cells express nitric oxide synthase in response to endothelial injury. *J Exp Med* 1994; 180(2):733-8.

**Hansson GK, Holm J, Holm S, Herderich H, Fotev Z, Fingerle J.** T-lymphocytes inhibit the vascular response to injury. *Proc Natl Acad Sci*. 1991; 88: 10530-10534.

**Hansson GK, Holm J.** Interferon- $\gamma$  inhibits arterial stenosis after injury. *Circulation* 1991; 84:1266-1272.

**Hansson GK, Jonasson L, Holm J, Clowes MM, Clowes AW.**  $\gamma$ -Interferon regulates vascular smooth muscle proliferation and Ia antigen expression in vivo and in vitro. *Circ Res* 1988, 63: 712-719.

**Hansson GK, Jonasson L, Lojsted B, Stemme S, Kocher O, Gabbiani G.** Localization of T lymphocytes and macrophages in fibrous and complicated human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 1988; 72: 135-141.

**Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S.** Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1989; 9:567-578.

**Hansson GK, Libby P.** The role of the lymphocyte. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Edited by Fuster FV, Ross R, Topol EJ, Philadelphia, Lippincott-Raven 1996: 557-568.

**Hansson GK.** Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Eng J Med* 2005; 257(5):415-22.

**Harding CV, Unanue ER.** Cellular mechanisms of antigen processing and the function of class I and II major histocompatibility complex molecules. *Cell Regul* 1990; 1: 499-509.

**Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA.** CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391:591-594.

**Henn V, Steinbach S, Büchner K, Presek P, Kroczeck RA.** The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*. 2001 Aug 15;98(4):1047-54.

**Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Chun M, Schönbeck U.** Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation*. 2001 Oct 16;104(16):1899-904.

**Hoffmeister HM, Büttcher E, Ehlers R et al.** Die entzündliche Akute-Phase-Reaktion ist eng mit dem Troponin Status bei Patienten mit instabiler Angina pectoris korreliert. *Z Kardiologie* 2000; 89 (Suppl.5): 16-18.

**Hollander W, Colombo MA, Kirkpatrick B, Paddock J.** Soluble proteins in the human atherosclerotic plaques. With spectral reference to immunoglobulins, C3-complement component, alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin. *Atherosclerosis* 1979; 34: 391-405.

**Hollenbaugh D, Gromaire LS, Kullas CD et al.** The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell-

stimulatory activity. *Embo J* 1992; 11:4313-21.

**Hollenbaugh D, Mischel P, Edwards CP et al.** Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J Exp Med* 1995; 182:33-40.

**Hsu Hage BH, Wahlquist ML.** Cardiovascular risk in adult Melbourne Chinese. *Aust J Public Health* 1993; 17(4):306-13.

**Inwald DP, Peters MJ, Walshe D, Jones A, Davies EG, Klein NJ.** Absence of platelet CD40L identifies patients with X-linked hyper IgM syndrome. *Clin Exp Immunol* 2000; 120:499-502.

**Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK.** Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 131-138.

**Jonasson L, Holm J, Skalli O, Gabbiani G, Hansson GK.** Expression of Class II Transplantation Antigen on Vascular Smooth Muscle Cells in human Atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1985;76: 125-131.

**Kaartinen M, Penttilla A, Kovanen PT.** Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture. *Circulation* 1994; 90(49): 1669-78.

**Kaartinen M, van der Wal AC, van der Loos CM, Piek JJ, Becker AE, Kovanen PT.** Mast cell infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. *J Am Coll Cardiol.* 1998 Sep;32(3):606-12.

**Kannel WB, Anderson K, Wilson PWF.** White blood cell count and cardiovascular disease: insights from the Framingham study. *JAMA* 1992; 267:1253-6.

**Karmann K, Hughes CC, Fanslow WC, Pober JS.** Endothelial cells augment the expression of CD40 ligand on newly activated human CD4+ T cells through a CD2/LFA-3 signaling pathway. *Eur J Immunol.* 1996 Mar;26(3):610-7.

**Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS.** CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion

molecule expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:4342-4346.

**Kato T, Hakamada R, Yamane H, Nariuchi H.** Induction of IL-12 p40 Messenger RNA Expression and IL-12 Production of Macrophages Via CD40-CD40 Ligand Interaction. *J Immunol.* 1996; 156:3932-3938.

**Kiener PA, Moran-Davies P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D.** Stimulation of CD40 with purified gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol* 1995; 155: 4917-4925.

**Klurfeld DM.** Identification of foam cells in human atherosclerotic lesions as macrophages using monoclonal antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109: 445-449.

**Kokkunen H, Penttilla K, Kempainen A et al.** C-reactive Protein, fibrinogen, interleukin-6 and tumor necrosis factor  $\alpha$  in the prognostic classification of unstable angina pectoris. *Ann Med.* 2001; 33:37-47.

**Kotowicz K, Dixon GLJ, Klein NJ, Peters MJ, Callard RE.** Biological function of CD40 on human endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and Interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes. *Immunology* 2000; 100: 441-448.

**Kovanen PT.** Role of mast cells in atherosclerosis. *Chem Immunol.* 1995;62:132-70.

**Kronenberg F, Kronenberg MF, Kiechl S et al.** Role of Lipoprotein(a) and apolipoprotein (a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Brunneck study. *Circulation* 1999;100(11):1154-60.

**Lafont A.** Basic Aspects of Plaque Vulnerability. *Heart* 2003; 89: 1262-1267.

**Laman JD, de Smet BJGL, Schoneveld A, van Meurs M.** CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. *Viewpoint Immunology Today* 1997; 18 (6): 272-7.

**Larsen CP, Alexander DZ, Hollenbaugh D et al.** CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade

of the CD40-gp39 pathway. Transplantation. 1996; 61(1):4-9.

**Lautsch EV, McMillan GC, Duff GL.** Techniques for the study of normal and atherosclerotic arterial intima from its endothelial surface. *Lab Invest* 1953; 2:397-407.

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

**Lee Y, Lee SC, Ahn KJ et al.** CD40L activation in circulating platelets in patients with acute coronary syndrome. *Cardiology* 1999; 92:11-16.

**Libby P, Hansson GK.** Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest.* 1991;64:5-15.

**Libby P, Warner SJC, Salomon RN, Birinyi LK.** Production of platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth-muscle cells from human atheromata. *N Engl J Med* 1988; 318: 1493-1496.

**Libby P.** Changing concepts of atherogenesis. *Journal of Internal Medicine* 2000; 247: 349-358.

**Libby P.** Vascular Biology of Atherosclerosis: Overview and State of the Art. *Am J Cardiol* 2003; 91 (suppl): 3A-6A.

**Lichtman AH, Cubulsky M, Lusinskas FW.** Immunology of atherosclerosis: the promise of mouse models. *Am J Pathol.* 1996; 149(2):351-7.

**Lienenlücke B, Germann Tieno, Kroczeck RA and Markus Hecker.** CD154 stimulation of interleukin-12 synthesis in human endothelial cells. *Eur J Immunol.* 2000; 30: 2864 – 2870.

**Lindmark E, Tenno T, Siegnahm A.** Role of platelet P-Selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(10): 2322-8.

**Luft FC.** Molecular genetics of human hypertension. *J Hypertens.* 1998; 16:1871-78.

**Lusis AJ.** Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233-241.

**Lusis AJ.** Genetic Factors in Cardiovascular Disease: 10 Questions. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13:309-316.

**Lutgens E, Cleutjens KBJM, Heene-mann S, Kotliansky VE, Burkly LC, Daemen MAJP.** Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7464-7469.

**Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJAP, De Muinck ED, Grewal IS, Kotliansky VE, Flavell RA.** Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nature Medicine* 1999; 5(11):1313-1316.

**Lutgens E, Lutgens D, Mat JAP.** CD40-CD40L Interactions in Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12:27-32.

**Lutgens E, van Suylen RJ, Faber BC et al.** Atherosclerotic Plaque Rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 2123-2130.

**Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P.** Activation of monocyte/macrophage function related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin and tissue factor. *Circulation* 1997; 96:396-399.

**Mach F, Schönbeck U, Favummi RP, Bonnefoy JY, Graber P, Libby P.** T-lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation. *Am J Pathol* 1999; 154:229-238.

**Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P.** Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 1998; 394:200-3.

**Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P.** Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells and macrophages: Implications for CD40-CD40 ligand signalling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:1931-1936.

**Mantovani A, Bottazzi B, Sozzani S et al.** Cytokine regulation of monocyte re-



- cruitment. *Arch Immuno Ther Exp (Warsz)*. 1995; 43(2):149-52.
- Mantovani A, Sozzani S, Introna M.** Endothelial activation by cytokines. *Ann NY Acad Sci*. 1997; 15:83293-116.
- Marenberg ME, Risch N, Bergman LF, Floderus B, de Faire U.** Genetic Susceptibility to Death from Coronary Heart Disease in a Study of Twins. *The New England Journal of Medicine* 1994; 330(14): 1041-1046.
- Marmot MG, Syme SL, Kagan A, Kato H, Cohen JB, Belsky J.** Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California introduction. *Am J Epidemiol*. 1975; 102(6):477-80.
- Matsukomoto A, Naito M, Itakura H et al.** Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression and localisation in atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 9133-9137.
- Mehrabian M, Wen PZ, Fisler J, Davis RC, Lusis AJ.** Genetic loci controlling body fat, lipoprotein metabolism, and insulin levels in a multifactorial mouse model. *J Clin Invest*. 1998 Jun 1;101(11):2485-96.
- Melter M, Reinders MEJ, Masayuki S et al.** Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood* 2000; 96:3801-3808.
- Miller DL, Yaron R, Yellin MJ.** CD40L-CD40 interactions regulate endothelial cell surface tissue factor and thrombomodulin expression. *Biol*. 1998; 63: 373-379.
- Munro JM, van der Walt JD, Munro CS, Chalmers JA, Cox EL.** An immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks. *Hum Pathol* 1987; 18: 375-80
- Murray CJ, Lopez AD.** Global mortality, disability and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349(9063):1436-42.
- Nathan L, Chaudhuri G.** Estrogens and atherosclerosis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 1997; 37: 477-151.
- Noelle RJ, Roy M, Shepherd M, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A.** A 39-kDa protein on activated helper T-cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B-cells. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:65500-6554.
- Noelle RJ.** CD40 and its Ligand in Host Defense. *Immunity* 1996; 4: 415-419.
- Novelli G, Borgiani P, Giardina E, Mango R, Romeo F, Mehta JL.** Role of genetics in prevention of coronary atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol* 2003; 18:368-371.
- O'Garra A, Murphy K.** Role of cytokines in development of Th1 and Th2 cells. *Chem Immunol*. 1996; 63:1-13.
- Paulie S, Lundblad ML, Hansson Y, Koho H, Ben-Aissa H, Perlmann P.** A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B-lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 1985; 20:23-28.
- Peng X, Kasran A, Warmerdam PA, de Boer M, Ceuppens JL.** Accessory signaling by CD40 for T-cell activation: induction of Th1 and Th2 cytokines and synergy with Interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol*. 1996; 26(7):1621-7.
- Pober JS, Gimbrone MA, Lapierre LA et al.** Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol*. 1986 Sep 15;137(6):1893-6.
- Prober JS, Gimbrone MA Jr, Lapierre LA et al.** Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 1986, 137: 1893-1896.
- Raines EW, Ross R.** Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy. *J Nutr*. 1995 Mar;125(3 Suppl):624S-630S. Review
- Raines W, Rossell R.** Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy. *Bio Essays* 1996; 18 (4); 271-282.
- Raul RM, Fang JC, Denton MD et al.** CD40 and CD40 Ligand (CD154) are co-expressed on microvessels in vivo in hu-

man cardiac allograft rejection. *Transplantation* 1997; 64(129):1765-74.

**Rekther MD, Gordon D.** Active proliferation of different cell types, including lymphocytes, in human atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1995; 147: 668-677.

**Remskar M, Li H, Chyu KY, Shah PK, Cercek B.** Absence of CD40 signalling is associated with an increase in intimal thickening after arterial injury. *Circ Res.* 2001 Mar 2;88(4):390-4.

**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; 347:1557-1565.

**Rolfe BE, Campbell JH, Smith NJ, Merzon WC, Campbell GR.** T Lymphocytes affect Smooth Muscle Cell Phenotype and Proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 1204-1210.

**Roselaar SE, Schonfeld G, Daugherty A.** Enhanced development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by suppression of cell-mediated immunity. *J Clin Invest* 1995; 96: 1389-1394.

**Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809.

**Salonen JT, Ylä-Herttuala S, Yamamoto R et al.** Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992; 339: 883-887.

**Scaboles MJ, Cannon PJ, Thiene U, Chen R, Michler RE, Yellin MJ.** Analysis of CD154 and CD40 expression in native coronary atherosclerosis and transplant associated coronary artery disease. *Virchows Arch.* 2000; 437(2):149-59.

**Schmitz G, Herr AS, Rothe G.** T-Lymphocytes and monocytes in atherogenesis. *Herz* 1998; 23(3):168-77.

**Schönbeck U, Gerdes N, Varo N, Reynolds RS, Kinlay S, Libby P.** Oxidized Low-Density Lipoprotein augments and 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors limits CD40 and CD40L Expression in Human Vascular Cells. *Circulation* 2002; 106: 2888-2893.

**Schönbeck U, Mach F, Bonnefoy JY, Loppnow H, Flad HD, Libby P.** Ligation of CD40 activates interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme activity in vascular smooth muscle cells and endothelial cells and promote elaboration of active interleukin 1 $\beta$ . *J Biol Chem* 1997; 272:19569-19574.

**Schönbeck U, Mach F, Suckhova GK, Bonnefoy JY, Fabummi RP, Libby P.** Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res* 1997; 81:448-454.

**Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Basset P, Libby P.** Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40-CD40 ligand signalling in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1999;189:843-853.

**Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Graber P, Libby P.** CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 2000;156:7-14.

**Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P.** Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2000; 97: 7458-7463.

**Schriever F, Freedman AS, Freeman G et al.** Isolated human follicular dendritic cells display a unique antigenic phenotype. *J Exp Med.* 1989; 169(6):2043-58.

**Shaw PX, Horkko S, Chang MK, Curtiss LK, Silverman GJ, Witztum JL.** Natural antibodies with T15 idiotype may act in atherosclerosis apoptotic clearance and protective immunity. *J Clin Invest.* 2000; 105: 1731-1740.

**Shimizu KM, Schoenbeck U, Mach F, Libby P, Mitchell RN.** Host CD40 ligand deficiency induces long term allograft survival and donor-specific tolerance in mouse cardiac transplantation but does not prevent graft arteriosclerosis. *J Immunol.* 2000;165(6):3506-18.

**Shimokama T, Haraoka S, Watanabe T.** Immunohistochemical and ultrastructural demonstration of the lymphocyte-

macrophage interaction in human aortic intima. *Mod Pathol* 1991;4:101-107.

**Shu U, Kiniwa M, Wu CY et al.** Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol.* 1995 Apr;25(4):1125-8.

**Singer AJ and Clark RAF.** Cutaneous Wound Healing. *The New England Journal of Medicine.* 1999; 2: 738-746.

**Slupsky JR, Kalbas M, Willuweit A, Henn V, Kroczek RA, Muller-Berghaus G.** Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost.*1998; 80(6):1008-14.

**Smith JA, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M.** Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92: 8264-8268.

**Sprent J.** Antigen-presenting cells: professionals and amateurs. *Curr Biol* 1995; 5: 1095-1097.

**Spriggs MK, Armitage RJ, Stockbine L et al.** Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *J Exp Med.* 1992 Dec 1;176(6):1543-50.

**Stamenkovic I, Clark EA, Seed B.** A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J* 1989;8:1403-1410.

**Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al.** A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis. *American Heart Association. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1512-31.

**Stary HC, Chandler AB, Glagov S et al.** A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesion of atherosclerosis. A report from Committee on Vascular lesions of Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 1994;14:840-856.

**Stary Herbert C.** Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1177-1178.

**Steinberg D, Carew TE, Fielding C et al.** Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation* 1989;80(39): 719-23.

**Steinberg D, Witztum JL.** Molecular Basis of Cardiovascular Disease (ed. Chien KR). Saunders, Philadelphia 1999:458-475

**Stemme S, Fager G†, Hansson GK.** MHC class II antigen expression in human vascular smooth muscle cells is induced by interferon-gamma and modulated by tumour necrosis factor and lymphotoxin. *Immunology* 1990; 69: 243-249.

**Stemme S, Hansson GK.** Immune mechanisms in atherogenesis. *Ann Med.*1994 Jun; 26(39):141-6. Review.

**Stemme S, Holm J, Hansson GK.** T lymphocytes in human atherosclerotic plaques are memory cells expressing CD45RO and the integrin VLA-1. *Arterioscler Thromb.* 1992 Feb;12(2):206-11.

**Stemme S, Rymo L, Hansson GK.** Polyclonal origin of T-lymphocytes in human atherosclerotic plaques. *Lab Invest.*1991; 65(6):654-60.

**Stout RD, Suttles J, Xu J, Grewal IS, Flavell RA.** Impaired T-cell mediated macrophage activation in CD40 ligand deficient mice. *J Immunol.* 1996;156(1):8-11.

**Stout RD, Suttles J.** The many roles of CD40 in cell mediated inflammatory responses. *Immunol Today.* 1996; 17(10): 487-92.

**Sun H, Subbotin V, Chen C, Aitouche A et al.** Prevention of chronic rejection in mouse aortic allografts by combined treatment with CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand monoclonal antibody. *Transplantation.* 1997 Dec 27;64(12):1838-43.

**Suttles J, Evans M, Miller RW, Poe JC, Stout RD, Wahl LM.** T cell rescue of monocytes from apoptosis: role of the CD40-CD40L interaction and requirement for CD40-mediated induction of protein tyrosin kinase activity. *J Leukoc Biol.*1996; 60(5):651-7.

- Szabols M, Cannon PJ, Thienel U, Chen R, Chess L, Yellin MJ.** Analysis of CD 154 and CD40 expression in native coronary atherosclerosis and transplant associated coronary artery disease. *Virchows Arch* 2000; 437:149-159.
- Tian L, Noelle RJ, Lawrence DA.** Activated T-cells enhance nitric oxide production by murine splenic macrophages through gp39 and LFA-1. *Eur J Immunol* 1995; 25:306-9.
- Tremoli E, Camera M, Toschi V, Colli S,** Tissue factor in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999; 144:273-283.
- Tsakiris DA, Tschopl M, Wolf F, Labs KH, Jager KA, Marbet GA.** Platelets and cytokines in concert with endothelial activation in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11(2):165-73.
- Uckun FM, Gajl-Peczalska K, Myers DE, Jasz W, Haissig S, Ledbetter JA.** Temporal association of CD40 antigen expression with discrete stages of human B-cell ontogeny and the efficacy of anti-CD40 immunotoxins against clonogenic B-lineage acute lymphoblastic leukaemia as well as B-lineage non-Hodgkin's lymphoma cells. *Blood* 1990;76:2449-56.
- Unanue ER, Cerottyini JC.** Antigen presentation. *FASEB J* 1989 ; 3: 22496-2502.
- Uyemura K, Demer LL, Castle SC et al.** Cross-regulatory Roles of Interleukin (IL)-12 and IL-10 in Atherosclerosis. *The American Society for Clinical Investigation*1996; 97(9): 2130-38.
- van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK.** Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerosis plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994;89:36-44.
- van der Wal AC, Das PK, Bentz van de Berg D, van der Loos CM, Becker AE.** Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. Department of Pathology, University of Amsterdam, The Netherlands. *Lab Invest.* 1989 Aug;61(2):166-70.
- van der Wal AC, Piek JJ, de Boer OJ, Koch KT, Teeling P, Becker AE.** Recent activation of the plaque immune response in coronary lesions underlying acute coronary syndromes. *Heart.* 1998 Jul;80(1):14-18.
- van Lenten BJ, Fogelman AM.** Lipopolysaccharide-induced inhibition of scavenger receptor expression in human monocyte-macrophages is mediated through tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Immunol* 1992; 148: 112-116.
- Vedeler CA, Nyland H, Matre R.** In situ characterization of the foam cells in early human atherosclerotic lesions. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1984; 92C: 133-137.
- Virmani R, Kolodgie FD, Allen P, Burke AP, Farb A, Schwartz SM.** Lessons From Sudden Coronary Death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1262-1275.
- Wahl SM.** Transforming growth factor  $\beta$ : the good, the bad and the ugly. *J Exp Med.*1994; 180(5):1587-90.
- Whicher J, Biasucci L, Rifai N.** Inflammation, the acute phase response and atherosclerosis. *Chem Lab Med* 1999; 37:495-503.
- World Health Organisation Technical Report Series.** The classification of atherosclerotic lesions. Report of a study group. *WHO Tech Rep Ser* 1958;143:1-20.
- Wu L, Fan J, Matsumoto S, Watanabe T.** Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signalling in monocyte/ macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Mar 24;269(3):808-15.
- Xu QB, Oberhuber G, Gruschitz M, Wick G.** Immunology of atherosclerosis: cellular composition and major histocompatibility complex class II antigen expression in aortic intima fatty streaks, and atherosclerotic plaques in young and aged human specimens. *Clin Immunopathol* 1990 ; 56: 344-359.
- Yang Y, Su Q, Grewal IS, Schilz R, Flavell RA, Wilson JM.** Transient subver-

sion of CD40 Ligand Function diminishes immune responses to adenovirus vectors in mouse liver and lung tissues. *J Virol* 1996;70:6370-6377.

**Yang Y, Wilson JM.** CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signalling through CD40. *Science* 1996; 273(5283):1862-4.

**Yellin MJ, Brett J, Baum D, Matsu-shima A, Szabolcs M, Stern D, Chess L.** Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals. *Journal of Experimental Medicine* 1995;182:1857-1864.

**Yellin MJ, Sippel K, Inghirami G, Clark EA, Chess L, Lederman S.** CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T-cell surface T cell – B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. *J Immunol.* 1994; 152(2):598-608.

**Yellin MJ, Winikoff S, Fortune SM, Baum D, Lederman S, Chess L.** Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation. *J Leukoc Biol* 1995; 58:209-216.

**Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Butler S, Witztum JL, Steinberg D.** Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest.* 1989; 84(4):1086-95.

**Zhou L, Stordeur P, Thielemans K, Capel P, Goldman M, Pradier O.** CD40 engagement on Endothelial Cells Promotes Tissue Factor dependent Procoagulant Activity. *Thromb Haemost* 1998; 79:1025-8.

## **Verzeichnis der Abbildungen:**

Seite

Abb.1	Interaktionsablauf der Antigenpräsentation	11
Abb 2	Schematische Darstellung der APAAP Technik	31
Abb 3	Schematisches Diagramm der amplifizierten APAAP Technik	32
Abb 4	Streptavidin-Biotin-Komplex Methode	33
Abb. 5	CD40 Expression im WHO Stadium 1 (exzentrische Intimaverdickung)	46
Abb. 6	CD40 Expression im WHO Stadium 2	48
Abb. 7	CD40 Expression im WHO Stadium 3	53
Abb. 8	CD40 Expression der Adventitia	57
Abb. 9	Kolokalisation von CD40, ICAM-1, VCAM-1 und MMP-2 auf Endothelzellen	60
Abb.10	Verteilung der Gefäßschnitte auf die WHO Stadien	64
Abb.11	Stadienabhängiger Anstieg der Infiltrate, Intimadicke und Makrophagen.	65
Abb.12	Zunahme der stadienabhängigen (WHO) CD40-Expression auf MAC und VSMCs	66
Abb.13	Korrelation der CD40-Expression mit der Intimadicke	67
Abb.14	Korrelation der CD40-Expression mit den Infiltraten	68

## **Verzeichnis der Tabellen:**

Seite:

Tab. 1.	CD40 expremierende Zellen	7
Tab. 2.	CD154 expremierende Zellen	8
Tab. 3.	Risikofaktoren der Atherosklerose	16
Tab. 4.	Gene, die an der Ätiologie der Atherosklerose beteiligt sind	17
Tab. 5.	Endothelfunktionen in der Pathogenese der Atherosklerose	20
Tab. 6.	Effekte von IFN $\gamma$ in der Atherogenese	22
Tab. 7.	Funktionen von Makrophagen in der Pathogenese der Atherosklerose	23
Tab. 8.	Funktionen vaskulärer glatter Muskelzellen in der Pathogenese der Atherosklerose	25
Tab. 9.	Monoklonale (murine) Antikörper	36
Tab. 10.	Vergleich der Stadieneinteilungen der Atherosklerose	43
Tab. 11.	Übersicht der untersuchten Parameter und Ergebnisse WHO-Stadien, Anzahl, Intimadicke, Infiltrate, Mediadicke	44
Tab. 12.	Methoden zum Nachweis von CD154 / CD40 Ligand	63

## **ANHANG:**

Tab. 1.	CD40 regulierte Endothelzellfunktionen in der Pathogenese der Atherosklerose	
Tab. 2.	CD40 regulierte Makrophagenfunktionen in der Pathogenese der Atherosklerose	
Tab. 3.	CD40 regulierte Funktionen von VSMCs in der Pathogenese der Atherosklerose	
Tab. 4.	Zusammenfassung der CD40 regulierten Mediatoren in der Pathogenese der Atherosklerose	

## Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Veröffentlichungen:

### **“Immunological and Inflammatory Mechanisms in Human Atherosclerosis”**

U.Riggers, J.Holzmeister, D.Bruemmer, P.Stawowy, F.Blaschke, I.De Buhr, B.Wollert-Wulf, V.Regitz-Zagrosek, E. Fleck, K. Graf. Allergo Journal 2000; 9:421-9.

**„Expression of CD40 in vascular smooth muscle cells and macrophages is associated with early development of human atherosclerotic lesions.“** D.Bruemmer, U.Riggers, J.Holzmeister, M.Grill, F.Lippeck, U.Settmacher, V.Regitz-Zagrosek, E.Fleck, K.Graf  
American Journal of Cardiology 2001, Jan1;87(1) :21-7.

**“Funktion des CD40 / CD40Ligand Systems in atherosklerotischen Läsionen. Bedeutung für die Expression von Interleukin 8, MCP-1, VCAM-1“** J. Holzmeister, U.Riggers, R. Curth, M. Gräfe, V. Regitz-Zagrosek. Zeitschrift für Kardiologie, Suppl. 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz-Kreislaufforschung 1998, abstract 712, S177.

**„Myokardiale Osteopontinexpression ist erhöht bei Patienten mit DKMP und linksventrikulärer Hypertrophie“** P. Stawowy, M. Grill, U. Riggers, F. Lippeck, B. Wollert, M. Gräfe, K. Graf. Zeitschrift für Kardiologie, 1999, Suppl.1, Bd. 88, S. 62, abstract 439, 65. Jahrestagung.

**„Die CD40 Expression in glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen ist assoziiert mit der frühen Entwicklung und Progression atherosklerotischer Plaques“** D.Brümmer, U.Riggers, J.Holzmeister, F. Lippeck, U. Settmacher, V.Regitz-Zagrosek, K.Graf. Zeitschrift für Kardiologie, Suppl. 5, Bd. 89 (2000), S. 4, Nr. 275.



## **Danksagung:**

Meinen herzlichen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. med. K. Graf und Frau Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die Hilfe bei der Durchführung und Korrektur der Arbeit aussprechen.

Herrn Dr. Lippeck und Frau Dr. Leder danke ich für die Beratung in allen pathologischen Fragestellungen der Färbungen sowie der Auswertung der Präparate und dem Institut für Pathologie, Charite – Universitätsmedizin Berlin für die konkrete Hilfestellung bei der Durchführung und die Überlassung von Lymphknotenpräparaten aus ihrem Archiv. Besonders sei hier Herrn Karl-Heinz Friedrich für die konkrete technische Assistenz gedankt.

Herrn Chefarzt Prof. Dr. med. Neuhaus und Herrn Oberarzt PD Dr. med. Utz Settmacher, die uns die Gefäßproben von Spendern des Leber-Transplantationsprogrammes zur Verfügung gestellt haben, möchte ich für die stets freundliche Zusammenarbeit danken.

Meinem Bruder Knut-Thomas Riggers danke ich sehr herzlich für die kompetente, geduldige Hilfe bei allen Problemen mit dem Computer.

Toni Lorenzen und Daniel Büttner danke ich für die beharrliche mentale und emotionale Unterstützung und das Korrekturlesen, dafür auch ein herzlicher Dank an Friederike Maerklin.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für die verlässliche Unterstützung, die mir meinen gesamten Bildungsweg, wie auch diese Promotion ermöglichte.

## **Erklärung:**

Ich, Urte Riggers, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Zelluläre CD40 Expression in der Pathogenese der Atherosklerose“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass ich sie ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Aalen, den 14.12.10