

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Kanz

**Cartilage Oligomeric Matrix Protein
(COMP, Thrombospondin-5)
in humanen glatten Muskelzellen:
in-vitro Untersuchungen zur Expression
im Vergleich zu Thrombospondin-1**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

STEPHAN ANDREAS PAULOWITSCH

aus
Tübingen

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: PD Dr. R. Riessen

2. Berichterstatter: PD Dr. M. Wehrmann

Meinen Eltern in
großer Dankbarkeit
gewidmet

1. Einleitung	3
1.1. <i>HMG-CoA Reduktase Inhibitoren und ihre Bedeutung in der Atherosklerose</i>	3
1.2. <i>Der Rho-Kinase Signaltransduktionsweg</i>	4
1.3. <i>Die extrazelluläre Matrix</i>	6
1.4. <i>Statine und die extrazelluläre Matrix</i>	9
1.5. <i>Ziel der vorliegenden Arbeit</i>	10
2. Material und Methoden	11
2.1. <i>Zellkultur</i>	11
2.1.1. <i>Zellisolation aus Arterien von Organspendern</i>	11
2.1.3. <i>Kultur und Passagierung von humanen glatten Muskelzellen</i>	11
2.2. <i>Testsubstanzen</i>	12
2.3. <i>Zellzählung</i>	14
2.4. <i>Proliferationsassays</i>	14
2.4.1. <i>MTT – Test</i>	14
2.4.2. <i>BrdU – Test</i>	15
2.4.3. <i>Statistische Auswertung</i>	16
2.5. <i>RNA – Isolierung aus humanen glatten Muskelzellen</i>	16
2.6. <i>Northern – Blot</i>	18
2.6.1. <i>Herstellung der cDNA Sonden</i>	18
2.6.2. <i>Northern – Blot Analyse</i>	19
2.7. <i>PCR</i>	20
2.7.1. <i>Reverse Transkription</i>	20
2.7.2. <i>Lösen der Primer</i>	21
2.7.3. <i>Thrombospondin – PCR</i>	22
2.8. <i>Protein – Isolierung aus humanen glatten Muskelzellen</i>	23
2.9. <i>Western – Blot</i>	23
2.10. <i>Gene Array</i>	24
2.11. <i>Puffer und Lösungen</i>	26
3. Ergebnisse	29
3.1. <i>Wirkung von Lovastatin, GGTI-286, FTI-277 und Y-27632 auf die Zellproliferation und Zellvitalität</i>	29
3.2. <i>Expression von TSP-5/COMP und TSP-1 – RNA in arteriellen Gefäßwandzellen</i>	32
3.3. <i>Western-Blot – Analyse der TSP-5/COMP und TSP-1 Expression</i> ...	35
3.4. <i>Expression von TSP-2 – RNA in arteriellen Gefäßwandzellen</i>	37

3.5. Expression von TSP-3 und TSP-4 – RNA in arteriellen Gefäßwandzellen.....	389
3.6. Auswirkung von Y-27632 auf den Genaktivität in arteriellen Gefäßwandzellen.....	40
3.7. Vergleich der TSP-5/COMP-Expression nach Inkubation mit Y-27632 und Rapamycin.....	45
4. Diskussion	47
4.1. Wirkung von Statinen und des Rho-Kinase Signaltransduktions-weges auf die Proliferation GMZ.....	47
4.2. Thrombospondin-1 und Cartilage Oligomeric Matrix Protein werden unterschiedlich reguliert.....	49
4.3. Thrombospondin-2, -3 und -4 als Bestandteil der EZM glatter Muskelzellen.....	52
4.4. Die Rho-Kinase und ihre Wirkung auf die Genexpression in GMZ	53
4.5. Einfluss von Rapamycin auf die Expression von TSP-5/COMP.....	55
5. Zusammenfassung.....	56
6. Literaturverzeichnis	58
7. Abkürzungsverzeichnis	71
Dank	72
Lebenslauf	73

1. Einleitung

1.1. HMG-CoA Reduktase Inhibitoren und ihre Bedeutung in der Atherosklerose

Die Atherosklerose wird heute als „response-to-injury“ – Prozess verstanden, an dessen Anfang die funktionelle oder mechanische endotheliale Dysfunktion steht¹. Im weiteren Progress kommt es zu einer Akkumulation und Oxidation von LDL-Cholesterin im subendotheliale Raum, welches durch Makrophagen aufgenommen wird. Dieses triggert wiederum die Aktivierung von Monozyten, T-Lymphozyten und Endothelzellen. Zusätzlich wird die Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen (GMZ) stimuliert, die zur Ausbildung einer Neointima beitragen, welche die Grundlage der atherosklerotischen Plaques ist. Dieser Prozess ist durch Zytokinfreisetzung, Aktivierung von Metalloproteinasen und prokoagulatorischen Faktoren begleitet, die zu einer chronischen Entzündung und Plaqueinstabilität führen. Dass die Höhe der Serumkonzentration von LDL-Cholesterin einen wichtigen pathogenetischen Faktor der Atherosklerose darstellt, ist durch epidemiologische Studien belegt². Die Entwicklung der HMG-CoA Reduktase Inhibitoren (Statine) stellt einen Schlüsselschritt in der Behandlung der Hypercholesterinämie und damit der Atherosklerose dar³. Statine hemmen die Konversion von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) in den Cholesterinvorläufer Mevalonat (Abb. 1.1), welches zu einer direkten Reduktion des Serumcholesterinspiegels und insbesondere der LDL-Fraktion führt.

In den letzten Jahren wurden jedoch Hinweise gefunden, dass die nachgewiesenen protektiven Wirkungen von Statinen auf das kardiovaskuläre System nicht allein auf die Lipidsenkung zurückzuführen sein könnten^{4;5}. Eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase beeinflusst eine Reihe weiterer an atherosklerotischen Prozesse beteiligter zellulärer Mechanismen. Diese nicht direkt über die Hemmung der Cholesterin-Biosynthese vermittelten Effekte werden als „pleiotrope“ Effekte der Statine bezeichnet. Statine verbessern die

endotheliale Dysfunktion⁶⁻⁹, erhöhen die Verfügbarkeit von NO^{10;11}, haben antioxidative¹² und antientzündliche¹³⁻¹⁹ Eigenschaften und stabilisieren die atherosklerotischen Plaques^{20;21}.

Die Vermittlung dieser pleiotropen Effekte wird u.a. durch den Einfluss der Statine auf die Aktivität kleiner G-Proteine erklärt.

Während der Cholesterinbiosynthese werden intermediär Isoprenoide gebildet welche als Aktivatoren der G-Proteine dienen. Vor allem Geranylgeranyl-Pyrophosphat nimmt hier eine wichtige Stellung ein (Abb. 1.1).

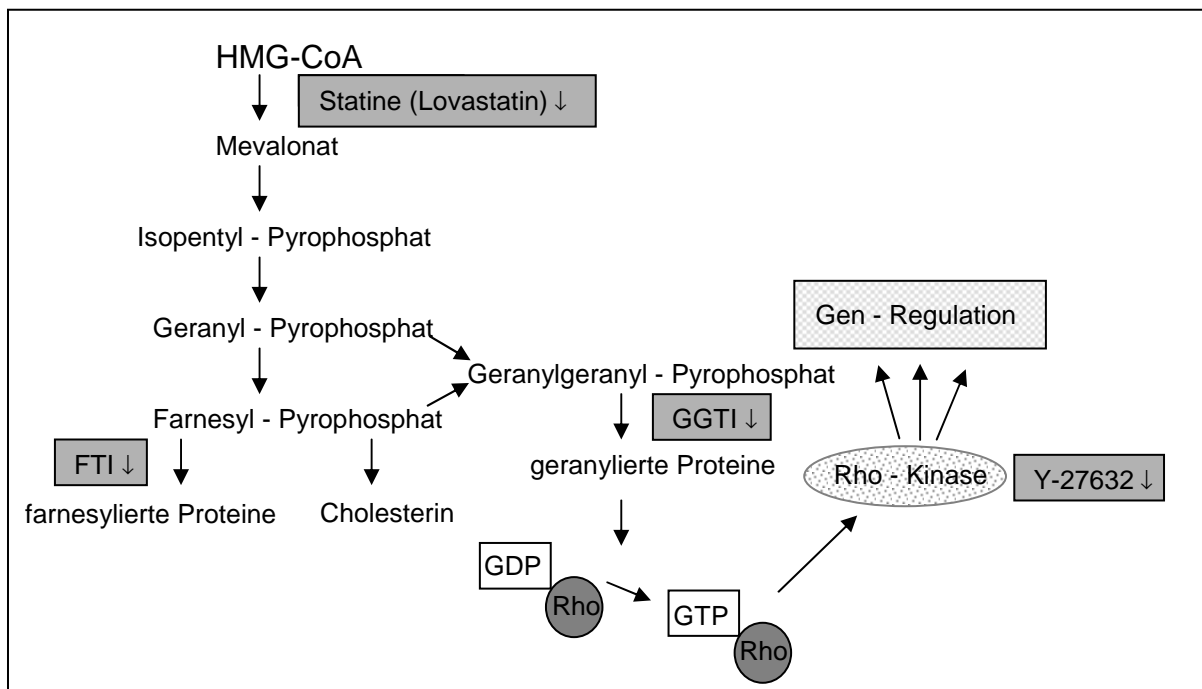


Abb.1.1: Verknüpfung von Isoprenoidstoffwechsel und Rho - Kinase

1.2. Der Rho-Kinase Signaltransduktionsweg

Die Gruppe der kleinen GTP-bindenden Proteine ist in den letzten Jahren in das Interesse der Molekularbiologie und insbesondere der kardiovaskulären Forschung gerückt. Die GTP-bindenden Proteine subsumieren unter anderem die Familien Rho, Ras, Rab, Sarl/Arf und Ran, die unterschiedliche zelluläre Funktionen vermitteln²². 10 Mitglieder der Rho-Familie kommen bei Säugetieren

vor: Rho (RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RhoG), Rac (Rac1, Rac2), Cdc42 und TC10^{23;24}. RhoA, RhoB und RhoC verfügen über eine gemeinsame Aminosäuresequenz in ihrer für die Wirkung effektiven Domäne und scheinen dieselben intrazellulären Ziele zu haben²⁵, daher werden sie im folgenden zusammen als Rho bezeichnet. 1990 wurde eine Serin/Threonin Kinase als Zielenzym von Rho identifiziert und als Rho-Kinase (ROCK)²⁶⁻²⁸ bezeichnet. Im Folgenden wurden noch weitere Zielenzyme von Rho neben der Rho-Kinase identifiziert. Dazu zählen Protein-Kinase N, RhoPhillin, Rhothekin, Citron, p140mDia und die Citron-Kinase^{29;30}.

Die Rho-Kinase spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung verschiedener zellulärer Funktionen in GMZ, die bei der Atherogenese von Bedeutung sind. So beeinflusst die Rho-Kinase neben der Kontraktion glatter Muskelzellen³¹⁻³³ auch die Organisation des aktinischen Zytoskeletts³⁴⁻³⁶, die Zelladhäsion und – motilität³⁷, die Zytokinese³⁸ und die Genexpression^{39;40}, wie beispielsweise von Plasminogen-activator-inhibitor type-1 oder von c-fos-serum-response-element. Zudem ist die Rho-Kinase an endothelialen Kontraktionen beteiligt, welche zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität führen und somit die Atherosklerose verstärken^{41;42}. Aus diesen in-vitro Daten besteht daher die Annahme, dass eine langfristige Hemmung der Rho-Kinase die Entwicklung der Atherosklerose vermindern könnte.

Erste Tiermodelle zeigten, dass durch die spezifische Hemmung der Rho-Kinase mittels in-vivo Gentransfer bzw. Applikation des spezifischen Hemmstoffes Y-27632 eine Neointimabildung inhibiert und sogar eine Rückbildung atherosklerotischer Läsionen erreicht werden kann⁴³⁻⁴⁸. Weiterhin konnte in einer tierexperimentellen Studie an Schweinen durch orale Langzeittherapie mit dem Rho-Kinase-Hemmstoff Hydroxyfasudil ein Rückgang atherosklerotischer Läsionen beobachtet werden⁴⁹. Zudem weisen weitere tierexperimentelle Daten auf eine positive Beeinflussung eines arteriellen Hypertonus^{50;51}, koronarer Spasmen⁵²⁻⁵⁴ und neurologischer Ausfälle im Rahmen eines Schlaganfalls hin⁵⁵.

Aktiviert wird die Rho-Kinase über das G-Protein Rho. Rho selbst kann via Rezeptoren (G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Tyrosin-Kinase Rezeptoren, Cytokinrezeptoren), durch lösliche Faktoren^{56;57} oder aber direkt über Zellhaftung und Integrinclustering⁵⁸⁻⁶⁰ aktiviert werden. Diese Aktivierung erfolgt durch die Bindung von GTP im Austausch gegen GDP, was zu einer Ansammlung von Rho an der inneren Zellmembran führt^{61;62}. Dieser Wechsel von der GDP- in die GTP-gebundene Form von Rho wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Einen Schlüsselschritt scheint dabei Geranylgeraniol, ein intermediäres Stoffwechselprodukt in der Cholesterinbiosynthese, zu spielen, da die posttranslationale Modifikation von Rho durch Geranylgeraniol notwendig erscheint für den Transfer von inaktivem zytosolischem Rho an die Zellmembran, wo es dann in der aktivierten Form vorliegt⁶³. Da Geranylgeraniol und das phosphorylierte Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) aus dem Vorläufer 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) als Intermediärprodukt der Cholesterinbiosynthese entstehen (Abb. 1.1) und ebenso wie Cholesterin durch HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren (Statine) in seiner Synthese gehemmt werden, wird angenommen, dass ein Teil der pleiotropen Statineffekte über die Inhibition von GGPP und damit des Rho-Kinase Signaltransduktionsweges vermittelt sein könnte.

1.3. Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) bildet zusammen mit Endothelzellen (EC) und glatten Muskelzellen (GMZ) die Struktur arterieller Gefäße. Die EZM beeinflusst einerseits die mechanischen und elastischen Eigenschaften der Gefäße, nimmt andererseits aber auch entscheidenden Einfluss auf die Gefäßwandbiologie. Im Wesentlichen am Aufbau der EZM beteiligt sind Kollagene, Elastin, Proteoglykane, Hyaluronan sowie Glykoproteine.

Die Familie der Thrombospondine umfasst eine Gruppe von 5 Glykoproteinen, deren struktureller Aufbau eine Unterscheidung in eine Gruppe größerer

trimerer Thrombospondine (TSP-1, TSP-2) sowie kleinerer pentamerer Thrombospondine (TSP-3, TSP-4, TSP-5/COMP) zulässt. In der EZM arterieller Gefäße konnten bisher TSP-1, TSP-2 und TSP-5/COMP nachgewiesen werden. Die Thrombospondine tragen offenbar nicht direkt zum strukturellen Aufbau der Gefäßwand bei – wie dies z.B. Kollagene tun – sondern beeinflussen Zellfunktionen durch die Vermittlung von Zell-Matrix Interaktionen sowie der Beeinflussung von Wachstumsfaktoren. Sie wurden daher von Bornstein zusammen mit Osteopontin, Osteonektin (SPARC) und Tenascin als „matricellular proteins“ bezeichnet⁶⁴.

TSP-1 ist das bisher am besten untersuchte Thrombospondin. Das ursprünglich in den α -Granula der Thrombozyten nachgewiesene 450-kD-Protein wird auch von GMZ, EC und Makrophagen synthetisiert^{65;66}. Aus Thrombozyten freigesetztes TSP-1 bindet an die Plättchenoberfläche und interagiert dann mit den Integrinen α IIb β 3, α v β 3 sowie mit CD36 und dem Integrin-assoziiertem Protein (IAP). Diese Bindungen führen zu Plättchenaggregation. Weiter funktionelle Untersuchungen beschrieben eine Förderung von Zelladhäsion, -proliferation und -migration glatter Muskelzellen^{66;67} durch TSP-1 sowie eine Modulation der Angiogenese^{68;69} und Aktivierung von Plasminogen und TGF- β 1^{70;71}. Aus Tierexperimenten ist bekannt, dass TSP-1 vor allem in einer sehr frühen Phase nach Gefäßverletzungen synthetisiert wird⁷²⁻⁷⁴. TSP-1 könnte somit einen wichtigen pathogenetischen Faktor im Prozess der Neointimabildung darstellen.

TSP-2 ist in seiner molekularen Struktur TSP-1 sehr ähnlich. Eine Expression von TSP-2 in EC und GMZ konnte nachgewiesen werden⁷⁵, allerdings ist die funktionelle Bedeutung weitestgehend unklar. Versuche mit Knockout-Mäusen weisen auf eine Bedeutung in der Kollagensynthese und Angiogenese hin⁷⁶. Zudem gibt es Hinweise, dass TSP-2 die Interaktion zwischen Zellen und EZM durch Beeinflussung von Rezeptoren, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Proteasen und Strukturproteinen modulieren kann⁷⁷. TSP-2 beeinflusst

möglicherweise die Expression der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2), welche in vulnerablen atherosklerotischen Plaques überexprimiert wird⁷⁸.

2001 wurden in einer groß angelegten Genstudie zur Ursachenforschung von koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt eine Mutation im TSP-2 Gen gefunden, welche mit einem erniedrigten Risiko für die Entstehung einer Myokardinfarktes vergesellschaftet war⁷⁹. In einer Folgestudie konnte dieses Ergebnis bestätigt werden⁸⁰. Hamsten et al. äußern sich aber kritisch zu den Ergebnissen der genetischen Studie und fordern weitere Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von TSP-2⁸¹.

COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein/TSP-5) wurde erstmals aus der Matrix von Knorpel isoliert⁸², was zu seinem Eigennamen geführt hat. Oldberg et al.⁸³ fanden eine niedrige TSP-5/COMP-Expression in aortalem Gewebe der Ratte, 2001 wurde die TSP-5/COMP-Expression in humanen glatten Muskelzellen (GMZ) nachgewiesen⁸⁴. Bei TSP-5/COMP handelt es sich um ein pentameres 524-kD-Glykoprotein, dem die amino-terminale Domäne fehlt, welche die anderen 4 Thrombospondine auszeichnet⁸⁵. Auch in atherosklerotischen und restenotischen Läsionen konnte TSP-5/COMP immunhistologisch nachgewiesen werden und fand sich dort jeweils in unmittelbarer Nachbarschaft zu nicht-proliferierenden GMZ⁸⁶. Serum, TGF- β 1 und TGF- β 3 steigern in-vitro die TSP-5/COMP-Expression in GMZ. Zudem fördert TSP-5/COMP in-vitro die Migration und die Oberflächenhaftung von GMZ⁸⁷. Weitere immunhistologische Studien konnten das Vorkommen von TSP-5/COMP in Mikrokalzifikationen und fibrösen Bereichen zeigen⁸⁸. Über die funktionelle Rolle von TSP-5/COMP in normalen und atherosklerotischen Gefäßen ist allerdings bisher wenig bekannt. 1998 konnten gezeigt werden, dass COMP in der extrazellulären Matrix unter Vermittlung von Zink und Nickel Bindungen mit Kollagen Typ I-III eingeht⁸⁹ und könnte somit Einfluss auf die strukturelle Integrität der extrazellulären Matrix haben.

Über die zwei kleinen Thrombospondine TSP-3 und TSP-4, ebenfalls wie TSP-5/COMP pentamere Glykoproteine, ist ebenso bislang recht wenig bekannt.

TSP-3 wird vor allem in Lungen- und Knorpelgewebe, aber auch im Gehirn exprimiert^{90;91}, seine funktionelle Bedeutung ist noch weitestgehend ungeklärt⁹². Eine Expression von TSP-3 durch humane GMZ ist bislang noch nicht publiziert worden.

TSP-4 wurde in Gewebe vom Herzen, Gehirn, Haut⁹³ und Sehngewebe⁹⁴ nachgewiesen. Eine Expression von TSP-4 durch humane GMZ wurde parallel zu unseren Untersuchungen erstmalig von einer amerikanischen Arbeitsgruppe 2003 nachgewiesen⁹⁵. Weiterhin wurde gezeigt, dass TSP-4 ähnliche Bindungen mit anderen extrazellulären Matrixproteinen wie TSP-5/COMP eingehen kann⁹². TSP-4 bindet ebenfalls an Kollagen (Typ I-III sowie V) und an andere EZM-Moleküle (Laminin, Fibronectin, Matrilin). Zink kann die Bindung von TSP-4 an die Kollagene ebenfalls stimulieren, wie das schon bei TSP-5/COMP gezeigt wurde. Es ist daher möglich, dass TSP-4 und TSP-5/COMP ähnliche Funktionen im extrazellulären Raum erfüllen.

1.4. Statine und die extrazelluläre Matrix

Die Zusammensetzung der EZM beeinflusst wesentlich die Struktur und Vulnerabilität der atherosklerotischen Plaque^{96;97}. Daher sind viele Versuche unternommen worden die Zusammensetzung pharmakologisch zu beeinflussen und damit Atherogenese zu hemmen und die Bildung einer Restenose zu verhindern. Einige Substanzen zeigen in Tiermodellen Erfolge, sind aber noch nicht in der klinischen Anwendung verfügbar⁹⁸⁻¹⁰⁵.

Mit den Statinen steht eine Medikamentengruppe zu Verfügung, die schon seit Jahren auf dem Markt ist und sich im klinischen Alltag zur Behandlung der Dyslipoproteinämie durchgesetzt hat. Da Statine neben der Wirkung auf die Cholesterinbiosynthese noch einige andere pleiotrope Effekte besitzen, die den Ablauf der Atherogenese beeinflussen, ist auch eine Wirkung auf die Zusammensetzung der EZM möglich. Riessen et al. konnten nachweisen, dass Statine die Expression von TSP-1 vermindern können¹⁰⁶. Auch die strukturell bedeutsamen Proteine Kollagen-1 und Biglycan wurden unter hohen

Konzentrationen von Statinen in ihrer Expression vermindert¹⁰⁷. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von TIMP-2 durch Statine gesteigert wird. TIMP-2 kann Matrixmetalloproteinasen inaktivieren, die für die Destabilisierung atherosklerotischer Plaques von Bedeutung sind¹⁰⁸. Statine könnten also auch möglicherweise über Formationsänderung der EZM Einfluss auf Atherogenese und Restenose nehmen.

1.5. Ziel der vorliegenden Arbeit

Die Beobachtung, dass Statine die Expression von TSP-1 beeinflussen, war Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Wir untersuchten zunächst im Rahmen von Dosisfindungstudien, inwieweit Lovastatin sowie andere Hemmstoffe des nachgeschalteten Isoprenoidstoffwechsels und Rho-Kinase Signaltransduktionsweges Einfluss auf die Proliferation glatter Muskelzellen nehmen. Für die Hemmung des Isoprenoidstoffwechsels verwendeten wir Inhibitoren der Geranylgeranyl-Transferase (GGTI-286) und der Farnesyl-Transferase (FTI-277), für die Hemmung der Rho-Kinase den spezifischen Inhibitor Y-27632.

Im zweiten Abschnitt wurde der Effekt dieser Substanzen auf die Expression der Thrombospondine 1-5 getestet. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der vergleichenden Untersuchung der Expression von TSP-1 und TSP-5/COMP.

Für diese Untersuchungen setzten wir PCR, Northern Blots und Western Blots sowie ergänzend Gene Array Analysen ein.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zellisolation aus Arterien von Organspendern

Humane arterielle glatte Muskelzellen (GMZ) wurden aus Gefäßstücken präpariert, die im Rahmen von Organtransplantationen nicht verwendet und freundlicherweise von der Chirurgischen Klinik überlassen wurden. Die Verwendung dieser Gefäßstücke war von der Ethikkommission der Universität Tübingen gebilligt worden.

Die Präparation erfolgte nach einem etabliertem Verfahren¹⁰⁹. Hierbei wurden zunächst von den mittels Präpariernadeln auf einer Präparierschale fixierten Gefäßstücke Fett und überschüssiges Gewebe entfernt und dann das Gefäß der Länge nach aufgespalten, aufgeklappt und nach erneuter Fixierung mittels eines Wattestäbchens die Endothelschicht der Intima abgetragen. Zur Explantation der GMZ wurde die Media schachbrettartig eingeschnitten, woraufhin mit einer Pinzette Teilstücke der Media abgehoben werden konnten und in eine Kulturschale überführt wurden. Nach Antrocknung in der

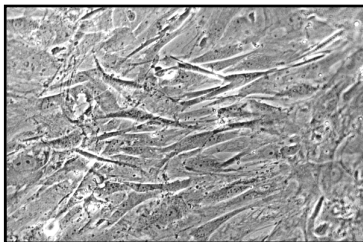


Abb. 2.1: mikroskopische Aufnahme einer Kultur GMZ

Kulturschale wurden die Mediastückchen mit Kulturmedium (s.u.) versorgt und konnten nach 1-3 Wochen Proliferation weiter kultiviert werden. Lichtmikroskopisch konnten die GMZ durch ihre Morphologie und ihr charakteristisches Wachstum in Form von „hill and valley“ identifiziert werden

2.1.3. Kultur und Passagierung von humanen glatten Muskelzellen

Die Kultur der GMZ erfolgte in 200 ml Kulturflaschen unter humanisierten Verhältnissen in einem Brutschrank bei 37°C unter Zusetzung von 5 % CO₂ in

die Atmosphäre. Alle 2-3 Tage wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch 13 ml neues Medium ersetzt.

Das Kulturmedium wurde zusammengestellt aus Waymouth Medium MB 752/1 (GIBCO™) und Nutrient Mixture F-12 (HAM) (GIBCO™) im Verhältnis 1:1 sowie 10 % fötales Kälberserum (FKS) (PAA Lab.), welches zuvor zur Inaktivierung des Komplementsystems für 30 Minuten auf 56°C erwärmt worden war. Um einer bakteriellen Verunreinigung vorzubeugen, erfolgte der Zusatz von 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (GIBCO™).

Die Passagierung erfolgte bei Konfluenz der GMZ. Dazu wurde nach Absaugung des Mediums die Flasche zunächst mit PBS gespült und unter Zusatz von 2 ml Trypsin-EDTA (GIBCO™) bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen lichtmikroskopisch vom Boden der Flasche gelöst hatten. Dann wurde die Zellsuspension in Kulturmedium aufgenommen und auf mehrere Flaschen verteilt ausgesät.

Für die Versuche wurde Zellen der Passagezeit P2 bis P6 verwendet.

2.2. Testsubstanzen

Für die verschiedenen Testreihen wurden unterschiedliche Testsubstanzen verwendet. Alle Substanzen wurden nach Ansetzen einer Stammlösung portioniert und bei -20°C konserviert.

Lovastatin

Lovastatin/Mevinolin (Sigma) gehört zur Gruppe der HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren und wird klinisch zur Senkung erhöhter Cholesterinwerte eingesetzt. Lovastatin liegt als Lactonform vor und wird in der Leber in seine aktive Form überführt. Für in-vitro Experimente muss zunächst diese Lactonform in die aktive Hydroxysäureform überführt werden¹¹⁰.

Dazu wurden 40 mg der Lactonform in 1 ml 100 % Ethanol (Merck) gelöst und 1,5 ml 0,1 M NaOH Lösung (Merck) zugegeben. Nach 2stündiger Inkubation bei 50°C wurde mit 0,1 M HCL Lösung bis zu einem pH von 7,2 titriert. Die entstandene Lösung wurde bis 20 ml mit Ampuwa® (Fresenius) aufgefüllt, so dass eine 5 mM Stammlösung entstand.

Mevalonat

Mevalonat (Sigma) ist das Produkt der HMG-CoA-Reduktase-Reaktion im Isoprenoidstoffwechsel und liegt ebenfalls in einer inaktiven Lactonform vor. Es wurde nach dem gleichen Protokoll wie Lovastatin aktiviert. Die Stammlösung war 10 mM.

GGPP

Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP) (Sigma) ist ein weiteres Zwischenprodukt im Isoprenoidstoffwechsel. Es wurde als 2 mM Lösung erhalten und ohne weitere Behandlung bei den Versuchen verwendet.

FPP

Farnesyl-Pyrophosphat (FPP) (Sigma) ist ebenfalls ein Zwischenprodukt aus dem Isoprenoidstoffwechsel. Auch FPP wurde in applikationsbereiter Lösung in einer Konzentration von 2,3 mM eingesetzt.

GGTI-286

Der Geranylgeranyl-Transferase Inhibitor (GGTI-286) (Calbiochem) inhibiert konzentrationsabhängig die Geranylierung von Proteinen durch die Geranylgeranyl-Transferase. 250 µg der gelieferten Trockensubstanz wurden in 291 µl DMSO gelöst, so dass eine 2 mM Stammlösung entstand.

FTI-277

Der Farnesyl-Transferase Inhibitor (FTI-277) (Calbiochem) inhibiert konzentrationsabhängig die Farnesylierung von Proteinen durch die Farnesyl-

Transferase. 250 µg der gelieferten Trockensubstanz wurden in 279 µl DMSO gelöst so dass eine 2 mM Stammlösung entstand.

Y-27632

Der Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 (Tocris) wurde gelöst indem 10 mg der Trockensubstanz in 1 ml Ampuwa® aufgenommen wurden. Die Stammlösung war 30 mM.

2.3. Zellzählung

Da bei den Proliferationstests eine definierte Zahl an Zellen eingesetzt werden musste, wurden die Zellzahlen in Suspensionen mittels dem Zellzählsystem Casy® (Schärfe System) bestimmt.

Die Ablösung der Zellen erfolgte wie bei der Passagierung mittels Trypsin-EDTA. Nach Aufnahme in Medium wurden 100 µl der Suspension in 9,9 ml Casyton® verdünnt und dem Zellzähler zur automatisierten Analyse zugeführt. Es erfolgten 6 Messungen, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Als vitale Zellen wurden alle Zählergebnisse von Zellgrößen zwischen 6,6 µm und 100 µm gewertet.

2.4. Proliferationsassays

2.4.1. MTT – Test

Der MTT – Test ist ein Verfahren, bei dem über die Messung der mitochondrialen Aktivität ein indirekte Aussage zur Zellzahl getroffen wird¹¹¹. Dabei werden die Zellen mit dem MTT – Reagenz (Sigma), einem gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalz, versetzt. Dieses Salz wird nur in lebenden Zellen proportional zur mitochondrialen Aktivität in das kristalline blau-braune wasserunlösliche Produkt MTT-Formazan umgesetzt. Nach Lyse der Zellen

durch SDS kann der Gehalt des MTT-Formazans photometrisch bestimmt werden.

Versuchsanordnung:

- Nach Bestimmung der Zellzahl (siehe 2.3.) wurden in einer 96-well Mikrotiterplatte 20.000 Zellen pro Zellkammer ausgesät. Als Leerwert dienten Zellkammern, bei denen keine Zellen eingesetzt wurden. Inkubation bei 37°C
- Nach Absetzen der Zellen Zugabe der zu testenden Lösung in verschiedenen Konzentrationen als 6-fach Bestimmung mit einer Inkubationsdauer von 48 Stunden bei 37°C
- 6 h vor Abbruch wurden 25 µl MTT – Reagenz pro Zellkammer zugesetzt
- Zum Abbruch und zur Lysierung der Zellen wurden 100 µl einer 10 % SDS-Lösung zugesetzt
- Nach 24 h Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit wurde der Gehalt an MTT-Formazan mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm ermittelt und der Mittelwert aus den 6 Bestimmungen pro Konzentration gebildet

2.4.2. BrdU – Test

Der BrdU – Test macht eine Aussage über die Proliferation von Zellen. Dabei wird das Pyrimidin-analoge BrdU-Reagenz statt Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut¹¹². Nach Fixierung der Zellen wird ein spezifischer Antikörper gegen das BrdU-Reagenz zugesetzt. Nach Zugabe des Substrates TMB können die entstandenen Immunkomplexe photometrisch bestimmt werden. Es wurde der BrdU – Testkit von der Firma Roche verwendet

Versuchsanordnung:

- Analog dem MTT – Test wurden Zellen ausgesät und für 48 h mit der Testsubstanz inkubiert

- 18 h vor Abbruch der Reaktion wurde BrdU-Reagenz zugegeben, so dass es in einer Endkonzentration von 10 μM vorlag
- Zur Abbruch der Reaktion wurde das Inkubationsmedium abgesaugt und für 45 min bei Raumtemperatur mit der Fixierlösung FixDenat inkubiert
- Nach Absaugung von FixDenat wurde der Peroxidase-gekoppelte BrdU – Antikörper Anti-BrdU-POD für 90 min bei 37⁰C zugegeben
- Dann erfolgte 3maliges Waschen mit Waschpuffer
- Zugabe des Substrates TMB für den Antikörper und Inkubation für 5 – 30 min bei Raumtemperatur bis ein Farbumschlag festzustellen war
- Durch Zugabe von 25 μl H₂SO₄ wurde die Reaktion gestoppt und mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgewertet

2.4.3. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Proliferationsassays wurde für alle Versuche zunächst ein einseitiger ANOVA-Test durchgeführt und bei statistischer Signifikanz ($p < 0,05$) eine Multivergleichsanalyse unter Zuhilfenahme des Tukey-HSD-Testes bzw. des Dunnett´s-post-hoc-Test angeschlossen.

2.5. RNA – Isolierung aus humanen glatten Muskelzellen

Für RNA Analysen wurden glatte Muskelzellen in Kulturflaschen angezüchtet, so dass alle Flaschen vom identischen Ausgangsmaterial abstammten und sich in derselben Passagezeit befanden. Es wurden Passagezeiten P3 – P5 verwendet. Bei einer Konfluenz der Zellen von 70 – 80 % (lichtmikroskopisch) wurden die Versuche durchgeführt.

Nach Absaugen des Mediums erfolgte die Zugabe der in Kulturmedium verdünnten Substanzen. Anschließend Inkubation für 48 Stunden bei 37⁰C. Bei jeder Versuchsanordnung dienten Zellen ohne Substanzzugabe als Kontrolle.

Nach 48 h wurden die Flaschen mit 3 ml PBS⁻ gespült und durch Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA (Gibco™) unter 37⁰C vom Boden der Flasche gelöst. Die

abgelösten Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden dann bei 1200 Umdrehungen/min zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig abgehoben.

Die abzentrifugierten Zellen wurden mit 350 µl RLT-Lysis-Puffer (Qiagen) unter Zusatz von 3,5 µl Mercaptoethanol gelöst und durch 2minütiges Zentrifugieren in einem QIAshredder® (Qiagen) homogenisiert. Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte durch das RNeasy Kit® (Qiagen). Dabei wurde durch Bindung der RNA an eine Zentrifugensäule und anschließende Waschvorgänge die RNA aufgereinigt und am Ende durch DEPC-behandeltes Wasser aus der Säule eluiert.

Vorgehensweise:

- Das Lysat aus dem QIAshredder® wurde mit 350 µl 70 % Ethanol vermischt und auf eine RNeasy-Spin-Column pipettiert. Zentrifugation für 20 sec.
- Der Durchfluss wurde verworfen und 700 µl Waschpuffer RW 1 (Qiagen) auf die Säule pipettiert. Zentrifugation für 20 sec.
- Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl Waschpuffer RPE (Qiagen) auf die Säule gegeben. Zentrifugation für 20 sec.
- Nach Verwerfen des Durchflusses wurden nochmals 500 µl Waschpuffer RPE auf die Säule gegeben und für 5 min zentrifugiert
- Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und die Säule für 1 min ohne Zugabe eines Puffers zentrifugiert um den restlichen Alkohol aus der Säule zu eliminieren
- Die RNA wurde eluiert indem die Säule auf ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt wurde und 40 µl DEPC-H₂O auf die Säule gegeben wurden. Nach Zentrifugation für 1 min enthielt das Eppendorfgefäß die isolierte RNA
- Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70⁰C konserviert

Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch (Gene Quant II, Pharmacia Biotech) bei einem Extinktionswert von 260 nm bestimmt. Darüber

hinaus wurde durch Messung der Ratio eine Proteinverunreinigung ausgeschlossen. Dazu wurde bei 280 nm die Extinktion gemessen und durch das Verhältnis E_{260} / E_{280} die Ratio ermittelt. Ein Wert von $> 1,7$ wurde als Fehlen einer bedeutsamen Verunreinigung gewertet.

2.6. Northern – Blot

2.6.1. Herstellung der cDNA Sonden

Für die unter 2.7. erläuterte Northern Blot Analyse musste zunächst cDNA Sonden für den Hybridisierungsvorgang hergestellt werden. Dazu wurden humanes Thrombospondin-1 (TSP-1; 1,1 kB); humanes Thrombospondin-2 (TSP-2; 3,1 kB); humanes Thrombospondin-3 (TSP-3, 1,3 kB); humanes Cartilage-Oligomeric-Matrix-Protein (COMP; 2,4 kB) sowie GAPDH (1,4 kB) (Clontech) verwendet.

Die verschiedenen cDNA-Plasmide wurden in E.coli-Bakterien vermehrt. Nach Aufreinigung der Plasmide aus der Bakterienkultur mit dem WizardPlus-Midiprep-DNA-Purification-System (Qiagen) und Messung der Plasmid-DNA-Menge konnte das Insert aus dem Plasmid isoliert werden. Dabei wurden 5 µg Plasmid mit Restriktionsenzymen (Eco RI 5-10 U/µg Plasmid, Promega) versetzt und für eine Stunde bei 37⁰C inkubiert.

Anschließend wurde eine Ethanolfällung durchgeführt, um Proteine und Salze zu entfernen. Mit einem 1,5%-Agarose-Gel (mit 0,5 µg Ethidiumbromid/ml) wurde das gereinigte Produkt aufgetrennt, das ausgeschnittene Insert unter UV-Licht aus dem Gel herausgetrennt und mit dem Gel-Extraction-Kit (Qiagen) isoliert. Das Insert wurde in 50 µl autoklaviertem Aqua bidest. gelöst. Nach photometrischer Messung des DNA-Gehalts wurden ungefähr 100 ng zur Markierung mit dem DIG-High-Prime-Kit (Boeringer Mannheim) eingesetzt. Die Effizienz der Markierungsreaktion wurde durch einen Dot-Blot im Vergleich zu einer bereits fertig markierten Referenz-DNA (Boeringer Mannheim) geprüft.

2.6.2. Northern – Blot Analyse

Zur Analyse der mRNA wurden Northern – Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurde in ein 14 x 11 cm Gelkammer (Gibco) ein 0,8% Agarose-Gel (1g Agarose, Gibco + 80 ml Aqua bidest.) mit einem Anteil von 7 ml 37% Formaldehyd und 10 ml 10-fach MOPS gegossen. Nach Aushärtung des Gels wurden 4 – 10 µg RNA , vermischt mit 4 µl 5x-Probenpuffer, eingefüllt und die RNA unter 1-fach MOPS als Laufpuffer für 3 h bei 90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde stets ein Größenmarker (RNA-Längenstandards II, Roche) mitgeführt. Danach wurde das Gel für 30 min in Aqua bidest. gewässert und anschließend die RNA über Nacht auf eine Nylonmembran (Hybond-n⁺, Amersham) mit Hilfe eines Kapillarblots unter Zusatz von 20-fach SSC übertragen. Die RNA auf der Membran wurde durch Erwärmen auf 120°C für 30 min fixiert und die Membran zur Hybridisierung zunächst für 1 h unter ständigem Rollen in Prähybridisierungslösung bei 65°C vorinkubiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht. Dazu wurde die entsprechende cDNA (s. 2.6.1) für 10 min in Prähybridisierungslösung aufgeköcht und insgesamt 10 ml Lösung + cDNA auf die Membran gegeben. Nach der Hybridisierung wurde die Membran 3x mit Waschpuffer für 20 min bei 65°C und 5 min bei RT mit Puffer 1 gewaschen. Die Reaktion wurde dann mit 50 ml 10% Blockreagenz (verdünnt in Puffer 1) abgeblockt (1,5 h RT) und anschließend Alkalische Phosphatase 1:6000 verdünnt in 10% Blockreagenz für 30 min bei RT zugegeben. Anschließendes Waschen (3x 15 min) in Puffer 1 und 1 x 5 min in Puffer 3. Zur Entwicklung wurde die Membran mit CSPD (Roche) (1:100 in Puffer 3 verdünnt) in eine durchsichtige Plastiktüte gepackt und 10 min bei 37°C inkubiert. Um die Chemilumineszenzreaktion zu detektieren, wurden anschließend Röntgenfilme (Hyperfilm, Amersham) aufgelegt und diese nach 5, 10, 30 und 60 min entwickelt.

2.7. PCR

2.7.1. Reverse Transkription

Um aus der aus den Zellkulturen isolierten RNA eine PCR zu ihrer semiquantitativen Bestimmung durchführen zu können, musste zunächst die RNA in eine reverse cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte durch das Omniscript RT Kit (Qiagen).

Oligo dT Primer lagern sich bei 37⁰C an die einzelsträngige mRNA an. Diese Anlagerung ermöglicht einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) eine rückläufige Kopie dieser RNA zu synthetisieren (cDNA). Zum Schluss wird die mRNA durch die RNase-Aktivität der reversen Transkriptase degradiert (RNase H).

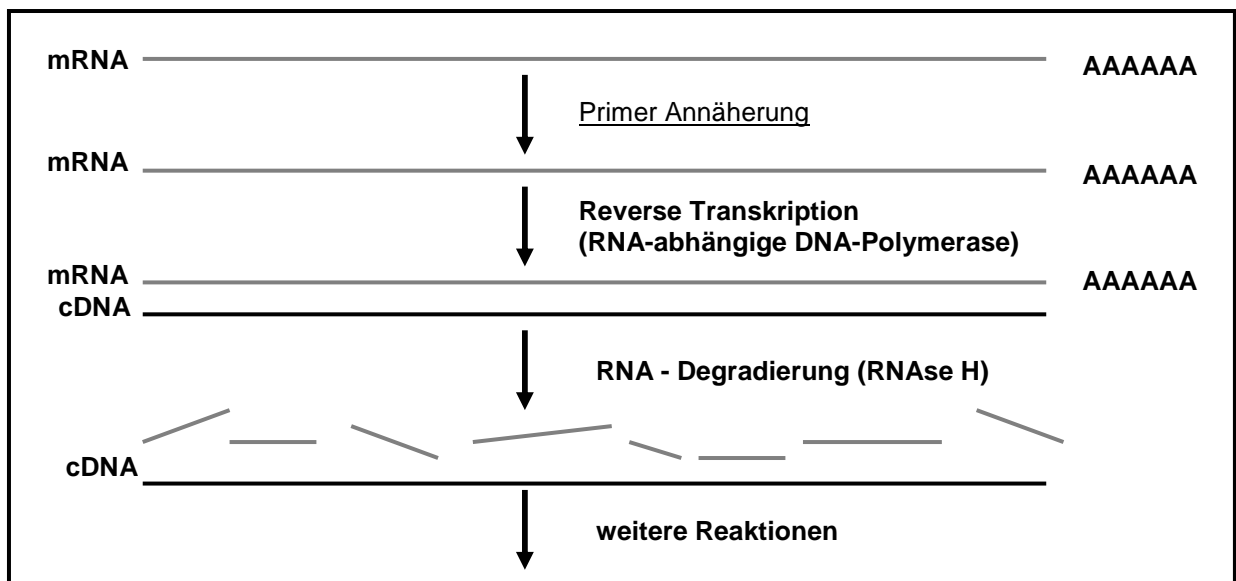


Abb. 2.2: Prinzip der reversen Transkription (modifiziert nach Qiagen)

Vorgehensweise:

- Zunächst wurden alle Lösungen aufgetaut und anschließend auf Eis gestellt
- Aus den Ergebnissen der Gene Quant-Analyse (siehe 2.5.) wurde das für die Umschreibung von 2 µg RNA benötigte Probenvolumen errechnet

- In den Reaktionsansatz wurden nacheinander pipettiert: 2,0 µl 10x Buffer RT (Qiagen); 2,0 µl dNTP Mix (Qiagen); 2,0 µl 10 µM Oligo-dT Primer SP 230 (Qiagen); 1 µl RNase Inhibitor 10 U/µl (Pharmacia Biotech); 1 µl Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen)
- Hinzugefügt wurde dann die variable Menge an RNA für 2 µg RNA
- Schließlich wurde der Reaktionsansatz durch RNase-free water (Qiagen) auf ein Probenendvolumen von 20 µl aufgefüllt
- Inkubation bei 37°C für 1 h in einem Wasserbad
- Konservierung bei -20°C

2.7.2. Lösen der Primer

Für die PCR werden stets ein forward sowie ein reverse Primer benötigt. Folgende Basenfolgen¹¹³ wurden kommerziell geordert (Invitrogen):

1) *Thrombospondin-1 (TSP-1)*

Primer 1: 5'-GCC TGA TGA CAA GTT CCA AGA-3'

Primer 2: 5'-CTT TGC GAT GCG GAG TCT-3'

2) *Thrombospondin-2 (TSP-2)*

Primer 1: 5'-GCA ACA TCA ACC GCA AGA C-3'

Primer 2: 5'-AAG CAA ACC CCT GAA GTG ACT-3'

3) *Thrombospondin-3 (TSP-3)*

Primer 1: 5'-TGG ACA GAA GGC GTA TTT GAG-3'

Primer 2: 5'-AAC AGG GGT CAG CGT GAG-3'

4) *Thrombospondin-4 (TSP-4)*

Primer 1: 5'-GGA AGG CGG CAC AGG AT-3'

Primer 2: 5'-ACA TTG GAC ACC TCG GAA ACA-3'

5) *Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)*

Primer 1: 5'-TGG GCC CGC AGA TGC TTC-3'

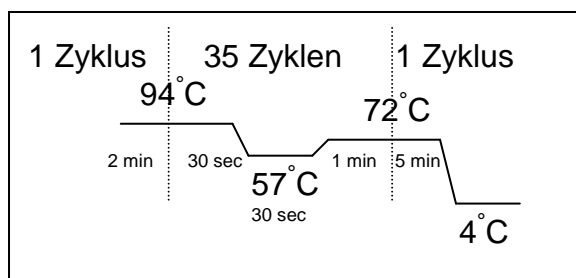
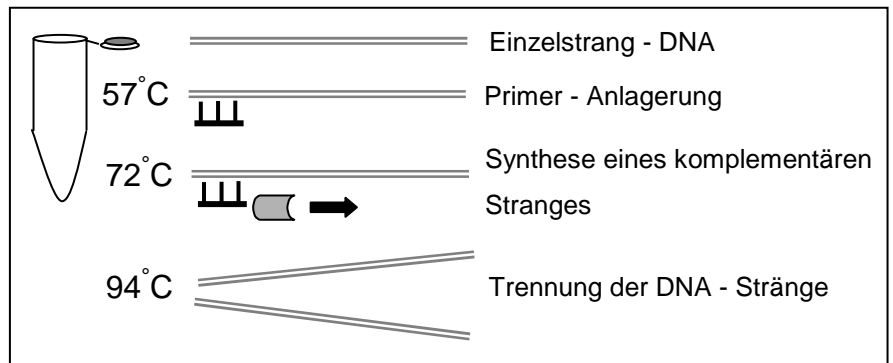
Primer 2: 5'-GCC CGG TCT CAC ACT CGT TGA-3'

Die Primer wurden in DEPC-H₂O gelöst, so dass sie in einer Konzentration von 200 µM vorlagen. Anschließend erfolgte eine weitere Verdünnung mit DEPC-

H₂O. Die Konzentration wurde auf 10 µM eingestellt und die Primer bei -20°C konserviert.

2.7.3. Thrombospondin – PCR

Zur PCR – Analyse der Thrombospondine wurden je 2 µl cDNA (2.7.1.) mit 25 µl MasterMix (Promega) sowie je 1 µM forward als auch reverse



primer eingesetzt. Das Volumen wurde durch Zugabe von RNase-freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die PCR – Reaktion erfolgte durch das GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) nach

nebenstehendem Protokoll. Die Annäherungstemperatur für die Primer wurde dabei auf 55°C bzw. 57°C eingestellt.

Die PCR – Produkte wurden dann in einem 1% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden 60 ml 1-fach TBE mit 0,6 g Agarose (Gibco) aufgekocht und mit 3 µl Ethidiumbromid (Bio-Rad) versetzt. Das Gel wurde in einer Gelkammer (Gibco) gegossen und ausgehärtet. 1 – 5 µl der PCR – Produkte wurden mit 2 µl Probenpuffer versetzt und in das Gel eingefüllt. Als Kontrolle wurde ein Größenmarker (DNA-Längenstandard XIV, Roche) mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90 V über 2 h. Das Gel wurde dann auf eine UV-Lampe (TFX-20M, Gibco) transferiert und die PCR – Produkte illuminetrisch dargestellt. Das Gel wurde fotografisch festgehalten (Kodak).

2.8. Protein – Isolierung aus humanen glatten Muskelzellen

GMZ wurden in Petrischalen (Falcon) ausgesät und mit den Testsubstanzen für 48 h inkubiert. Nach Abheben des Überstandes wurden die Schalen 2x mit PBS gespült und auf jede Schale 300 µl TE-Puffer (Roche) gegeben. Die Zellen wurden dann mittels eines Schabers abgelöst, in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen gesammelt und für 10 min bei 4°C und 6000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und 200 µl Lysepuffer zugegeben. Nach 10 min. Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert und die nun im Überstand befindlichen Proteine bei -70°C konserviert.

2.9. Western – Blot

Um Veränderungen der Proteine Thrombospondin-1 und Thrombospondin-5 nach 48-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen erkennen zu können, wurden Western Blot Analysen mit isolierten Proteinen (2.8.) durchgeführt.

Zunächst wurden ein 6% Acrylamid-Laufgel gegossen. Dazu wurden 5,4 ml Aqua bidest. mit 2,5 ml 0,75 M TRIS/HCl – Lösung pH 8,8, 25 µl 20% SDS, 2,0 ml Acrylamid (Roth), 5 µl TEMED (Gibco) und 50 µl Ammoniumpersulfat vermischt und in eine Laufkammer gegossen. Nach 1 h Härtung wurde darüber ein Sammelgel bestehend aus 1,5 ml Aqua bidest., 625 µl 0,625 M TRIS/HCl – Lösung pH 6,8, 650 µl Acrylamid, 2,5 µl TEMED und 12,5 µl Ammoniumpersulfat gegossen und ein Kamm für die Proteinproben aufgesetzt. Für die Analyse des Zellüberstandes wurden 15 µl Probe mit 7,4 µl Probenpuffer+Mercaptoethanol für 10 min aufgekocht um die Proben zu reduzieren. Die reduzierten Proben wurden dann mittels einer Hamilton-Pipette in das Gel eingefüllt und in 1-fach Laufpuffer für ca. 1 h mit 60 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Proteine wurden dann mittels einer Elektroblokkammer (Keutz) auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond-c, Amersham) unter Zusatz von 1-fach Blotpuffer für 1 h bei 22 W übertragen und anschließend die Membran über Nacht in 5% Blockpuffer gelegt.

Die Membran wurde mit PBS-Tween gespült und für 5 min darin eingelegt. Anschließend wurde der Erstantikörper in 5% Blockpuffer verdünnt und die Membran darin 1 h inkubiert. Nach 3maligem Spülen mit PBS-Tween für je 10 min wurde dann der Zweitantikörper ebenfalls verdünnt in Blockpuffer für eine Stunde zugegeben. Danach wurde nach 3maligem Spülen mit PBS-Tween für je 10 min zur Filmentwicklung mittels Luminiszenz ECL-Detergenz (Amersham) auf die Membran gegeben, diese in einen durchsichtige Plastiktüte gelegt und anschließend sofort Filme (Hyperfilm, Amersham) aufgelegt und entwickelt.

2.10. Gene Array

Um weitere Einflüsse des spezifischen Rho-Kinase Inhibitors Y-27632 auf humane GMZ aufzuklären wurden 2 Versuchsreihen mit Gene Array Analysen durchgeführt. Dazu wurden in einem ersten Versuchsansatz subkonfluente proliferierende GMZ (10% FKS) kontinuierlich über 48 h mit Y-27632 (30 μ M) inkubiert und anschließend die RNA isoliert (s. 2.5). In einer weiteren Versuchsanordnung wurden ebenfalls subkonfluente GMZ zunächst für 24 h durch serumfreies Medium (Waymouth Medium + Nutrient Mixture F-12 im Verhältnis 1:1, 10 μ g/ml Thyroglobulin, 10 μ g/ml Transferrin, 5 μ g/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin sowie 100 μ g/ml Streptomycin) in ihrem Wachstum arretiert. Nach Präinkubation mit 30 μ M Y-27632 für 6 h erfolgte eine maximale Wachstumsstimulation mit EC-Medium (enthält IGF und FGF als Wachstumsfaktoren) in Anwesenheit von Y-27632 (30 μ M) für 6 h. Anschließend erfolgte ebenfalls die RNA-Isolierung. In beiden Versuchsanordnungen wurden in gleicher Weise Kontrollen ohne den Zusatz von Y-27632 gewonnen.

Die Microarray Gene Chip Analyse wurde in Kooperation mit dem Institut der medizinischen Genetik Tübingen (IZKF Microarray Facility Tübingen) durchgeführt. Dabei wurden für jede Versuchsanordnung sowie Kontrolle je 3 Gene Chips (Fa. Affymetrix) verwendet, um eine statistische Auswertung vornehmen zu können.

Die Microarray-Technologie ist ein relativ junges Verfahren, welches eine parallele Analyse tausender Gene in einer Probe ermöglicht. Als Probe eignen sich neben DNA- und cDNA- auch RNA-Proben. Diese werden in einem ersten Arbeitsschritt mit einem Reagenz (in diesem Fall Biotin) verknüpft, das die spätere computergesteuerte Analyse erlaubt. Die RNA wird dann auf eine Glasplatte gegeben, auf welcher ihrerseits Oligonukleotide gebunden sind, an welche sich die komplementäre RNA anlagert. Auf den Glasplatten der Firma Affymetrix sind 25 000 Sequenzen auf einer Fläche von 2,5 cm x 7,5 cm gebunden. Die computergesteuerte Analyse erfolgt durch die Technik der Photolithographie¹¹⁴. Die erhobenen Daten zeigten alle Gene auf, bei denen ein Zunahme oder eine Abnahme der Expression beobachtet werden konnte.

Als statistisch signifikant verändert wurden nur die Gene gewertet, die in allen 9 Vergleichen (3 x 3 Proben vs. 3 x 3 Kontrollen) eine gleichsinnige Veränderung der Aktivität aufzeigten und deren Signal-Log-Ratio (SLR) $> 0,5$ bzw. $< 0,5$ betrug.

2.11. Puffer und Lösungen

PBS

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

10-fach Mops

20,9 g MOPS (Applichem) wurden in Aqua bidest. gelöst und mit NaOH ein pH von 7,0 eingestellt. Zugabe von 8,4 ml 3 M Na-Acetat sowie 10 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (Gibco). Auffüllen auf 500 ml mit Aqua bidest., anschließend Autoklavierung.

20-fach SSC

87,65 g NaCl und 44,1 g Na-Citrat wurden in 500 ml Aqua bidest. gelöst, anschließend Autoklavierung.

Prähybridisierungslösung

17,75 g Na_2HPO_4 , 1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, 100 g SDS (Applichem) wurden in Aqua bidest. durch Erhitzen auf 65°C gelöst. Nach Zugabe von 25 ml 10% Blockreagenz wurde ein pH von 7,2 durch Titration mit Essigsäure eingestellt. Auffüllen auf 500 ml mit Aqua bidest., anschließend Autoklavierung.

Waschpuffer

1,42 g Na_2HPO_4 , 1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 und 5 g SDS wurden in 500 ml Aqua bidest. und Erhitzen auf 65°C gelöst, anschließend Autoklavierung.

Blockreagenz

10 g Blocking Reagent (Roche) wurden in 100 ml Puffer 1 und durch Erhitzen auf 65°C gelöst, anschließend Autoklavierung.

Puffer 1

5,81 g Maleinsäure (Applichem) sowie 4,38 g NaCl (Merck) wurden in Aqua bidest. gelöst, der pH durch Zugabe von NaOH auf 7,5 eingestellt. Auffüllen auf 500 ml durch Aqua bidest., anschließend Autoklavierung.

Puffer 3

6,06 g Tris-HCL und 2,92 g NaCl wurden in 500 ml Aqua bidest. gelöst und der pH durch NaOH auf 9,5 eingestellt, anschließend Autoklavierung.

Lysepuffer-Stammlösung

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

Lysepuffer

Zu 3 ml Lysepuffer-Stammlösung wurden 30 µl PMSF und 3 µl Leupeptin gegeben.

PBS-Tween

2 Tabletten PBS werden in 1 l Aqua bidest. gelöst und mit 0,4 ml Tween (Sigma) vermengt.

0,625 M TRIS/HCl – Lösung, pH 6,8

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

0,75 M TRIS/HCl – Lösung, pH 8,8

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

10-fach Laufpuffer

39 g TRIS wurden mit 144 g Glycin und 10 g SDS in 1000 ml Aqua bidest. gelöst.

1-fach Laufpuffer

50 ml Laufpuffer wurden in 350 ml Aqua bidest. verdünnt.

10-fach Blotpuffer

24,2 TRIS wurden mit 112,6 g Glycin zusammen in 1000 ml Aqua bidest. aufgelöst.

1-fach Blotpuffer

100 ml Blotpuffer wurden mit 100 ml Methanol (Merck) und 800 ml Aqua bidest. vermengt.

5% Blockpuffer

10 mg Milchpulver wurden in 200 ml PBS-Tween gelöst.

1-fach TBE

100 ml 10-fach TBE (Applichem) wurden in 900 ml Aqua bidest. verdünnt.

3. Ergebnisse

3.1. Wirkung von Lovastatin, GGTI-286, FTI-277 und Y-27632 auf die Zellproliferation und Zellvitalität

Die kontinuierliche Inkubation humaner GMZ über 48 Stunden mit Lovastatin hemmte im BrdU – Test konzentrationsabhängig die Zellproliferation (Abb. 3.1). Im MTT Test zeigte sich nach 48-stündiger Inkubation ebenfalls eine geringere Zellzahl als in Medium-Kontrolle. Die Verminderung der Zellzahl im MTT – Test war unter Lovastatin in vergleichbaren Konzentrationen schwächer ausgeprägt als die Hemmung der Zellproliferation. Die Wirkung von Lovastatin konnte in beiden Tests durch die Zugabe von Mevalonat und GGPP zur höchsten Lovastatin-Konzentration (10 μ M) zumindest teilweise aufgehoben werden. Die Zugabe von FPP führte ebenfalls zu einer Reduzierung des Lovastatin-Effekts, war jedoch im BrdU – Test nur gering ausgeprägt (34% Zellproliferation im Vergleich zu 19% Zellproliferation bei Lovastatin 10 μ M gegenüber der Medium-Kontrolle).

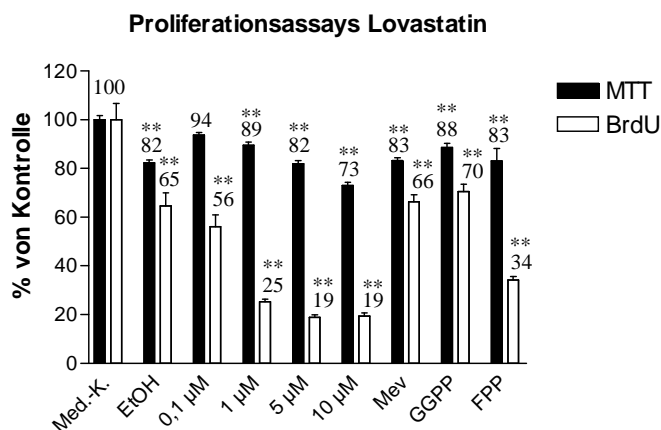


Abb. 3.1: Lovastatin hemmt die Zunahme der Zellzahl und die Zellproliferation in zunehmenden Konzentrationen bis auf 73% im MTT-Test bzw. 19 % im BrdU-Test bei 10 μ M gegenüber Kontrollen. Die Zugabe von Mevalonat (250 μ M), GGPP (10 μ M) und FPP (10 μ M) zu 10 μ M Lovastatin hebt diesen Effekt teilweise auf. **p < 0,01

Auch GGTI-286 und der spezifische Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 bewirkten eine kontinuierliche Abnahme der Zellproliferation im BrdU – Test nach 48 Stunden. MTT – Tests zeigten auch hier eine konzentrationsabhängige Verminderung der Zellzahl nach dem gleichen Inkubationszeitraum (Abb. 3.2 und 3.3). Die Proliferationshemmung der GMZ war, analog den Ergebnissen der Lovastatin-Untersuchungen, prozentual stärker ausgeprägt als die Verminderung der absoluten Zellzahl, gemessen anhand des MTT – Tests.

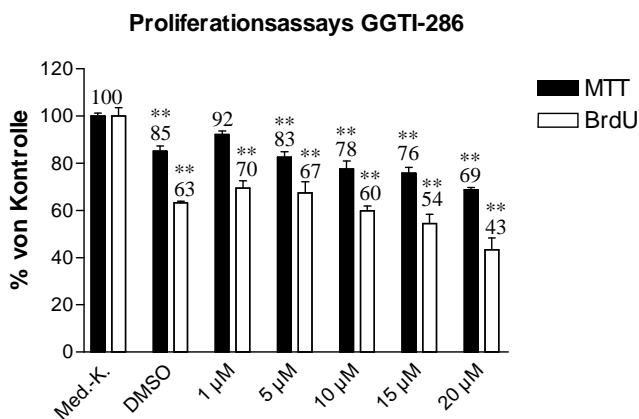


Abb. 3.2: GGTI-286 hemmt sowohl die Zunahme der Zellzahl als auch die Zellproliferation konzentrationsabhängig. Bei 20 µM GGTI-286 sinken die Werte auf 69% (MTT) bzw. 43% (BrdU) gegenüber Kontrollen. **p < 0,01

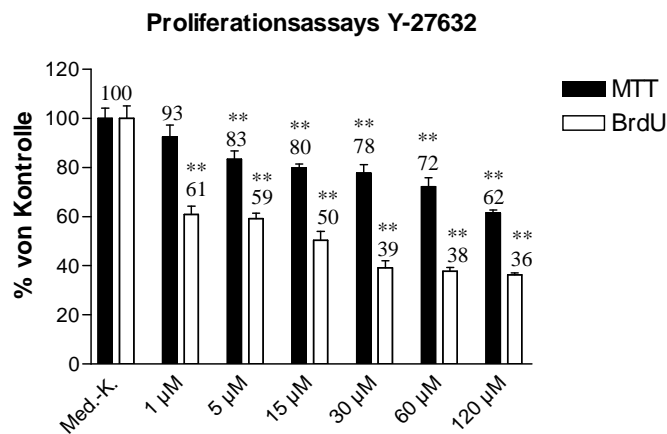


Abb. 3.3: Y-27632 hemmt sowohl die Zunahme der Zellzahl als auch die Zellproliferation konzentrationsabhängig. Bei 120 µM sinkt die Zellzahl (MTT) auf 62%, die Proliferation (BrdU) auf 36% gegenüber Kontrollen. **p < 0,01

Eine 48-Std.-Inkubation humaner GMZ mit FTI-277 beeinflusste die Zellproliferation (BrdU) und Zellzahl (MTT) arterieller GMZ nur unwesentlich und ohne eindeutig statistische Signifikanz (Abb. 3.4). Lediglich in höheren Dosierungen (200 nM, 400 nM) kam es zu einer leichten Verminderung der Zellproliferation (bis auf 90% gegenüber der Medium-Kontrolle). Eine Abnahme der absoluten Zellzahl über den MTT – Test konnte in diesen Dosierungen aber nicht nachgewiesen werden. Eine deutliche Hemmung der Proliferation hätte aber auch hier einen Effekt zeigen müssen.

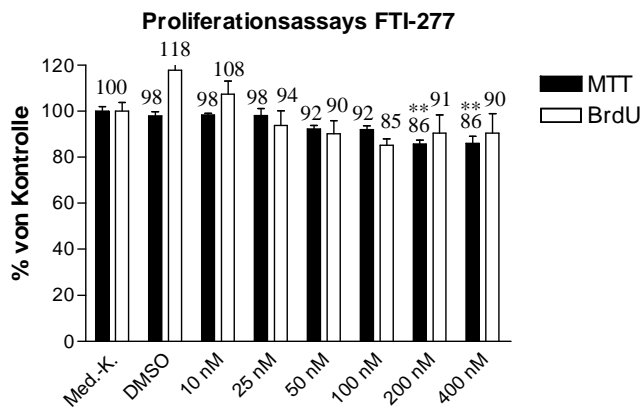


Abb. 3.4: Sowohl die Zellzahl (MTT) als auch die Zellproliferation (BrdU) werden durch FTI-277 nur gering vermindert. **p < 0,01 gegenüber Kontrollen.

3.2. Expression von TSP-5/COMP und TSP-1 – RNA in arteriellen Gefäßwandzellen

TSP-5/COMP und TSP-1 werden von proliferierenden humanen GMZ exprimiert. In den PCR-Analysen zeigten die beiden Glykoproteine auf die Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren des Isoprenoidstoffwechsels über 48 Std. ein unterschiedliches Expressionsverhalten. TSP-5/COMP wurde durch die Inkubation mit Lovastatin in seiner Expression gesteigert. TSP-1 hingegen wurde durch Lovastatin in seiner Expression gehemmt (Abb. 3.5a und 3.5b). Die Wirkung von Lovastatin konnte bei beiden Thrombospondin-Varianten durch Mevalonat und GGPP aufgehoben werden. FFP zeigte ebenfalls eine antagonistische Wirkung. GGTI-286 (1 μM , 10 μM) führte zu einer Minderung der TSP-1-Expression. TSP-5/COMP hingegen wurde durch die Inkubation mit GGTI-286 in seiner Expression gesteigert (Abb. 3.5c).

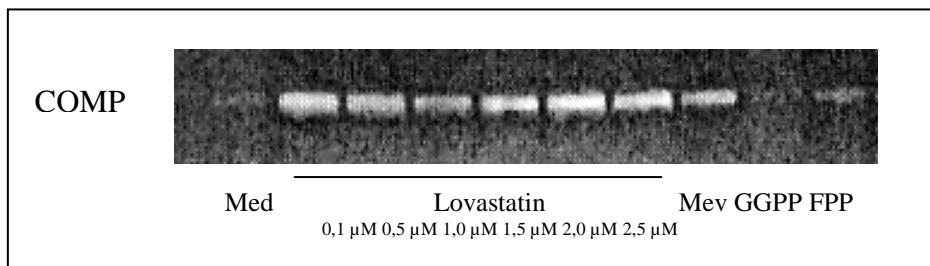


Abb. 3.5a: PCR – Analyse der TSP-5/COMP Expression nach Zugabe von Lovastatin (in μM) sowie Mevalonat (250 μM) und GGPP sowie FPP (je 10 μM) zur höchsten Lovastatin-Konzentration (2,5 μM). Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

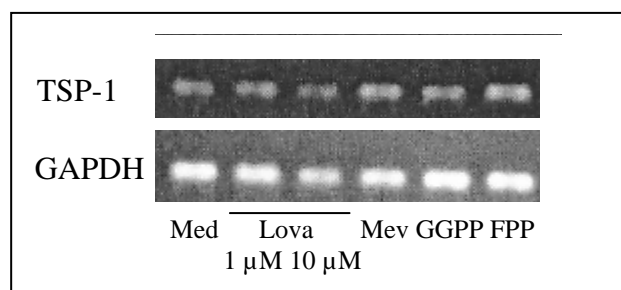


Abb. 3.5b: PCR – Analyse der TSP-1 Expression nach Zugabe von Lovastatin (1, 10 μM) sowie Mevalonat (250 μM), GGPP (10 μM), FPP (10 μM) jeweils zur höchsten Lovastatinkonzentration (10 μM). GAPDH als Kontrolle. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

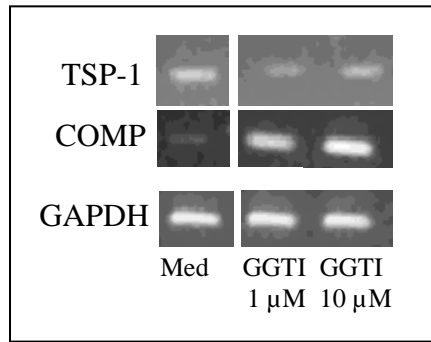


Abb. 3.5c: PCR – Analyse der TSP-5/COMP und der TSP-1 Expression nach Inkubation mit GGTI-286 (1, 10 µM). GAPDH als Kontrolle. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

Die Inkubation mit FTI-277 (200 nM, 400 nM) über 48 Stunden beeinflusste die TSP-5/COMP und die TSP-1 Expression in GMZ kaum (Abb. 3.6). Eine 48 Stunden-Inkubation mit dem spezifischen Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 (5 µM – 30 µM) hingegen führte zu einer deutlichen Steigerung der TSP-5/COMP Expression. TSP-1 hingegen zeigte keinen ausgeprägten Effekt auf Y-27632. Bei 30 µM war eine Expressionshemmung erkennbar, in niedrigeren Konzentrationen (5µM, 15 µM) waren die Ergebnisse allerdings nicht einheitlich und eine deutliche Hemmung konnte so mittels PCR-Analysen nicht eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 3.6).

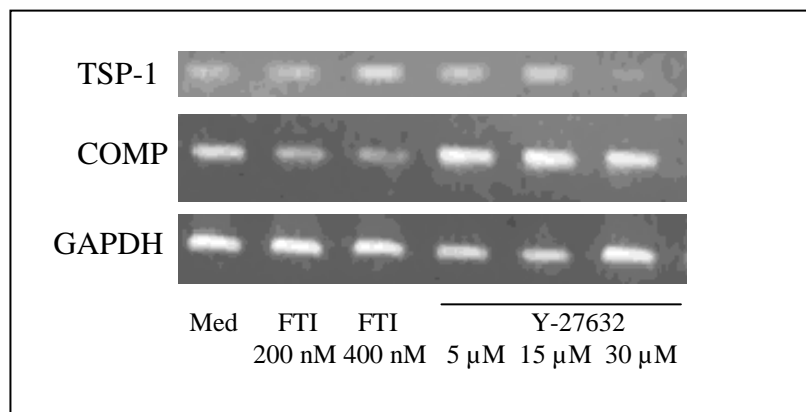


Abb. 3.6: PCR – Analyse der TSP-5/COMP sowie der TSP-1 Expression nach Zugabe von FTI-277 (200 nM, 400 nM) und Y-27632 (5, 15, 30 µM). GAPDH als Kontrolle. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

Die Northern – Blot Analysen zeigten analog zu den PCR-Ergebnissen eine konzentrationsabhängige Hemmung der TSP-1-Expression durch Lovastatin (0,1 µM – 2,5 µM), welche jeweils durch Zugabe von Mevalonat (250 µM),

GGPP (10 μM) und FPP (10 μM) zur höchsten Lovastatin-Konzentration (2,5 μM) zumindest teilweise wieder aufgehoben werden konnte (Abb. 3.7). GGTI-286 (20 μM) hemmte in einer Konzentration von 20 μM deutlich die Expression von TSP-1, wohingegen kein Einfluss von FTI-277 nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.8). Y-27632 führte zu einer - im Vergleich zu GAPDH - mäßigen konzentrationsabhängigen Minderung der TSP-1 Expression (Abb. 3.9, 1 μM – 30 μM).

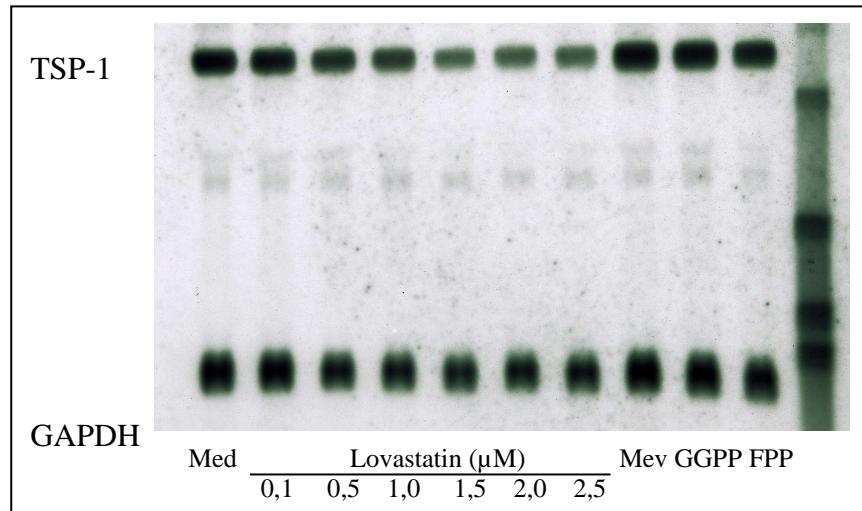


Abb. 3.7: Northern-Blot Analyse: Effekt ansteigender Lovastatin – Konzentrationen (0,1 μM – 2,5 μM) sowie der Zugabe von Mevalonat (250 μM), GGPP (10 μM) und FPP (10 μM) zur höchsten Lovastatin-Konzentration (2,5 μM) auf die Expression von TSP-1. GAPDH als Kontrolle
Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz zu TSP-1 führte die Inkubation mit Y-27632 zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der TSP-5/COMP-Expression (1 μM – 30 μM) (Abb. 3.9).

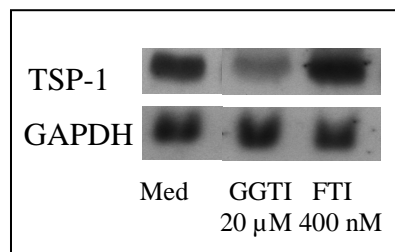


Abb. 3.8: Northern-Blot Analyse der TSP-1 Expression nach 48 h Inkubation mit GGTI (20 μM) und FTI (400 nM). GAPDH als Kontrolle
Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

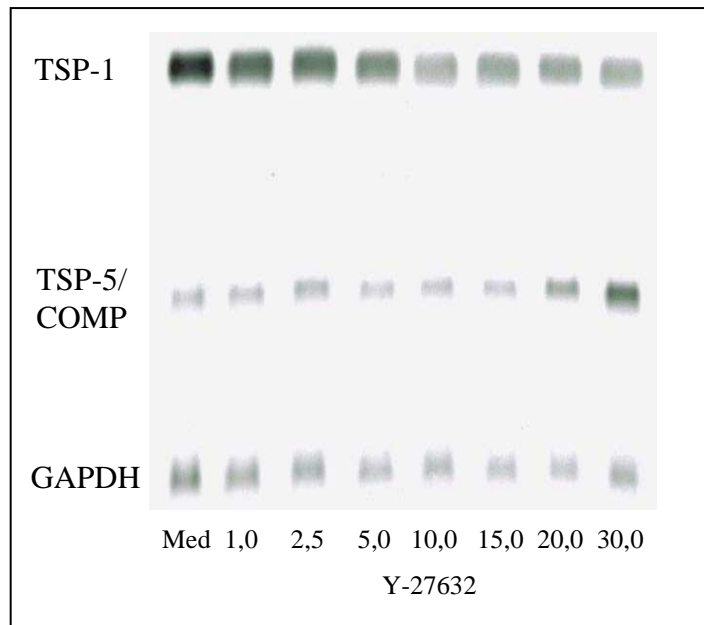


Abb. 3.9: Northern-Blot Analyse der TSP-5/COMP und TSP-1 Expression nach 48 h nach der Zugabe des Rho-Kinase-Inhibitors Y-27632 (Angaben in μM). GAPDH als Kontrolle.

3.3. Western-Blot – Analyse der TSP-5/COMP und TSP-1 Expression

Western-Blot Analysen aus Zelllysaten glatter Muskelzellen bestätigten die Beeinflussung der TSP-1 und TSP-5/COMP-Expression, wie sie in den RNA-Untersuchungen nachweisbar waren. Nach 48 h Inkubation mit Lovastatin verminderte sich die TSP-1-Konzentration in den Lysaten konzentrationsabhängig, während sie bei TSP-5/COMP anstieg. Auch hier konnte durch Mevalonat, GGPP und FPP der Effekt aufgehoben werden (Abb. 3.10). GGTI-286 minderte ebenfalls die TSP-1-Expression (deutlich bei $20\mu\text{M}$), während ein Einfluss durch FTI-277 nicht zu beobachten war (Abb. 3.11). Ein Einfluss von GGTI-286 und FTI-277 auf die Expression von TSP-5/COMP konnte allerdings nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Y-27632 führte zu einer schwachen Hemmung der TSP-1-Expression (Abb. 3.11), während TSP-5/COMP deutlich in seiner Expression gesteigert wurde (Abb. 3.11 und 3.20).

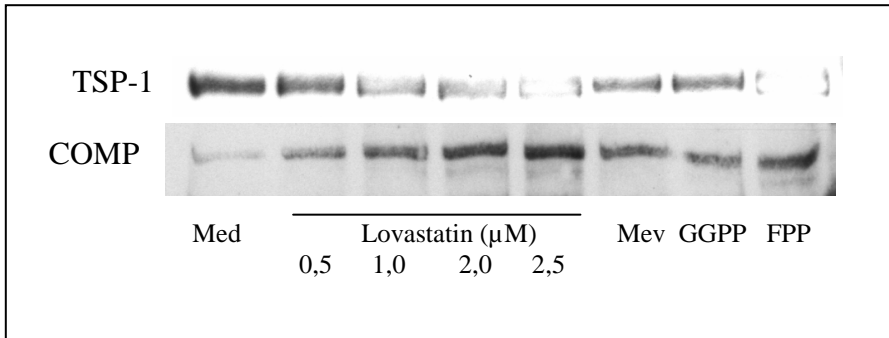


Abb. 3.10: Western-Blot Analyse der TSP-5/COMP und TSP-1 Expression nach 48 h Zugabe von Lovastatin (0,5 – 2,5 μM) sowie Zugabe von Mevalonat (250 μM), GGPP (10 μM) und FPP (10 μM) zur höchsten Lovastatinkonzentration (2,5 μM). Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

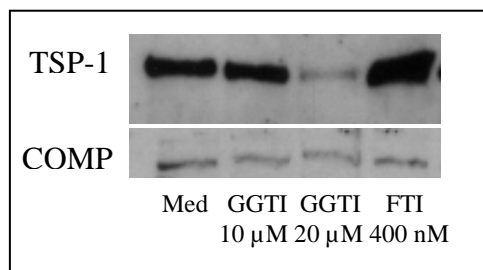


Abb. 3.11a: Western-Blot Analyse der TSP-5/COMP und TSP-1 Expression nach 48 h Zugabe von GGTI-286 (10 μM , 20 μM) und FTI-277 (400 nM). Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

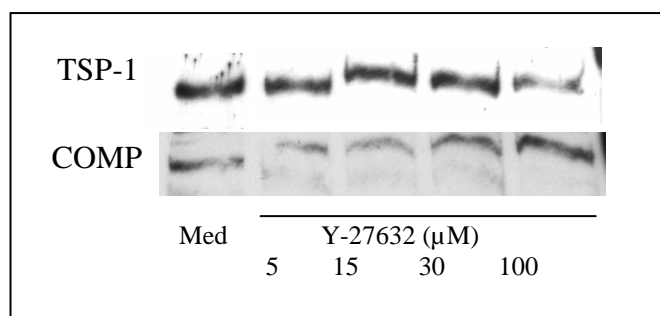


Abb. 3.11b: Western-Blot Analyse der TSP-5/COMP und TSP-1 Expression nach 48 h Zugabe von Y-27632 (5 – 100 μM). Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.4. Expression von TSP-2 – RNA in arteriellen Gefäßwandzellen

TSP-2 zeigte sowohl in PCR- als auch in Northern-Blot-Analysen (Abb. 3.12 - 3.15) eine vergleichbare Reaktion auf die Inkubation mit den verschiedenen untersuchten Hemmstoffen wie TSP-1, wobei die Reaktion schwächer zur Ausprägung kam. Die Hemmung durch Lovastatin und die Aufhebung dieses Effekts durch Mevalonat, GGPP und z.T. FPP war erkennbar (s. Abb. 3.14, Northern-Blot Analyse). Die Beeinflussung durch GGTI-286 und Y-27632 war allerdings allenfalls schwach ausgeprägt. FTI-277 zeigte weder in den PCR – Analysen noch in den Northern Blots einen Einfluss auf die TSP-2 Expression.

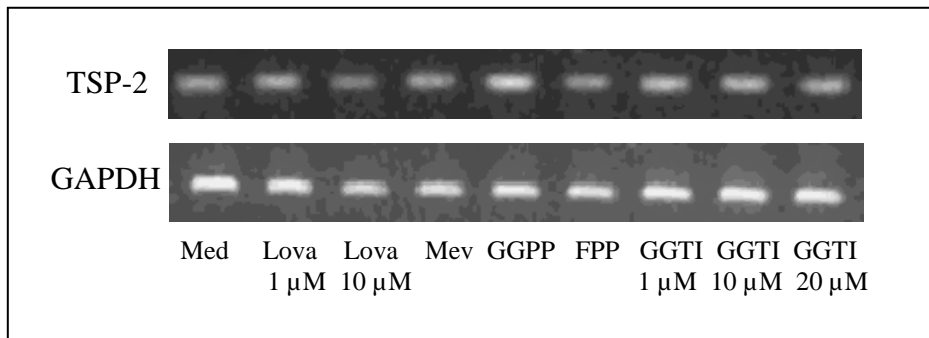


Abb. 3.12: PCR – Analyse der TSP-2 Expression nach Zugabe von Lovastatin (1, 10 μM), GGTI-286 (1, 10, 20 μM) sowie Mevalonat (250 μM), GGPP (10 μM), FPP (10 μM) jeweils zur höchsten Lovastatin-Konzentration (10 μM). GAPDH als Kontrolle. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

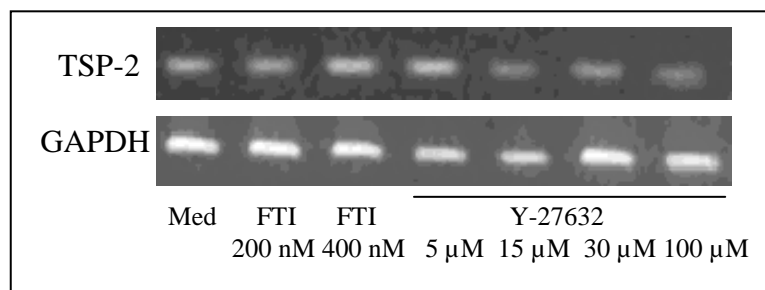


Abb. 3.13: PCR – Analyse der TSP-2 Expression nach Zugabe von FTI-277 (200 nM, 400 nM) und Y-27632 (5, 15, 30, 100 μM). GAPDH als Kontrolle. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

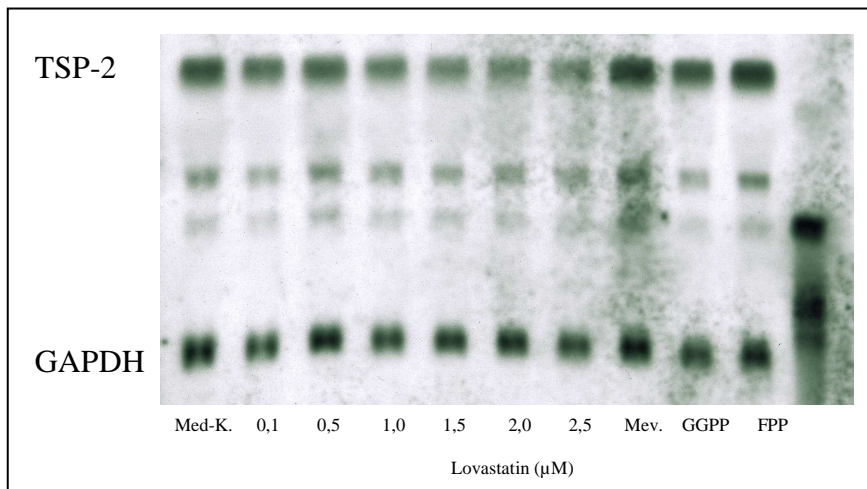


Abb. 3.14: Northern-Blot: Effekt ansteigender Lovastatin – Konzentrationen (0,1 µM bis 2,5 µM) auf die Expression von TSP-2, sowie der Zugabe von Mevalonat (250 µM), GGPP (10 µM) und FPP (10µM) zur jeweils höchsten Lovastatin-Konzentration (2,5 µM). GAPDH als Kontrolle. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

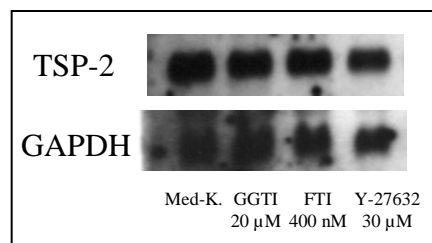


Abb. 3.15: Northern-Blot Analyse: Einfluss von GGTI-286 (20µM), FTI-277 (400 nM) und Y-27632 (30 µM) auf die Expression von TSP-2. GAPDH als Kontrolle. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.5. Expression von TSP-3 und TSP-4 – RNA in arteriellen Gefäßwandzellen

Proliferierende GMZ (10% FKS) exprimieren TSP-3, welches durch Northern-Blot Analysen (Abb. 3.15a) und PCR-Analysen (Abb. 3.15b) gezeigt werden konnte. Die Inkubation mit Lovastatin, Mevalonat, GGPP, FPP GGTI-286, FTI-277 und Y-27632 zeigte hingegen uneinheitliche Ergebnisse, so dass kein signifikanter Effekt durch diese Substanzen nachgewiesen werden konnte.

TSP-4 konnte mittels Northern-Blot Analysen in proliferierenden GMZ (10% FKS) nicht nachgewiesen werden. PCR-Analysen bewiesen jedoch das Vorkommen von TSP-4. (Abb. 3.15b). Auch die TSP-4-Expression wurde durch die verschiedenen Hemmstoffe nicht klar beeinflusst.

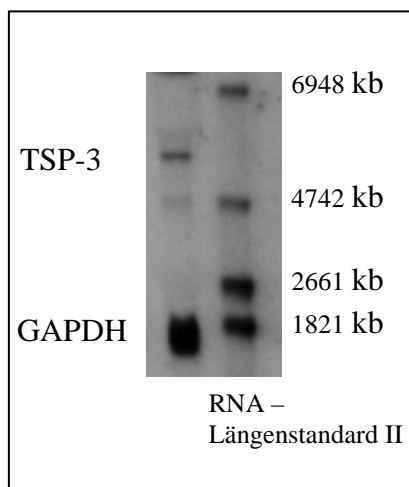


Abb. 3.15a: Northern-Blot Analyse: TSP-3 wird in humanen glatten Muskelzellen exprimiert. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

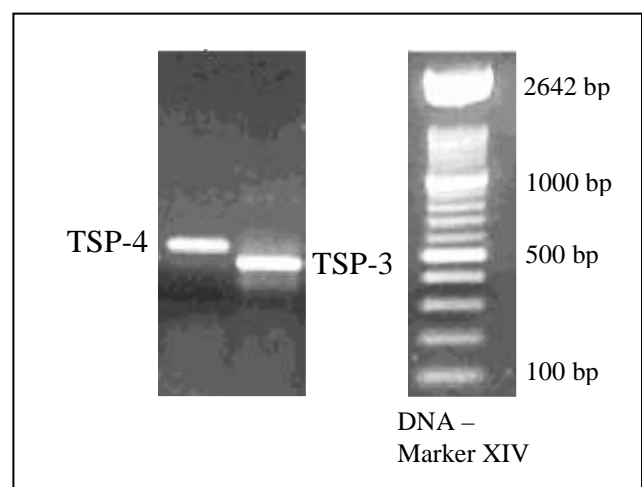


Abb. 3.15b: PCR – Analyse: TSP-3 (494 bp) und TSP-4 (561 bp) werden in humanen GMZ exprimiert. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.6. Auswirkung von Y-27632 auf den Genaktivität in arteriellen Gefäßwandzellen

Um weitere Einflüsse der Rho-Kinase auf die Expression von Genen aufzuklären führten wir zwei Testreihen mit Zellkulturen unter Inkubation mit dem Rho-Kinase Y-27632 durch. Nach Extraktion der RNA wurde die Genaktivität mit Hilfe der Genchip-Technologie (Affymetrix) bestimmt.

In der Testreihe A wurden glatte Muskelzellen zunächst für 24 h wachstumsarretiert. Nach Präinkubation mit 30 μ M Y-27632 für 6 h erfolgte eine maximale Wachstumsstimulation mit EC-Medium (enthält IGF und FGF als Wachstumsfaktoren) in Anwesenheit von Y-27632 (30 μ M) für 6 h. Anschließend erfolgte ebenfalls die RNA-Isolierung. In der Testreihe A fand sich einer Aktivitätsänderung von 11 Genen, davon wurden 7 in ihrer Aktivität gesteigert und 4 in ihrer Aktivität gemindert (Abb. 3.17).

In der Testreihe B wurden in 10% FKS proliferierende glatten Muskelzellen mit 30 μ M Y-27632 für 48h inkubiert. Unter diesen Bedingungen wurden 65 Gene signifikant reguliert, davon wurden 46 in ihrer Aktivität gesteigert, 19 dagegen in ihrer Aktivität gemindert (Abb. 3.18-19).

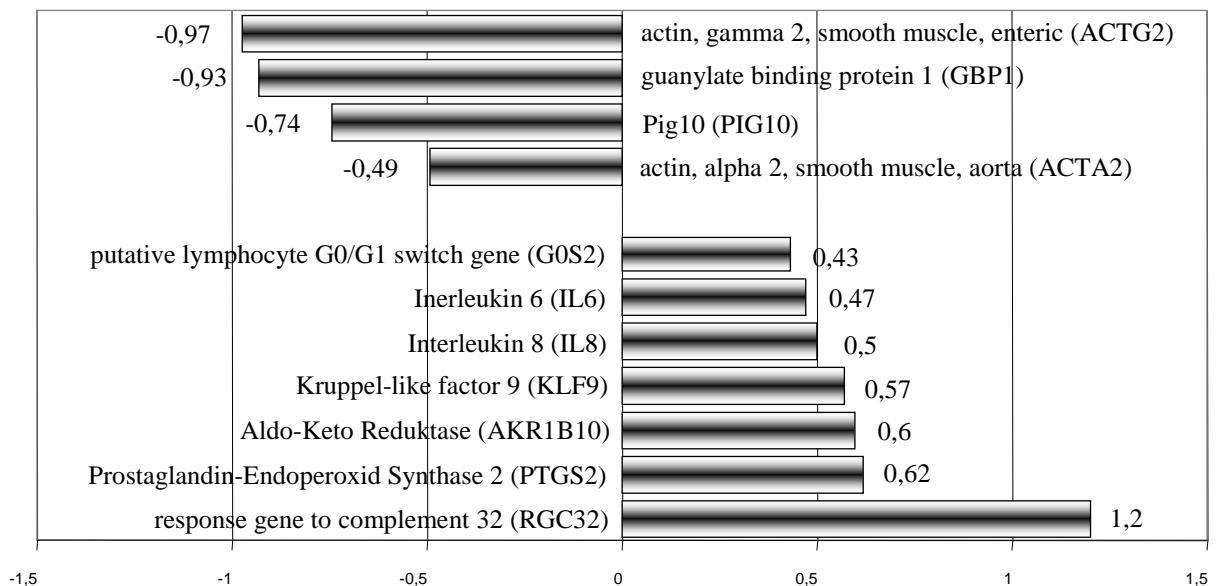


Abb. 3.17: Gene Array Analyse der Genaktivität humaner GMZ nach maximaler Wachstumsstimulation zuvor wachstumsarretierter Zellen unter Inkubation mit Y-27632 (30 μ M) (Testreihe A). Die Aktivitätsänderung ist mit der durchschnittlichen signal-log-ratio (SLR) angegeben.

Als Kontrolle dienten bei beiden Ansätzen gleich behandelte Zellkulturen ohne Anwesenheit von Y-27632.

Auffallend war, dass durch die Inkubation mit dem Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 einige Gene hochreguliert wurden, die in der extrazellulären Matrix vertreten sind (Fibulin, collagen type XV, Dermato-pontin, CHI3L1, COMP, ADAMTS5). Zudem wurden Gene reguliert die einen Einfluss auf die Zellstruktur, -motilität und Kontraktion haben (Tropomyosin, Aktin, PIG10, Periplakin, Transgeline, Filamin, regulator of G-protein signalling 4), Einfluss auf die Interaktion von Zellen nehmen bzw. intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren oder beeinflussen (Interleukine, Interleukinrezeptoren, Proenkephalin, insulin-like growth factor, chemokine, CD14, Transglutaminase). Im Besonderen wurden Gene, welche für Zellkontraktion mitverantwortlich sind, herunterreguliert (Tropomyosin, Aktin, PIG10, Transgeline, Filamin, regulator of G-protein signalling 4).

Dabei scheint der Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 auf proliferierende aber nicht akut wachstumsstimulierte GMZ einen vielseitigeren und komplexeren Einfluss zu nehmen als auf zuvor arretierte und dann akut wachstumsstimulierte GMZ (65 gegenüber 11 signifikant veränderten Genaktivitäten).

Auffallend war vor allem die hochsignifikante Hochregulierung von TSP-5/COMP durch kontinuierliche Inkubation mit Y-27632 in proliferierenden, nicht-stimulierten GMZ (durchschnittliche SLR: 0,77). Dieses Ergebnis deckte sich mit unseren Untersuchungen mittels PCR, Northern- und Western-Blot Analysen.

Die großen Thrombospondine TSP-1 und TSP-2 sowie das kleinere Thrombospondin TSP-3 wurden in den Genarray-Versuchen durch Y-27632 nicht signifikant reguliert, waren allerdings stets nachweisbar. TSP-4 hingegen konnte in den durchgeführten Versuchen nicht nachgewiesen werden.

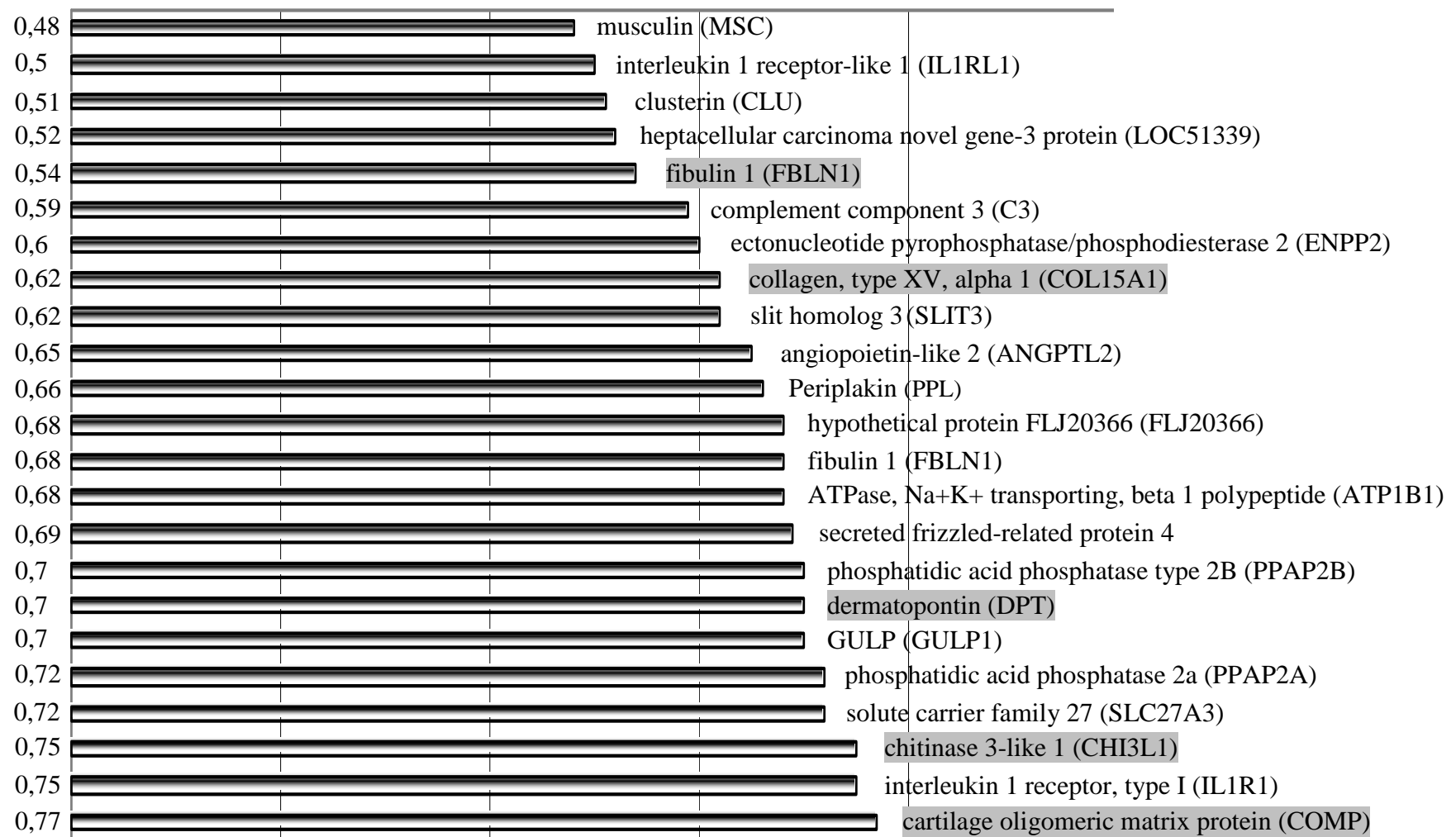


Abb. 3.18a: : Gene Array Analyse der Genaktivität (Zunahme) humaner GMZ nach kontinuierlicher Einwirkung von Y-27632 (30µM) über 48 Stunden. Die Aktivitätsänderung ist mit der durchschnittlichen signal-log-ratio (SLR) angegeben. Bestandteile der EZM grau unterlegt.

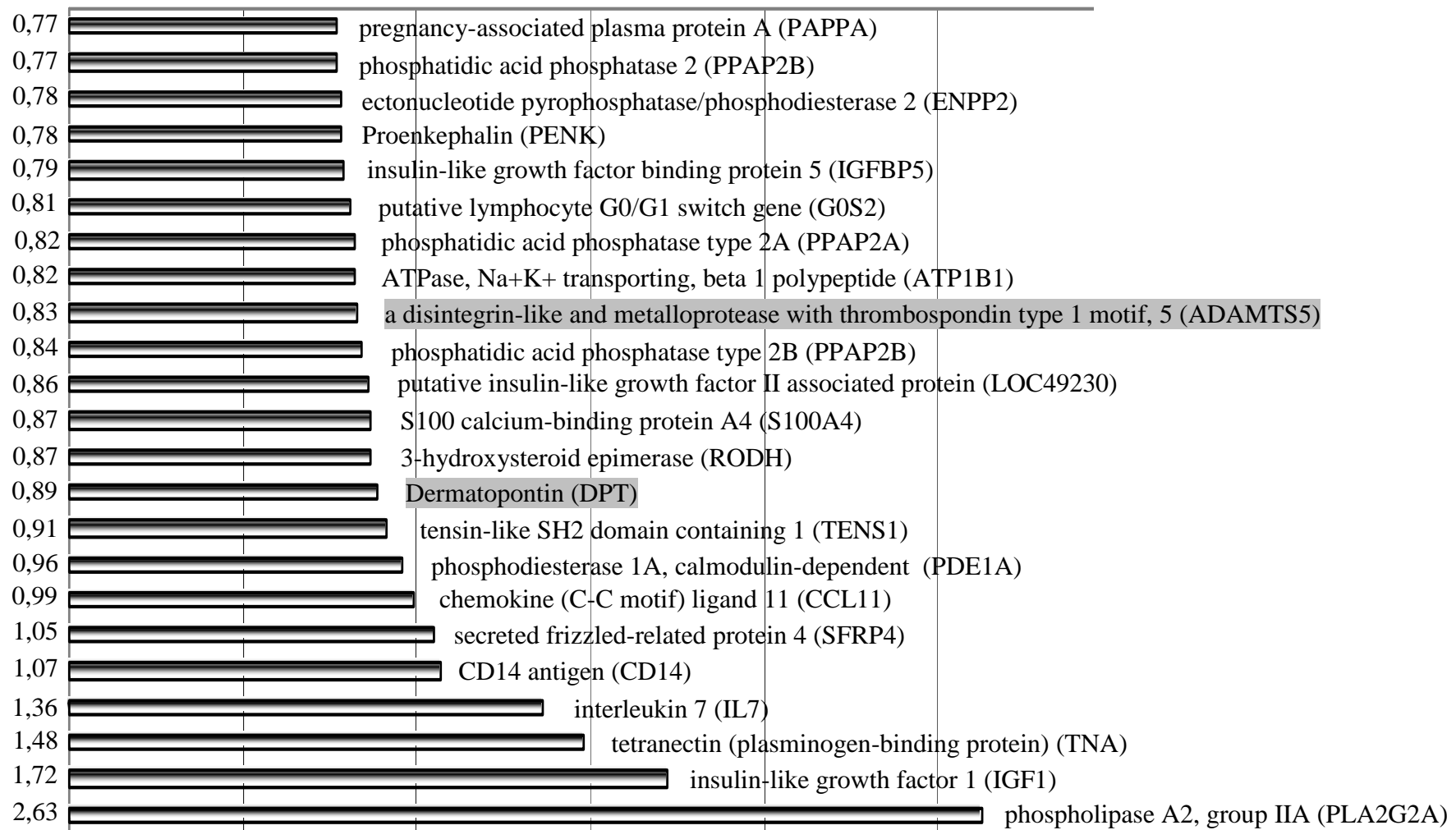


Abb. 3.18b: Gene Array Analyse der Genaktivität (Zunahme) humaner GMZ nach kontinuierlicher Einwirkung von Y-27632 (30µM) über 48 Stunden. Die Aktivitätsänderung ist mit der durchschnittlichen signal-log-ratio (SLR) angegeben. Bestandteile der EZM grau unterlegt.

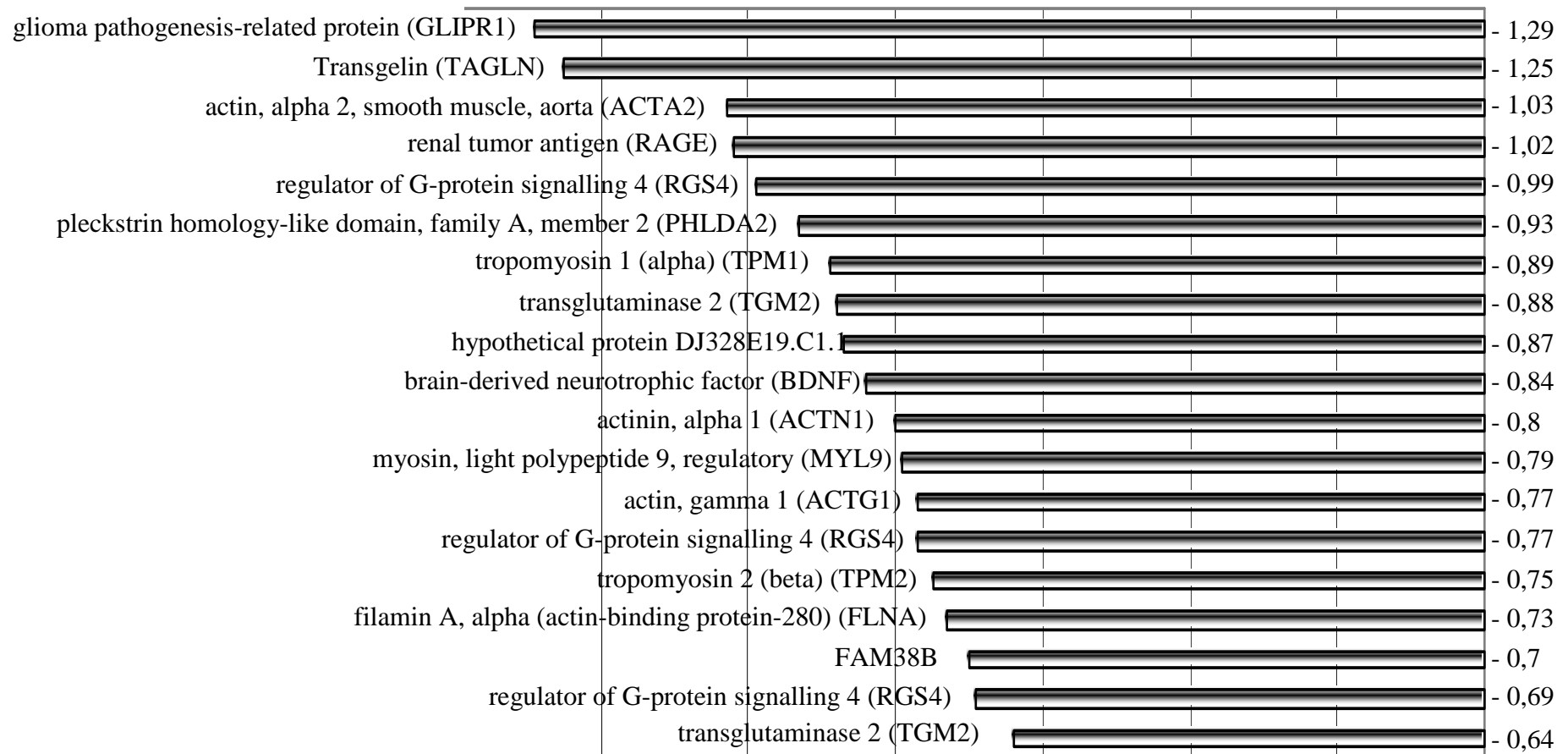


Abb. 3.19: Gene Array Analyse der Genaktivität (Abnahme) humaner GMZ nach kontinuierlicher Einwirkung von Y-27632 (30µM) über 48 Stunden. Die Aktivitätsänderung ist mit der durchschnittlichen signal-log-ratio (SLR) angegeben.

3.7. Vergleich der TSP-5/COMP-Expression nach Inkubation mit Y-27632 und Rapamycin

In einer Gene-Array Untersuchung, die parallel zu der Untersuchung mit Y-27632 durchgeführt wurde, wurde die Wirkung von Rapamycin (Sirolimus) (100 nM) auf subkonfluent proliferierende (10% FKS) GMZ nach kontinuierlicher Inkubation über 48 Stunden untersucht (vgl. Versuchsanordnung 2.10.). In der interventionellen Kardiologie werden seit einigen Jahren erfolgreich Rapamycin-beschichtete Stents eingesetzt, unter denen die Restenoserate deutlich gesenkt werden konnte. Der genaue Mechanismus über den die Restenoseprotektion vermittelt wird ist bis heute allerdings noch nicht völlig geklärt. Rapamycin bildet einen Komplex mit FKBP12 und verhindert somit die Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase mTOR (mammalian target of rapamycin). In dieser Studie sollten mögliche Wirkmechanismen aufgedeckt werden. Überraschenderweise zeigte sich eine hochsignifikante Hochregulierung von TSP-5/COMP mit einer durchschnittlichen SLR von 1,47 (alle 9 Vergleiche behandelter Kulturen gegenüber Medium-Kontrollen positiv). Da dieses Ergebnis für die vorliegende Arbeit von Interesse war, wurden die Expression von TSP-5/COMP mittels Western-Blot Analysen weiter untersucht. Dazu wurden subkonfluente proliferierende (10% FKS) GMZ für jeweils 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden mit Rapamycin (100 nM) und vergleichend Y-27632 (30 µM) inkubiert und anschließend die Proteine isoliert (s. 2.8.) Die Western-Blot Analyse erfolgt analog den bisherigen Untersuchungen (s. 2.9.).

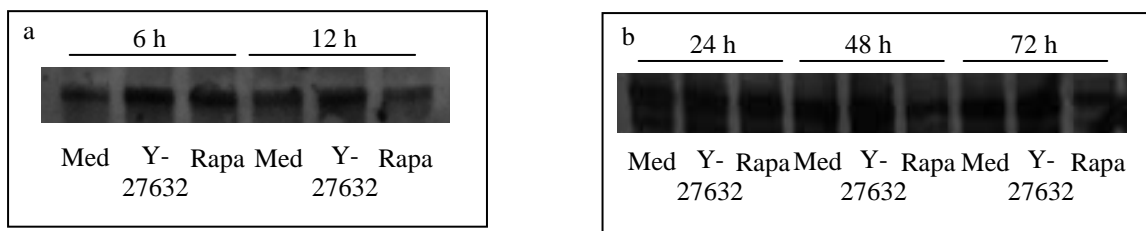


Abb. 3.20a,b: Wester-Blot Analyse: Zeitliche Veränderung der Wirkung von Y-27632 (30 µM) und Rapamycin (100 nM) auf die Expression von COMP in GMZ

In den Western-Blot Analysen zeigte sich über den Verlauf von 72 Stunden eine kontinuierliche Abnahme der TSP-5/COMP-Proteinexpression in Zelllysaten (Abb. 3.20), welche im Gegensatz zu der gesteigerten TSP-5/COMP-RNA-Expression in den Gene Arrays steht. Der Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 führte, wie in den Versuchen zuvor (siehe 3.3), zu einer kontinuierlichen Zunahme von TSP-5/COMP-Protein (Abb. 3.20).

4. Diskussion

4.1. Wirkung von Statinen und des Rho-Kinase Signaltransduktionsweges auf die Proliferation GMZ

Ausgangspunkt dieser Studie war die Cholesterin-unabhängigen, pleiotropen Effekte der Statine auf den Prozess der Atherosklerose speziell in Bezug auf die Proliferation glatter Muskelzellen und die Expression von extrazellulärer Matrix zu untersuchen. Eine Vielzahl pleiotroper Effekte ist bislang schon beschrieben worden. So verbessern Statine die endotheliale Dysfunktion¹¹⁵⁻¹¹⁷, welche als Ausgangspunkt der Atherogenese gesehen wird. Des Weiteren haben Statine antientzündliche¹¹⁸, antioxidative¹¹⁹ und Plaque-stabilisierende¹²⁰ Wirkungen. Als ein möglicher Signalweg, über welchen diese Effekte vermittelt werden, ist die Verknüpfung des Isoprenoidstoffwechsels mit dem G-Protein Rho und seiner assoziierten Kinase beschrieben worden.

Die Proliferation der GMZ stellt einen Schlüsselschritt in der Atherogenese dar, da über die Proliferation und Migration der GMZ eine Neointimabildung ermöglicht wird. Die Hemmung von GMZ-Proliferation in-vitro durch Statine wurde bereits nachgewiesen^{121;122}. Hierbei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Mevalonat die Wirkung der Statine aufheben kann. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch hier die Proliferationshemmung über den Rho-Kinase-Signaltransduktionsweg vermittelt werden könnte. In den Untersuchungen dieser Studie konnten wir die bisherigen Beobachtungen bestätigen, so zeigte auch hier die Behandlung mit Lovastatin eine Abnahme der Zellproliferation mit der Folge einer verminderten Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch in dieser Studie konnte Mevalonat den Effekt von Lovastatin aufheben. Eine Aufhebung der Proliferationshemmung GMZ durch GGPP konnte bislang in einem in-vitro Experiment mit Pravastatin nachgewiesen werden¹²³. Wir untersuchten ebenfalls die Wirkung von GGPP und FPP und konnten zeigen, dass auch GGPP zu einer Aufhebung der Proliferationshemmung von GMZ durch Lovastatin führt. Mit FPP hingegen konnte nur eine leichte Revision des Lovastatineffektes herbeigeführt werden. Weiter untersuchten wir die Wirkung

von GGTI-286 auf die Zellproliferation von GMZ. Daten hierzu waren zu Beginn unserer Untersuchungen noch nicht veröffentlicht worden. GGTI-286 führte ebenfalls dosisabhängig zu einer Verminderung der Zellproliferation, welches auch hier die Abnahme der absoluten Zellzahl (gemessen in einem MTT – Test) zur Folge hatte. In einer im April 2005 veröffentlichten Studie zeigte eine Forschungsgruppe, dass mit dem dem GGTI-286 verwandten Geranylgeranyl-Transferase Inhibitor GGTI-298 die GMZ-Proliferation nach Stimulation mit Serum, TNF- α oder Angiotensin-II vermindert werden kann¹²⁴. Eine Stimulation von GMZ hatten wir in unseren Versuchen nicht durchgeführt, sondern untersuchten die Wirkung von GGTI-286 auf kontinuierlich proliferierende GMZ. Ein Einfluss von Farnesyltransferase-Inhibitoren auf die Proliferation von GMZ ist bislang noch nicht beschrieben worden. In unseren Untersuchungen hierzu konnten wir keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation glatter Muskelzellen durch FTI-277 nachweisen.

Von Rho selbst ist bislang schon bekannt, dass es über die Aktivierung einer MAP-Kinase-Kaskade die Proliferation fördern kann¹²⁵. Eine Hemmung der DNA-Synthese durch den spezifischen Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 konnte bislang in GMZ der Ratte nach Thrombin-induzierter Stimulation nachgewiesen werden. Unsere Daten zeigten nun erstmals, dass auch Y-27632 in-vitro die Proliferation humaner GMZ unter kontinuierlicher Proliferation hemmen kann. Eine immunhistologische in-vivo Studie nach Gefäßverletzung konnte allerdings keine Hemmung der GMZ-Proliferation durch Y-27632 nachweisen¹²⁶. Allerdings konnte in anderen tierexperimentellen Studien durch Einsatz eines spezifischen Rho-Kinase Inhibitors die Ausbildung von atherosklerotischen Läsionen gehemmt werden¹²⁷⁻¹³². Ob dieser antiatherogene Effekt über antiproliferative oder andere Mechanismen vermittelt wird, ist bislang noch unklar.

Aufgrund unserer Ergebnisse gehen wir jedoch davon aus, dass die proliferationshemmende Wirkung der Statine in vitro zumindest teilweise über eine verminderte Bildung von Geranylgeranyl-Phosphat und eine subsequente Hemmung des Rho-Kinase-Signaltransduktionsweges vermittelt wird.

Zudem dienten die erhobenen Daten aus den Proliferations-Assays zur Dosisfindung für die weiteren molekularbiologischen Untersuchungen auf das Expressionsverhalten der Thrombospondine.

4.2. Thrombospondin-1 und Cartilage Oligomeric Matrix Protein werden unterschiedlich reguliert

Die extrazelluläre Matrix ist wesentlicher Bestandteil aller Gefäße und nimmt über seine strukturellen als auch biologischen Veränderungen Teil am Prozess der Atherogenese. Dass Statine auf die Zusammensetzung der EZM Einfluss nehmen können, ist von uns in früheren Studien schon belegt worden. Besonders auffallend war hier die deutliche Abnahme der TSP-1 Expression in GMZ nach Behandlung mit verschiedenen Statinen (Simvastatin, Lovastatin)¹²¹. Dabei konnte Mevalonat als Produkt des Isoprenoidstoffwechsels den Effekt beider Statine auf die TSP-1 Expression wieder aufheben. Andere EZM-Moleküle wie Pro-Kollagen Typ I und Biglykan wurden weniger stark und erst nach Zugabe wesentlich höherer und möglicherweise toxischer Konzentrationen in ihrer Expression gehemmt. Zudem zeigte die Zugabe von Mevalonat zu den Statinen keine Aufhebung der ohnehin leichten Expressionsminderung. Auf der Basis diese Ergebnisse sollte in dieser Studie der Effekt von Statinen und anderen Hemmstoffen des Isoprenoidstoffwechsels auf die Expression der verschiedenen TSP-Gene untersucht werden. Von besonderem Interesse war hier der Effekt auf die Expression von TSP-5/COMP, einem erstmals von unserer Arbeitsgruppe beschriebenen Bestandteil der humanen vaskulären EZM.

Wir konnten zunächst die oben genannten Daten bestätigen und fanden auch in den in dieser Studie durchgeführten Versuchsreihen eine Verminderung der Expression von TSP-1 nach 48 Stunden Inkubation mit Lovastatin sowohl in Northern-Blots als auch in PCR-Analysen. Eine Aufhebung des Lovastatin-Effektes konnte allerdings nicht nur durch Mevalonat sondern ebenso durch das Isoprenoid Geranylgeranyl-Pyrophosphat erreicht werden. FPP zeigte eine schwache Antagonisierung des Lovastatineffektes (besonders deutlich in den

Northern-Blot Analysen). GGPP ist Ausgangspunkt für die Geranylierung von intrazellulären Proteinen mittels einer Geranylgernayl-Transferase. Das G-Protein Rho mit seiner assoziierten Kinase ist als Angriffspunkt dieser Geranylierung bekannt. Daher untersuchten wir, ob die Verminderung der TSP-1 Expression über diesen Kaskadeweg verläuft. Dabei zeigten unsere Daten, dass sowohl die Verhinderung der Geranylierung mittels des spezifischen Transferase-Inhibitors GGTI-286, als auch die Hemmung der Rho-Kinase mittels des spezifischen Rho-Kinase Inhibitors Y-27632 zu einer Verminderung der TSP-1 Expression führen, allerdings war der Effekt von Y-27632 nicht sehr ausgeprägt (deutlicher in den Northern-Blot Analysen). Die Analyse der Proteinexpression mittels Western-Blots bestätigten unabhängig davon diese Ergebnisse. Wir konnten somit den Signaltransduktionskaskade der Wirkung von Statinen auf die Expression von TSP-1 aufklären. Eine Wirkung des Farnesyltransferase-Inhibitors FTI-277 auf die Expression von TSP-1 konnten wir nicht eindeutig nachweisen. Die Farnesylierung ist aber bislang noch nicht als Aktivierungsvorgang von Rho beschrieben worden. Nicht nur Geranylpyrophosphat (GPP), sondern auch FPP kann im Isoprenoidstoffwechsel weiter in GGPP umgewandelt werden, daher ist eine Aufhebung des Lovastatin-Effektes auch für dieses Isoprenoid erklärbar.

Parallel zu unseren Untersuchungen auf das Expressionsverhalten von TSP-1 untersuchten wir auch die Beeinflussung der Expression von TSP-5/COMP. Über die Regulation dieses Glykoproteins lagen bislang noch keine Daten vor. Unsere Experimente zeigen, dass TSP-5/COMP gegensinnig zu TSP-1 reguliert wird. Die Inkubation mit Lovastatin führte zu einer Zunahme der TSP-5/COMP-Expression. Mevalonat und GGPP waren auch hier in der Lage, die gesteigerte Expression durch Lovastatin zu verhindern. Weiterhin führte auch die Inkubation mit Y-27632 als spezifischem Rho-Kinase-Inhibitor zu einer Steigerung der TSP-5/COMP Expression. Diese Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen konnten auch in Western-Blot Analysen bestätigt werden. Die Wirkung von GGTI-286 auf die Expression von TSP-5/COMP war allerdings nicht deutlich ausgeprägt.

Wir konnten somit erstmals zeigen, dass auch TSP-5/COMP als Bestandteil der EZM Angriffspunkt der pleiotropen Effekte der Statine ist. Gleichzeitig konnten wir auch hier nachweisen, dass die gesteigerte Expression durch das G-Protein Rho und seiner assoziierten Kinase vermittelt wird.

Die Unterschiede im Expressionsverhalten dieser beiden Thrombospondine stehen im Einklang mit den bisherigen Daten, die über TSP-1 sowie TSP-5/COMP in der EZM von Gefäßen erhoben worden sind. In ihrer Biologie scheinen sich die beiden Glykoproteine zu unterscheiden.

Besser untersucht ist die Wirkung von TSP-1. TSP-1 moduliert die Adhäsion, Proliferation und Migration humaner GMZ. Zudem wirkt TSP-1 modulatorisch auf die Angiogenese, aktiviert Plasminogen sowie TGF- β 1. 2003 konnte gezeigt werden, dass TSP-1 die Expression von MMP-2 sowohl steigern kann, als auch die durch Bindung mit MMP-2 dessen Wirkung verstärken kann¹³³. MMP-2 ist eine Metalloproteinase, welche durch Degradierung der EZM die Migration GMZ im Rahmen der Atherogenese ermöglichen kann. Zusammengefasst spielt TSP-1 einen pro-atherogenen Faktor dar.

Bisher vorliegende Daten weisen darauf hin, dass TSP-1 und die Rho-Kinase bei den gleichen biologischen Prozessen wie z.B. bei den Reparaturvorgängen in der frühen Phase nach Gefäßverletzungen exprimiert werden¹³⁴. Sowohl für die Rho-Kinase als auch für TSP-1 ist eine funktionelle Rolle bei der Zelladhäsion, -proliferation und -migration glatter Muskelzellen beschrieben worden^{66;135;136}. Ein wichtiger biologischer Effekt der Rho-Kinase ist z.B. die für die Migration von Zellen wichtige Organisation des Zytoskeletts. Eine Beeinflussung der Expression von Zytofilamenten und kontraktilen Proteinen konnten wir auch in unseren Gene-Array-Experimenten darstellen. Unsere Daten weisen zusätzlich darauf hin, dass möglicherweise ein Teil der durch Rho und seiner assoziierten Kinase hervorgerufenen Effekte durch die Regulation der TSP-1 Expression erfolgen könnte.

Das Vorkommen von TSP-5/COMP in humanen GMZ wurde erst 2001 nachgewiesen⁸⁶. Seither ist wenig über die Bedeutung von TSP-5/COMP in Gefäßen bekannt geworden. TSP-5/COMP zeigt sich in der EZM gehäuft in der Nähe ruhender GMZ und konnte auch im Bereich von Mikrokalzifikationen nachgewiesen werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass sich TSP-1 und TSP-5/COMP funktionell unterscheiden. So wird TSP-5/COMP in vitro in seiner Expression durch die Zugabe von TGF- β 1 und TGF- β 3 in das Serum deutlich gesteigert, wohingegen eine Steigerung von TSP-1 nach Zugabe nicht nachgewiesen werden konnte⁸⁶. Auch ist die Adhäsion von GMZ an COMP-beschichteten Oberflächen stärker ausgeprägt als an TSP-1-beschichteten Oberflächen⁸⁶. Immunhistologisch konnten ebenfalls Unterschiede zwischen TSP-1 und TSP-5/COMP in atherosklerotischen und restenotischen Läsionen gefunden werden. TSP-5/COMP zeigt sich dabei ubiquitär in normalen, atherosklerotischen und restenotischen Gefäßen⁸⁶, TSP-1 hingegen konnte nur in einem kleinen Teil von GMZ in atherosklerotischen und restenotischen Läsionen nachgewiesen werden¹³⁷. Insgesamt scheint TSP-5/COMP auf Grund der morphologischen Daten eher ein Bestandteil der perizellulären EZM von ruhenden, nicht-proliferierenden GMZ darzustellen. Die in unserer Studie gezeigte, zu TSP-1 inverse Regulation von TSP-5/COMP über die Rho-Kinase unterlegt diese Hypothese. Eine Hemmung der Rho-Kinase könnte zusammenfassend also die Ausbildung eines für eine ruhende Zelle typischen Phänotyps fördern, welcher mit einer vermehrten Expression von TSP-5/COMP einhergeht.

4.3. Thrombospondin-2, -3 und -4 als Bestandteil der EZM glatter Muskelzellen

TSP-2 als weiteres Mitglied der Thrombospondin-Familie zeigte in den RNA-Analysen ein ähnliches, allerdings nur schwächer ausgeprägtes Verhalten wie TSP-1. Besonders in den Northern-Blot Analysen war eine Hemmung der TSP-2 Expression unter Inkubation mit Lovastatin nachweisbar. Dieser Effekt unter Inkubation mit einem anderen Statin (Cerivastatin) wurde bereits 2003

publiziert¹³⁸. Auch hier konnten wir erstmals zeigen, dass nicht nur Mevalonat, sondern auch GGPP und teilweise FPP zu einem Aufheben des Statineffektes in den Northern-Blot Analysen führen. Die Auswirkung der Inkubation mit GGTI-286 und Y-27632 war schwächer ausgeprägt als bei TSP-1, so dass unsere Daten hier keinen eindeutigen Schluss zulassen, dass TSP-2 wie TSP-1 über den Rho-Kinase Signaltransduktionsweg reguliert wird.

Da eine genetische Variante des TSP-2 mit einem erniedrigten Risiko für die Entwicklung eines Herzinfarktes vergesellschaftet ist⁸⁰, könnte eine Hemmung der TSP-2 Expression möglicherweise einen protektiven Effekt ausüben.

TSP-3 und TSP-4 konnten wir in GMZ mittels Northern-Blot-Analysen (TSP-3), Gene-Array Analysen (TSP-3) bzw. PCR-Analysen (TSP-3 und TSP-4) nachweisen. Das Vorkommen von TSP-3 in GMZ ist bisher noch nicht beschrieben worden. Wir bewiesen somit erstmals mittels dreier molekularbiologischer Methoden, dass TSP-3 auch durch humane GMZ exprimiert wird.

Das Vorkommen von TSP-4 in humanen GMZ wurde parallel zu unserer Arbeit publiziert¹³⁹. Der Nachweis von TSP-4 gelang uns nur mittels der PCR-Technik. In Northern-Blot Analysen konnten wir keine TSP-4 Banden nach der Hybridisierung nachweisen. Wir führen dies darauf zurück, dass TSP-4 vermutlich nur in sehr geringer Konzentration exprimiert wird und die Northern-Blot Technik für einen Nachweis nicht sensitiv genug ist. Während der PCR kommt es zu einer Amplifikation der Sequenzen, so dass mit dieser Technik auch geringe Konzentrationen nachgewiesen werden können. In unserer Gene-Array-Studie lag TSP-4 ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze.

4.4. Die Rho-Kinase und ihre Wirkung auf die Genexpression in GMZ

Die Rho-Kinase ist eine durch kleine G-Proteine aktivierte Kinase, die durch ihren Einfluss auf die Organisation des aktinischen Zytoskeletts¹⁴⁰⁻¹⁴², die Zelladhäsion und –motilität¹⁴³, Kontraktion von glatten Muskelzellen¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ und der Aktivität von Zytokinen¹⁴⁷ und der Genexpression^{148;149} Einfluss auf den Prozess der Atherosklerose nimmt. Über den spezifischen Hemmstoff Y-27632

ist es in-vitro möglich, die Funktionen der Rho-Kinase zu untersuchen. Wir führten zwei verschiedenen Gene-Array Analysen durch, in den wir ebenfalls Veränderungen der Genaktivität feststellten, die insbesondere auf Auswirkung auf die Zell-Zell-Interaktionen, intrazelluläre Signalprozesse, Zellform und –kontraktion sowie die Zusammensetzung und Aktivität der EZM hinweisen. Um sämtliche Ergebnisse eingehender zu untersuchen, sind weitere Studien nötig, die sich mit der genauen biologischen Funktion der veränderten Genabschnitte befassen sollten. Wie schon in anderen Untersuchungen fand sich auch in der Gene-Array-Analyse unter Inkubation mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 eine hochsignifikant Hochregulation von TSP-5/COMP in proliferierenden GMZ. Eine signifikante Veränderung der Genaktivität von Thrombospondin-1 und -2 konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. In den PCR und Northern-Blot Analysen war der Effekt von Y-27632 auf die Expression von TSP-1 und -2 ebenfalls nicht sehr ausgeprägt.

Bei allen Versuchen wurden menschliche Zelllinien verwendet und die Inkubationsschemata waren identisch. Ob sich methodische Unterschiede in der Aufarbeitung der Proben während Northern-Blot Analysen und Gene-Array Analysen ergeben, die die unterschiedliche Aussage erklären, muss dahingestellt bleiben. Letztlich ist die Gene-Array Analyse ein relativ junges Verfahren, welches vor allem zur Hypothesengeneration geeignet scheint. Einzelne abweichende Ergebnisse von anderen Methoden wie PCR und Northern Blot sind aber bei der Vielzahl der untersuchten Gene (ca. 30.000) stochastisch vorstellbar. Erst in den nächsten Jahren wird abzusehen sein, inwieweit die Gene-Array Analyse in ihrer Sensitivität den bisherigen Methoden vergleichbar ist.

In der Analyse des Gene Array fanden sich einige regulierte Genabschnitte für intrazelluläre kontraktile Filamente (Aktin, Tropomyosin). Besonders für Aktin ist eine Beeinflussung durch die Rho-Kinase schon beschrieben worden¹⁵⁰. Diese Daten stimmen also mit bisherigen Untersuchungen überein, so dass wir davon ausgehen, dass unsere Untersuchungsergebnisse valide sind.

4.5. Einfluss von Rapamycin auf die Expression von TSP-5/COMP

In einer anderen Studie wiesen wir überraschenderweise eine signifikante Expressionszunahme von TSP-5/COMP in proliferierenden glatten Muskelzellen nach Inkubation mit Rapamycin (100 nM) über 48 Std. nach. Daraufhin durchgeführte Western-Blots mit Inkubationszeiten zwischen 6 und 72 Std. zeigten allerdings eine deutliche Abnahme der TSP-5/COMP-Expression in den Zellkulturen. Vermutlich führt die Behandlung von GMZ mit Rapamycin zu einer Abnahme der TSP-5/COMP-Proteinexpression bzw. zu einem erhöhten Abbau intrazellulär. Der Angriffspunkt von Rapamycin TOR (target of rapamycin) reguliert vor allem die Translation über die ribosomale Protein S6 Kinase und die eukaryotischen Translations-Initiationfaktoren 4E¹⁵¹. Daher erscheint es als wahrscheinlich, dass auch die Regulation von TSP-5/COMP erst im Bereich der zytosolischen Translation erfolgt, also herunterreguliert wird. Die gesteigerte Genaktivität dürfte als Reaktion auf die verminderte Konzentration im Zytosol im Sinne eines Kompensationsmechanismus entstehen.

Ob die Wirkung von Rapamycin auf TSP-5/COMP für die bislang noch nicht ausreichend erklärte Wirkung der Rapamycin-beschichteten Stents relevant ist, lässt sich aus diesen Daten noch nicht ableiten.

5. Zusammenfassung

Hemmstoffe der HMG-CoA-Reduktase (Statine) vermindern nicht nur die Cholesterinsynthese, sondern können auch über eine verminderte Bildung anderer Isoprenoide eine Reihe von weiteren intrazellulären Prozessen und Signaltransduktionswegen beeinflussen.

In dieser Studie haben wir versucht, die Signaltransduktionswege näher zu charakterisieren, über die Statine die Proliferation und das Muster der extrazellulären Matrixexpression arterieller glatter Muskelzellen beeinflussen. Neben dem HMG-CoA-Reduktase –Inhibitor Lovastatin wurden Hemmstoffe der Geranylgeranyl-Transferase (GGTI-286), der Farnesyltransferase (FTI 277) und der Rho-Kinase (Y-27632) eingesetzt.

Proliferations-Assays zeigten, dass der Einfluss der Statine auf die Proliferation glatter Muskelzellen womöglich über die Geranylierung des kleinen G-Proteins Rho und sukzessive über die Aktivierung der ihm assoziierten Rho-Kinase verläuft. Lovastatin als Vertreter der HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren als auch GGTI-286 und der Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 hemmten konzentrationsabhängig die Proliferation der GMZ. Die Metabolite des Isoprenoidstoffwechsels Mevalonat, GGPP und zum Teil auch FPP konnten die durch Lovastatin hervorgerufene Hemmung zumindest teilweise aufheben.

In Bezug auf die Matrixexpression fokussierten wir uns auf die Expression der Thrombospondine, einer Gruppe von insgesamt 5 Glykoproteinen. Zur Analyse der RNA-Expression der Thrombospondine setzten wir PCR, Northern-Blots und Gene-Arrays, zur Analyse der Proteinexpression Western-Blots ein.

Sowohl Lovastatin als auch GGTI-286 und Y-27632 hatten einen Effekt auf die RNA- und Proteinexpression von TSP-1 und TSP-5/COMP. Während die Expression von TSP-1 durch Statine, GGTI-286 und Y-27632 gehemmt wurde (durch letzteres allerdings nur schwach), wurde die Expression von TSP-5/COMP gesteigert.

Diese Studie konnte mit der Wirkung auf TSP-5/COMP einen weiteren pleiotropen Effekt der Statine aufzeigen. Die Expression von TSP-5/COMP wird nach unseren Befunden dabei über den Rho-Kinase Signaltransduktionsweg reguliert.

Bei den weiteren Thrombospondinen TSP-2, -3, und -4 konnten wir keine eindeutige Regulation der Expression nachweisen. Lediglich TSP-2 zeigte ein ähnliches aber schwächer ausgeprägtes Verhalten wie TSP-1. TSP-3 konnten wir in dieser Studie erstmals in humanen glatten Muskelzellen nachweisen. Die Expression von TSP-4 in GMZ wurde parallel zu dieser Studie publiziert.

Ergänzende Gene-Array-Untersuchungen mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin zeigten ebenfalls eine Zunahme der RNA-Expression von TSP-5/COMP. In Western-Blots fand sich dagegen eine Abnahme der TSP-5/COMP-Proteinexpression. Diese Befunde können am ehesten als Ausdruck der durch Rapamycin allgemein gehemmten Proteintranslation mit kompensatorischer Zunahme der RNA-Expression interpretiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.
2. Amarenco P. Hypercholesterolemia, lipid-lowering agents, and the risk for brain infarction. *Neurology*. 2001;57:S35-S44.
3. Therapeutic response to lovastatin (mevinolin) in nonfamilial hypercholesterolemia. A multicenter study. The Lovastatin Study Group II. *JAMA*. 1986;256:2829-2834.
4. Massy ZA, Keane WF, Kasiske BL. Inhibition of mevalonate pathway: benefits beyond cholesterol reduction? *Lancet*. 1996;347:102-103.
5. Massy ZA, Guijarro C. Statins: effects beyond cholesterol lowering. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16:1738-1741.
6. Tsunekawa T, Hayashi T, Kano H, Sumi D, Matsui-Hirai H, Thakur NK, Egashira K, Iguchi A. Cerivastatin, a hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, improves endothelial function in elderly diabetic patients within 3 days. *Circulation*. 2001;104:376-379.
7. Stein JH, Carlsson CM. Cerivastatin and endothelial function in elderly patients with diabetes mellitus. *Circulation*. 2002;105:E32-E33.
8. Hashimoto M, Akita H. Cerivastatin, a hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, improves endothelial function in elderly diabetic patients within 3 days. *Circulation*. 2002;105:E30-E31.
9. Sebestjen M, Zegura B, Keber I. Both cerivastatin and fenofibrate improve arterial vasoreactivity in patients with combined hyperlipidaemia. *J Intern Med*. 2002;251:77-85.
10. Laufs U, La F, V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 1998;97:1129-1135.
11. Laufs U, Fata VL, Liao JK. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1997;272:31725-31729.
12. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:61-69.
13. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moyer LA, Goldman S, Flaker GC, Braunwald E. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after

- myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation*. 1998;98:839-844.
14. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation*. 1999;100:230-235.
 15. Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA*. 2001;286:64-70.
 16. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*. 2000;343:1139-1147.
 17. Joukhadar C, Klein N, Prinz M, Schrolnberger C, Vukovich T, Wolzt M, Schmetterer L, Dorner GT. Similar effects of atorvastatin, simvastatin and pravastatin on thrombogenic and inflammatory parameters in patients with hypercholesterolemia. *Thromb Haemost*. 2001;85:47-51.
 18. Jialal I, Stein D, Balis D, Grundy SM, Adams-Huet B, Devaraj S. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation*. 2001;103:1933-1935.
 19. van Wissen S, Trip MD, Smilde TJ, de Graaf J, Stalenhoef AF, Kastelein JJ. Differential hs-CRP reduction in patients with familial hypercholesterolemia treated with aggressive or conventional statin therapy. *Atherosclerosis*. 2002;165:361-366.
 20. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation*. 2001;103:926-933.
 21. Kurata T, Kurata M, Okada T. Cerivastatin induces carotid artery plaque stabilization independently of cholesterol lowering in patients with hypercholesterolaemia. *J Int Med Res*. 2001;29:329-334.
 22. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. 2001;81:153-208.
 23. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. 2001;81:153-208.
 24. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22:32-39.

25. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22:32-39.
26. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 1996;15:2208-2216.
27. Leung T, Manser E, Tan L, Lim L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem.* 1995;270:29051-29054.
28. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.* 1996;15:1885-1893.
29. Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:459-486.
30. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998;279:509-514.
31. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 2001;81:153-208.
32. Shimokawa H. Cellular and molecular mechanisms of coronary artery spasm: lessons from animal models. *Jpn Circ J.* 2000;64:1-12.
33. Kandabashi T, Shimokawa H, Mukai Y, Matoba T, Kunihiro I, Morikawa K, Ito M, Takahashi S, Kaibuchi K, Takeshita A. Involvement of rho-kinase in agonists-induced contractions of arteriosclerotic human arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:243-248.
34. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998;279:509-514.
35. Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science.* 1997;275:1308-1311.
36. Nieuw Amerongen GP, Van Hinsbergh VW. Cytoskeletal effects of rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:300-311.
37. Horwitz AR, Parsons JT. Cell migration--movin' on. *Science.* 1999;286:1102-1103.
38. Narumiya S. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem (Tokyo).* 1996;120:215-228.

39. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Iino N, Fujii S, Kitabatake A, Shimokawa H, Takeshita A. Critical role of Rho-kinase and MEK/ERK pathways for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:868-873.
40. Chihara K, Amano M, Nakamura N, Yano T, Shibata M, Tokui T, Ichikawa H, Ikebe R, Ikebe M, Kaibuchi K. Cytoskeletal rearrangements and transcriptional activation of c-fos serum response element by Rho-kinase. *J Biol Chem.* 1997;272:25121-25127.
41. Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, Van Hinsbergh VW. Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:E127-E133.
42. Nieuw Amerongen GP, van Delft S, Vermeer MA, Collard JG, Van Hinsbergh VW. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res.* 2000;87:335-340.
43. Eto Y, Shimokawa H, Hiroki J, Morishige K, Kandabashi T, Matsumoto Y, Amano M, Hoshijima M, Kaibuchi K, Takeshita A. Gene transfer of dominant negative Rho kinase suppresses neointimal formation after balloon injury in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1744-H1750.
44. Sawada N, Itoh H, Ueyama K, Yamashita J, Doi K, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Saito T, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Arai H, Ohno N, Komeda M, Nakao K. Inhibition of rho-associated kinase results in suppression of neointimal formation of balloon-injured arteries. *Circulation.* 2000;101:2030-2033.
45. Shibata R, Kai H, Seki Y, Kato S, Morimatsu M, Kaibuchi K, Imaizumi T. Role of Rho-associated kinase in neointima formation after vascular injury. *Circulation.* 2001;103:284-289.
46. Miyata K, Shimokawa H, Kandabashi T, Higo T, Morishige K, Eto Y, Egashira K, Kaibuchi K, Takeshita A. Rho-kinase is involved in macrophage-mediated formation of coronary vascular lesions in pigs in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2351-2358.
47. Andersen HR, Maeng M, Thorwest M, Falk E. Remodeling rather than neointimal formation explains luminal narrowing after deep vessel wall injury: insights from a porcine coronary (re)stenosis model. *Circulation.* 1996;93:1716-1724.
48. Morishige K, Shimokawa H, Eto Y, Kandabashi T, Miyata K, Matsumoto Y, Hoshijima M, Kaibuchi K, Takeshita A. Adenovirus-mediated transfer of dominant-negative rho-kinase induces a regression of coronary arteriosclerosis in pigs in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:548-554.
49. Shimokawa H, Morishige K, Miyata K, Kandabashi T, Eto Y, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Takeshita A. Long-term inhibition of Rho-kinase induces a

- regression of arteriosclerotic coronary lesions in a porcine model in vivo. *Cardiovasc Res.* 2001;51:169-177.
50. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 1997;389:990-994.
 51. Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, Kaibuchi K, Takeshita A. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *FASEB J.* 2001;15:1062-1064.
 52. Shimokawa H, Seto M, Katsumata N, Amano M, Kozai T, Yamawaki T, Kuwata K, Kandabashi T, Egashira K, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Takeshita A. Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovasc Res.* 1999;43:1029-1039.
 53. Katsumata N, Shimokawa H, Seto M, Kozai T, Yamawaki T, Kuwata K, Egashira K, Ikegaki I, Asano T, Sasaki Y, Takeshita A. Enhanced myosin light chain phosphorylations as a central mechanism for coronary artery spasm in a swine model with interleukin-1beta. *Circulation.* 1997;96:4357-4363.
 54. Shimokawa H, Ito A, Fukumoto Y, Kadokami T, Nakaike R, Sakata M, Takayanagi T, Egashira K, Takeshita A. Chronic treatment with interleukin-1 beta induces coronary intimal lesions and vasospastic responses in pigs in vivo. The role of platelet-derived growth factor. *J Clin Invest.* 1996;97:769-776.
 55. Toshima Y, Satoh S, Ikegaki I, Asano T. A new model of cerebral microthrombosis in rats and the neuroprotective effect of a Rho-kinase inhibitor. *Stroke.* 2000;31:2245-2250.
 56. Kjoller L, Hall A. Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res.* 1999;253:166-179.
 57. Hall A. G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. *Science.* 1998;280:2074-2075.
 58. Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 1999;18:578-585.
 59. Clark EA, King WG, Brugge JS, Symons M, Hynes RO. Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol.* 1998;142:573-586.
 60. Schwartz MA. Integrins, oncogenes, and anchorage independence. *J Cell Biol.* 1997;139:575-578.
 61. Fujihara H, Walker LA, Gong MC, Lemichez E, Boquet P, Somlyo AV, Somlyo AP. Inhibition of RhoA translocation and calcium sensitization by in vivo ADP-ribosylation with the chimeric toxin DC3B. *Mol Biol Cell.* 1997;8:2437-2447.

62. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*. 1998;273:24266-24271.
63. Laufs U, Liao JK. Targeting Rho in cardiovascular disease. *Circ Res*. 2000;87:526-528.
64. Sage EH, Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. *J Biol Chem*. 1991;266:14831-14834.
65. Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971;68:240-243.
66. Lahav J. The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1182:1-14.
67. Patel MK, Lymn JS, Clunn GF, Hughes AD. Thrombospondin-1 is a potent mitogen and chemoattractant for human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2107-2114.
68. Iruela-Arispe ML, Bornstein P, Sage H. Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on cord formation by endothelial cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:5026-5030.
69. Tuszynski GP, Nicosia RF. The role of thrombospondin-1 in tumor progression and angiogenesis. *Bioessays*. 1996;18:71-76.
70. Silverstein RL, Leung LL, Harpel PC, Nachman RL. Complex formation of platelet thrombospondin with plasminogen. Modulation of activation by tissue activator. *J Clin Invest*. 1984;74:1625-1633.
71. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SMF, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta 1 in vivo. *Cell*. 1998;93:1159-1170.
72. Miano JM, Vlastic N, Tota RR, Stemerman MB. Smooth muscle cell immediate-early gene and growth factor activation follows vascular injury. A putative in vivo mechanism for autocrine growth. *Arteriosclerosis Thromb*. 1993;13:211-219.
73. Riessen R, Kearney M, Lawler J, Isner JM. Immunolocalization of thrombospondin-1 in human atherosclerotic and restenotic arteries. *Am Heart J*. 1998;135:357-364.
74. Raugi GJ, Mumby SM, Abbott-Brown D, Bornstein P. Thrombospondin: Synthesis and secretion of cells in culture. *J Cell Biol*. 1982;95:351-354.
75. Reed MJ, Iruela-Arispe L, O'Brien ER, Truong T, LaBell T, Bornstein P, Sage EH. Expression of thrombospondins by endothelial cells. Injury is correlated with TSP-1. *Am J Pathol*. 1995;147:1068-1080.

76. Kyriakides TR, Zhu YH, Smith LT, Bain SD, Yang ZT, Lin MT, Danielson KG, Iozzo RV, LaMarca M, McKinney CE, Ginns EI, Bornstein P. Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol.* 1998;140:419-430.
77. Bornstein P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol.* 1995;130:503-506.
78. Yang Z, Kyriakides TR, Bornstein P. Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2. *Mol Biol Cell.* 2000;3353-3364.
79. Topol EJ, McCarthy J, Gabriel S, Moliterno DJ, Rogers WJ, Newby LK, Freedman M, Metivier J, Cannata R, O'Donnell CJ, Kottke-Marchant K, Murugesan G, Plow EF, Stenina O, Daley GQ. Single nucleotide polymorphisms in multiple novel thrombospondin genes may be associated with familial premature myocardial infarction. *Circulation.* 2001;104:2641-2644.
80. Boekholdt SM, Trip MD, Peters RJG, Engelen M, Boer JMA, Feskens EJM, Zwinderman AH, Kastelein JJP, Reitsma PH. Thrombospondin-2 Polymorphism Is Associated With a Reduced Risk of Premature Myocardial Infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2002;22:24e-27.
81. Hamsten A, Eriksson P. Thrombospondins and Premature Coronary Artery Disease: Time to Go Beyond Genotype-Phenotype Association Studies. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2003;23:6-7.
82. Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, Sommarin Y, Wendel M, Oldberg A, Heinegard D. Cartilage matrix proteins: An acidic oligomeric protein (COMP) detected in cartilage. *J Biol Chem.* 1992;267:6132-6136.
83. Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegard D. COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. *J Biol Chem.* 1992;267:22346-22350.
84. Riessen R, Fenchel M, Chen H, Axel DI, Karsch KR, Lawler J. Cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) is expressed by human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:47-54.
85. Newton G, Weremowicz S, Morton CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lawler J. Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein. *Genomics.* 1994;24:435-439.
86. Riessen R, Fenchel M, Chen H, Axel DI, Karsch KR, Lawler J. Cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) is expressed by human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:47-54.

87. Riessen R, Fenchel M, Chen H, Axel DI, Karsch KR, Lawler J. Cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) is expressed by human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:47-54.
88. Canfield AE, Farrington C, Dziobon MD, Boot-Handford RP, Heagerty AM, Kumar SN, Roberts IS. The involvement of matrix glycoproteins in vascular calcification and fibrosis: an immunohistochemical study. *J Pathol.* 2002;196:228-234.
89. Rosenberg K, Olsson H, Morgelin M, Heinegard D. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J Biol Chem.* 1998;273:20397-20403.
90. Iruela-Arispe ML, Liska D, Sage EH, Bornstein P. Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development. *Dev Dynam.* 1993;197:40-56.
91. Qabar AN, Lin Z, Wolf FW, O'Shea KS, Lawler J, Dixit VM. Thrombospondin 3 is a developmentally regulated heparin binding protein. *J Biol Chem.* 1994;269:1262-1269.
92. Narouz-Ott L, Maurer P, Nitsche DP, Symth N, Paulsson M. Thrombospondin-4 Binds Specifically to Both Collagenous and Non-collagenous Extracellular Matrix Proteins via Its C-terminal Domains. *J Biol Chem.* 2000;275:37110-37117.
93. Lawler J, Duquette M, Whittaker CA, Adams JC, McHenry K, DeSimone DW. Identification and characterization of thrombospondin-4, a new member of the thrombospondin gene family. *J Cell Biol.* 1993;120:1059-1067.
94. Hauser N, Paulsson M, Kale AA, DiCesare PE. Tendon extracellular matrix contains pentameric thrombospondin-4 (TSP-4). *FEBS Lett.* 1995;368:307-310.
95. Stenina OI, Desai SY, Krukovets I, Kight K, Janigro D, Topol EJ, Plow EF. Thrombospondin-4 and its variants: expression and differential effects on endothelial cells. *Circulation.* 2003;108:1514-1519.
96. Newby AC, George SJ. Proliferation, migration, matrix turnover, and death of smooth muscle cells in native coronary and vein graft atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol.* 1996;11:574-582.
97. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002;90:251-262.
98. Wolf YG, Rasmussen LM, Ruoslahti E. Antibodies against transforming growth factor- β 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest.* 1994;93:1172-1178.

99. Merrilees MJ, Scott L. Antisense S-oligonucleotide against transforming growth factor- β_1 inhibits proteoglycan synthesis in arterial wall. *J Vasc Res.* 1994;31:322-329.
100. Bendeck MP, Irvin C, Reidy MA. Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ Res.* 1996;78:38-43.
101. Zempo N, Koyama N, Kenagy RD, Lea HJ, Clowes AW. Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:28-33.
102. George SJ, Johnson JL, Angelini GD, Newby AC, Baker AH. Adenovirus-mediated gene transfer of the human TIMP-1 gene inhibits smooth muscle cell migration and neointimal formation in human saphenous vein. *Hum Gene Ther.* 1998;9:867-877.
103. Chen D, Asahara T, Krasinski K, Witzenbichler B, Yang J, Magner M, Kearney M, Frazier WA, Isner JM, Andres V. Antibody blockade of thrombospondin accelerates reendothelialization and reduces neointima formation in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation.* 1999;100:849-854.
104. Steg PG, Ziolo M, Tahlil O, Masson P, Pruneau D, Bruneval P, Belichard P. Reduction of intimal hyperplasia by narpocarcil, a 4-methylumbelliferyl β -D-Xyloside analogue, after arterial injury in the hypercholesterolemic rabbit. *Circ Res.* 1995;77:919-926.
105. Nagler A, Miao HQ, Aingorn H, Pines M, Genina O, Vlodaysky I. Inhibition of collagen synthesis, smooth muscle cell proliferation, and injury-induced intimal hyperplasia by halofuginone. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:194-202.
106. Riessen R, Axel DI, Fenchel M, Herzog UU, Rossmann H, Karsch KR. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on extracellular matrix expression in human vascular smooth muscle cells. *Basic Research in Cardiology.* 1999;94:322-332.
107. Patel MK, Lynn JS, Clunn GF, Hughes AD. Thrombospondin-1 is a potent mitogen and chemoattractant for human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2107-2114.
108. Siegel-Axel DI, Runge H, Seipel L, Riessen R. Effects of cerivastatin on human arterial smooth muscle cell growth and extracellular matrix expression at varying glucose and low-density lipoprotein levels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;41:422-433.
109. Axel DI, Brehm BR, Wolburg-Buchholz K, Betz EL, Koveker G, Karsch KR. Induction of cell-rich and lipid-rich plaques in a transfilter coculture system with human vascular cells. *J Vasc Res.* 1996;33:327-339.

110. Munro E, Patel M, Betteridge L, Clunn G, Gallagher K, Hughes A, Schachter M, Wolfe J, Sever P. Inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by lovastatin: the role of isoprenoid intermediates of cholesterol synthesis. *Eur J Clin Invest.* 1994;24:766-772.
111. Cole SP. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1986;17:259-263.
112. Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 1982;218:474-475.
113. Carron JA, Hiscott P, Hagan S, Sheridan CM, Magee R, Gallagher JA. Cultured human retinal pigment epithelial cells differentially express thrombospondin-1, -2, -3, and -4. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32:1137-1142.
114. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science.* 1991;251:767-773.
115. Tsunekawa T, Hayashi T, Kano H, Sumi D, Matsui-Hirai H, Thakur NK, Egashira K, Iguchi A. Cerivastatin, a hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, improves endothelial function in elderly diabetic patients within 3 days. *Circulation.* 2001;104:376-379.
116. Stein JH, Carlsson CM. Cerivastatin and endothelial function in elderly patients with diabetes mellitus. *Circulation.* 2002;105:E32-E33.
117. Sebestjen M, Zegura B, Keber I. Both cerivastatin and fenofibrate improve arterial vasoreactivity in patients with combined hyperlipidaemia. *J Intern Med.* 2002;251:77-85.
118. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, Goldman S, Flaker GC, Braunwald E. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation.* 1998;98:839-844.
119. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:61-69.
120. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation.* 2001;103:926-933.
121. Riessen R, Axel D, Fenchel M, Herzog UU, Roßmann H, Karsch KR. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on extracellular matrix expression in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol.* 1999;94:322-332.

122. Axel DI, Riessen R, Runge H, Viebahn R, Karsch KR. Effects of cerivastatin on human arterial smooth muscle cell proliferation and migration in transfilter cocultures. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;35:619-629.
123. Terano T, Shiina T, Noguchi Y, Tanaka T, Tatsuno I, Saito Y, Yasuda T, Kitagawa M, Hirai A. Geranylgeranylpyrophosphate plays a key role for the G1 to S transition in vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb.* 1998;5:1-6.
124. Zuckerbraun BS, Barbato JE, Hamilton A, Sebti S, Tzeng E. Inhibition of geranylgeranyltransferase I decreases generation of vascular reactive oxygen species and increases vascular nitric oxide production. *J Surg Res.* 2005;124:256-263.
125. Hill CS, Wynne J, Treisman R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell.* 1995;81:1159-1170.
126. Shibata R, Kai H, Seki Y, Kato S, Morimatsu M, Kaibuchi K, Imaizumi T. Role of Rho-associated kinase in neointima formation after vascular injury. *Circulation.* 2001;103:284-289.
127. Sawada N, Itoh H, Ueyama K, Yamashita J, Doi K, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Saito T, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Arai H, Ohno N, Komeda M, Nakao K. Inhibition of rho-associated kinase results in suppression of neointimal formation of balloon-injured arteries. *Circulation.* 2000;101:2030-2033.
128. Shibata R, Kai H, Seki Y, Kato S, Morimatsu M, Kaibuchi K, Imaizumi T. Role of Rho-associated kinase in neointima formation after vascular injury. *Circulation.* 2001;103:284-289.
129. Miyata K, Shimokawa H, Kandabashi T, Higo T, Morishige K, Eto Y, Egashira K, Kaibuchi K, Takeshita A. Rho-kinase is involved in macrophage-mediated formation of coronary vascular lesions in pigs in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2351-2358.
130. Andersen HR, Maeng M, Thorwest M, Falk E. Remodeling rather than neointimal formation explains luminal narrowing after deep vessel wall injury: insights from a porcine coronary (re)stenosis model. *Circulation.* 1996;93:1716-1724.
131. Morishige K, Shimokawa H, Eto Y, Kandabashi T, Miyata K, Matsumoto Y, Hoshijima M, Kaibuchi K, Takeshita A. Adenovirus-mediated transfer of dominant-negative rho-kinase induces a regression of coronary arteriosclerosis in pigs in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:548-554.
132. Eto Y, Shimokawa H, Hiroki J, Morishige K, Kandabashi T, Matsumoto Y, Amano M, Hoshijima M, Kaibuchi K, Takeshita A. Gene transfer of dominant negative Rho kinase suppresses neointimal formation after balloon injury in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1744-H1750.

133. Lee T, Esemuede N, Sumpio BE, Gahtan V. Thrombospondin-1 induces matrix metalloproteinase-2 activation in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 2003;38:147-154.
134. Riessen R, Kearney M, Lawler J, Isner JM. Immunolocalization of thrombospondin-1 in human atherosclerotic and restenotic arteries. *Am Heart J.* 1998;135:357-364.
135. Patel MK, Lymn JS, Clunn GF, Hughes AD. Thrombospondin-1 is a potent mitogen and chemoattractant for human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2107-2114.
136. Horwitz AR, Parsons JT. Cell migration--movin' on. *Science.* 1999;286:1102-1103.
137. Riessen R, Kearney M, Lawler J, Isner JM. Immunolocalization of thrombospondin-1 in human atherosclerotic and restenotic arteries. *Am Heart J.* 1998;135:357-364.
138. Siegel-Axel DI, Runge H, Seipel L, Riessen R. Effects of cerivastatin on human arterial smooth muscle cell growth and extracellular matrix expression at varying glucose and low-density lipoprotein levels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;41:422-433.
139. Stenina OI, Desai SY, Krukovets I, Kight K, Janigro D, Topol EJ, Plow EF. Thrombospondin-4 and its variants: expression and differential effects on endothelial cells. *Circulation.* 2003;108:1514-1519.
140. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998;279:509-514.
141. Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science.* 1997;275:1308-1311.
142. Nieuw Amerongen GP, Van Hinsbergh VW. Cytoskeletal effects of rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:300-311.
143. Horwitz AR, Parsons JT. Cell migration--movin' on. *Science.* 1999;286:1102-1103.
144. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation.* 2001;103:926-933.
145. Shimokawa H. Cellular and molecular mechanisms of coronary artery spasm: lessons from animal models. *Jpn Circ J.* 2000;64:1-12.

146. Kandabashi T, Shimokawa H, Mukai Y, Matoba T, Kunihiro I, Morikawa K, Ito M, Takahashi S, Kaibuchi K, Takeshita A. Involvement of rho-kinase in agonists-induced contractions of arteriosclerotic human arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:243-248.
147. Narumiya S. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem (Tokyo).* 1996;120:215-228.
148. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Iino N, Fujii S, Kitabatake A, Shimokawa H, Takeshita A. Critical role of Rho-kinase and MEK/ERK pathways for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:868-873.
149. Chihara K, Amano M, Nakamura N, Yano T, Shibata M, Tokui T, Ichikawa H, Ikebe R, Ikebe M, Kaibuchi K. Cytoskeletal rearrangements and transcriptional activation of c-fos serum response element by Rho-kinase. *J Biol Chem.* 1997;272:25121-25127.
150. Mack CP, Somlyo AV, Hautmann M, Somlyo AP, Owens GK. Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J Biol Chem.* 2001;276:341-347.
151. Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene.* 2004;23:3151-3171.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
BrdU:	5-bromo-2'-deoxyuridine
COMP:	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
DEPC:	Diethyl-Pyrocabamat
DMSO:	
DNA:	Desoxyribonucleic-Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA:	Ethylen-Diamino-N'N'N'N'-Tetraacetat
ELISA:	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EZM:	Extrazelluläre Matrix
FKS:	Foetales Kälberserum
FPP:	Farnesylpyrophosphat
FTI:	Farnesyl-Transferase Inhibitor
GGPP:	Geranylgeranylpyrophosphat
GGTI:	Geranylgeranyl-Transferase Inhibitor
GMZ:	Glatte Muskelzellen
M:	Molar (mol/l)
MTT:	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromide = Thiazolylblue
PBS:	Phosphat Buffered Saline
PCR:	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
RNA:	Ribonucleic-Acid (Ribonukleinsäure)
RT:	Raumtemperatur
RT-PCR:	Reverse Trabscription PCR
SDS-PAGE:	Sodimdodecylsufat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
TMB:	Tertramethyl-benzidine
TSP:	Thrombospondin

Dank

Zunächst bedanke ich mich bei PD Dr. Reimer Riessen, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und während der gesamten Zeit auf hervorragende Art und Weise betreut hat, mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mir so diese Dissertation erst ermöglicht hat.

Besonderen Dank möchte ich PD Dr. Dorothea Siegel-Axel und Heike Runge für ihre Hilfe, Unterstützung und Ratschläge aussprechen.

Ich danke Herrn Dr. Michael Bonin von der Microarray Facility Tübingen für die gute Kooperation und die hervorragende Arbeit mit den Gene Chips.

Dank an meine Familie und meine Lebenspartnerin für die jahrelange Unterstützung, den Zuspruch und den Rückhalt.

Lebenslauf

Name: Stephan Andreas Paulowitsch

Geboren: 29. März 1979 in Tübingen

Eltern: Karl Paulowitsch, Oberstudienrat
Anna-Ruth Paulowitsch, geb. Lackner, Hausfrau

Geschwister: Mirjam Paulowitsch, Dipl.-Verwaltungswirtin
Benedikt Paulowitsch, Schüler

Schulbildung: 1985 – 1987 Grundschule Haslach
1987 – 1989 Vogt-Hess Grundschule Herrenberg
1989 – 1998 Andreae-Gymnasium Herrenberg
Juni 1998 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst: August 1998 – September 1999 beim Deutschen Roten Kreuz
Böblingen

Studium: 1999 – 2005 Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-
Universität Tübingen

- 2001 Vorärztliche Prüfung
- 2002 1. Staatsexamen
- 2004 2. Staatsexamen
- 2004 – 2005 Praktisches Jahr am Kreisklinikum Reutlingen
(Pädiatrie, Innere Medizin) und am Kantonsspital
Bruderholz (Chirurgie)
- 2005 3. Staatsexamen und Ablegen der ärztlichen Prüfung
am 25.11.2005

Promotion: 2001 – 2005 Anfertigung der vorliegenden Dissertation bei PD
Dr. med. Reimer Riessen in der Medizinischen Klinik der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen