

**Untersuchungen über die Expression von Early-
Response Genen und intrazelluläre
Signalübertragungswege nach Verletzung
humaner vaskulärer Endothelzellmonolayer in
vitro**

Marcus Treitl

2004

Aus dem
Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. P.C. Weber

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EXPRESSION VON EARLY-RESPONSE
GENEN UND INTRAZELLULÄRE SIGNALÜBERTRAGUNGSWEGE NACH
VERLETZUNG HUMANER VASKULÄRER
ENDOTHELZELLMONOLAYER IN VITRO**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Marcus Treitl

aus

München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. med. A. Sellmayer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Chr. Kupatt

Prof. Dr. B. F. Becker

Priv. Doz. Dr. J. Herrmann

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2004

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1 PATHOPHYSIOLOGIE UND PATHOBIOCHEMIE DER ARTERIOSKLEROSE	3
2.1.1 Epidemiologie.....	3
2.1.2 Kurze Pathogenese der Arteriosklerose und ihrer Folgeerkrankungen	4
2.1.2.1 Makromolekulare Pathogenese	4
2.1.2.2 Mikromolekulare Pathogenese	6
2.1.3 Die fortgeschrittene Arteriosklerose: Pathogenese der Restenose.....	10
2.1.3.1 Mechanismen der Restenose.....	11
2.1.3.2 Pathobiochemie der neointimalen Proliferation.....	13
2.2 BIOMECHANISCHE ENDOTHELZELLVERLETZUNG: SHEAR-STRESS UND EARLY-GEN EXPRESSION.....	15
2.2.1 Shear-Stress als Regulator der Gen-Expression in vaskulären Endothelzellen	15
2.2.1.1 Shear-Stress induzierbare Proteine	16
2.2.1.2 Shear-Stress induzierbare Transkriptionsfaktoren	17
2.2.1.3 Shear-Stress induzierte Mechanotransduktion	18
2.2.2 Mechanische Verletzung von Endothelzellmonolayern in vitro – Einflüsse auf die Genexpression...	20
2.3 INTRAZELLULÄRE SIGNALÜBERTRAGUNGSWEGE.....	22
2.3.1 Grundsätze der intrazellulären Signalübertragung.....	23
2.3.2 Membranständige Signaltransduktion.....	24
2.3.2.1 G-Proteine	24
2.3.2.2 Möglichkeiten der experimentellen Beeinflussung von G-Proteinen	25
2.3.3 Tyrosinkinaseaktivität als universelles Motiv intrazellulärer Signalübertragung.....	26
2.3.3.1 Möglichkeiten der experimentellen Beeinflussung von Tyrosinkinasen	26
2.3.4 Calcium als Second Messenger und Regulator der Proteinexpression in vaskulären Endothelzellen	27
2.3.4.1 Zelluläre Calcium-Kanäle	28
2.3.4.2 Calcium-abhängige Proteinkinase-Systeme	28
2.3.4.3 Calcium als Regulator der Gentranskription.....	29
2.3.4.4 Möglichkeiten der experimentellen Beeinflussung Ca ²⁺ -abhängiger Signalübertragungswege	30
2.3.5 Proteinkinase A	34
2.3.5.1 Bedeutung PKA-abhängiger Signalübertragungswege in der Atherogenese.....	34
2.3.5.2 Möglichkeiten der experimentellen Beeinflussung der PKA	35
2.3.6 Proteinkinase C	35
2.3.6.1 Die Familie der C-Kinasen.....	35
2.3.6.2 Downstream-Kinasen der PKC	36
2.3.6.3 Möglichkeiten der experimentellen Beeinflussung der PKC.....	37
2.3.7 Die Familie der MAP-Kinasen	38
2.3.7.1 Die wichtigsten Subfamilien der MAP-Kinasen	39
2.3.7.2 Physiologisch relevante Substrate der MAP-Kinasen	39
2.3.7.3 Möglichkeiten der experimentellen Beeinflussung der MAP-Kinasen	41
2.3.8 Transkriptionsfaktoren als Regulatoren der Genexpression	42
2.3.8.1 Immediate-Early Response Gene.....	42
2.3.8.2 c-fos	42
2.3.8.3 EGR-1	45
2.3.8.4 Der Nuclear Factor kappa B	47
3 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	49
4 MATERIALIEN UND METHODEN	50
4.1 ZELLKULTUR.....	50
4.1.1 Reagenzien und Kulturmedien.....	50
4.1.2 Präparation und Kultur der Endothelzellen	51
4.1.2.1 Präparation der Endothelzellen.....	51
4.1.2.2 Kultur der Endothelzellen.....	51
4.2 DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE.....	53
4.2.1 Verwendete Substanzen und Reagenzien	53
4.2.2 Durchführung der Verletzungsversuche.....	54
4.3 RNA-ISOLIERUNG UND NORTHERN-BLOT ANALYSEN	56
4.3.1 Verwendete Substanzen und Reagenzien	56
4.3.2 RNA-Extraktion	57
4.3.3 RNA Gelelektrophorese	58

4.3.4	<i>Vakuüm-Blotting</i>	59
4.4	RNA-HYBRIDISIERUNG DER NORTHERN-BLOTS	60
4.4.1	<i>Verwendete Substanzen und Reagenzien</i>	60
4.4.2	<i>Synthese der radioaktiven Riboprobes</i>	62
4.4.3	<i>Durchführung der Hybridisierung</i>	62
4.5	ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAYS (EMSA)	63
4.5.1	<i>Technischer Hintergrund</i>	63
4.5.2	<i>Lösungen und Reagenzien für die Proteinextraktion</i>	64
4.5.3	<i>Herstellung des nukleären Extraktes</i>	65
4.5.4	<i>Lösungen und Reagenzien für den Gelshift</i>	66
4.5.5	<i>Markierung der Oligonukleotide</i>	67
4.5.6	<i>Durchführung des Gelshift</i>	68
5	ERGEBNISSE	70
5.1	GRUNDLEGENDE EIGENSCHAFTEN DES VERLETZUNGSMODELLS	70
5.1.1	<i>Wundreparatur</i>	70
5.1.2	<i>Zeitkurve der Early-Gen Expression im verwendeten Verletzungsmodell</i>	71
5.2	G-PROTEINE UND TYROSINKINASEN ALS UBIQUITÄRE MEDIATOREN DER INTER- UND INTRAZELLULÄREN SIGNALÜBERTRAGUNG.....	73
5.2.1	<i>Inhibition G-Protein abhängiger Signalübertragungswege</i>	73
5.2.2	<i>Bedeutung von Tyrosinkinase für die verletzungsbedingte Expression von c-fos</i>	75
5.3	INTERZELLULÄRE SIGNALÜBERTRAGUNGSWEGE	77
5.4	BEDEUTUNG CALCIUM-ABHÄNGIGER SIGNALÜBERTRAGUNGSWEGE	79
5.4.1	<i>Calcium-Abhängigkeit der verletzungsbedingten Expression von c-fos</i>	79
5.4.1.1	<i>Experimentelle Anhebung der intrazellulären Calcium-Konzentration</i>	79
5.4.1.2	<i>Reduktion der intrazellulären Calcium-Konzentration durch BAPTA-AM</i>	81
5.4.2	<i>Bedeutung intra- und extrazellulärer Calciumspeicher</i>	83
5.4.2.1	<i>Chelierung extrazellulären Calciums durch EGTA</i>	83
5.4.2.2	<i>Blockade zellmembranständiger Calcium-Transporter durch Lanthan</i>	85
5.4.2.3	<i>Blockade der Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern</i>	87
5.4.3	<i>Bedeutung Calcium-abhängiger Calmodulin-Kinase-Systeme</i>	90
5.5	BEDEUTUNG DER KLASSISCHEN PROTEINKINASE-SYSTEME	92
5.5.1	<i>Proteinkinase A</i>	92
5.5.2	<i>Bedeutung der Proteinkinase C</i>	94
5.5.3	<i>Die MAP-Kinase Systeme</i>	96
5.6	VERLETZUNGSBEDINGTE AKTIVIERUNG KLASSISCHER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	99
5.6.1	<i>Der heterodimere Transkriptionsfaktor AP-1</i>	99
5.6.2	<i>NF-κB</i>	101
6	DISKUSSION	103
6.1	EXPRESSION VON EARLY RESPONSE GENEN NACH ENDOTHELZELLVERLETZUNG IN-VITRO	104
6.2	INTERZELLULÄRE KOMMUNIKATION NACH MECHANISCHER ENDOTHELZELLVERLETZUNG	106
6.2.1	<i>Bedeutung löslicher Faktoren für die interzelluläre Kommunikation nach Verletzung</i>	107
6.2.2	<i>Bedeutung membranständiger Effektormoleküle</i>	107
6.3	CALCIUM ALS SECOND MESSENGER DER MECHANISCHEN ENDOTHELZELLVERLETZUNG	109
6.3.1	<i>Einfluss der intrazellulären Calcium-Konzentration auf die Expression von c-fos</i>	109
6.3.2	<i>Differenzierte Betrachtung der intra- und extrazellulären Calcium-Kompartimente</i>	110
6.3.3	<i>Bedeutung Calcium-abhängiger Proteinkinase-Systeme</i>	113
6.4	EINFLUSS ANDERER KLASSISCHER KINASE-SYSTEME	114
6.4.1	<i>Die Proteinkinase A</i>	114
6.4.2	<i>Die MAP-Kinasen</i>	115
6.5	AKTIVIERUNG VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN NACH ENDOTHELZELLVERLETZUNG	116
7	ZUSAMMENFASSUNG	118
8	LITERATURVERZEICHNIS	121
	GENEHMIGTE VORPUBLIKATIONEN	A
	DANKSAGUNG	B
	LEBENS LAUF	C

Abkürzungsverzeichnis

A-, C-, G-, UTP	Adenosin-, Cytosin, Guanosin-, Udenin-Triphosphat
A23187	Calcium-Ionophor A23187 (4-Bromo-Calcimycin)
AGE	Advanced Glycation End Products
AP-1	Aktiviertes Protein 1
ATF-1/ -2	Activating Transcription Factor-1/ -2
BAPTA-AM	1,2-bis(2-Aminophenoxy)Ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid-Acetoxy-Methyl Ester
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
cAMP	Cyclisches Adenosin-Monophosphat
CCR2	CC Chemokine Receptor 2
cDNA	Coding Desoxynucleic Acid
cGMP	Cyclisches Guanosin-Monophosphat
CNP	C-Typ des natriuretischen Peptids
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRE	cAMP Response Element
CREB	Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element Binding Protein
CREB-K	CREB-Kinase
CRP	C-reaktives Protein
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylen Pyrrocarbonat
EGR-1	Early Growth Response Gene-1
EGTA	Ethylene Glycol-bis(b-Aminoethyl Ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
eR	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
ET-1	Endothelin 1
FAK	Focal Adhesion Kinase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molecule-1
IEG	Immediate-Early Response Genes
IFNγ	Interferon γ
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor-1

IKK	IκB Kinase-Komplex
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
IP₃	Inositol-Triphosphat
IP₃R	Inositol-Triphosphat Rezeptor
IκB	Inhibitorisches κB
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KN-62	1-[N,O-bis-(5-Isoquinolinesulphonyl)-N-Methyl-L-Tyrosyl]-4-Phenylpiperazine
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKAPK	MAPK-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Macrophage- Colony Stimulating Factor
MEK	MAPK/ ERK-Kinase
MEKK	MEK-Kinase
Mn-SOD	Mangan-Superoxiddismutase
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NF-κB	Nuclear Factor κB
NO	Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid)
NOS1/ 2	Nitric Oxide Synthase 1/ 2
oxLDL	Oxidiertes Low-Density Lipoprotein
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PD98059	2'-Amino-3'-Methoxyflavon
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGI₂	Prostaglandin I ₂
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKI	Proteinkinase A Inhibitor
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
PTCA	Perkutane transluminale Coronarangioplastie
PTK	Protein-Tyrosin Kinase

Ro 31-8220	2-{1-[3-(Amidinothio)Propyl]-1H-Indol-3-yl}-3-(1-Methylindol-3-yl)-Maleimide
SAPK	Stress-Aktivierte Proteinkinase
SB203580	4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-Methylsufinylphenyl)-5-(4-Pyridyl)1H-Imidazol
SMC	Smooth Muscle Cells
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Factor
SSRE	Shear-Stress Response Element
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TF	Tissue Factor
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TMB-8	3,4,5-Trimethoxybenzoic Acid 8-Diethylamino-Octyl Ester
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor α
tPA	Tissue Type Plasminogen Activator
TRE	Tumor Promoting Agent Response Element
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems stehen seit langer Zeit an der Spitze der Todesursachenstatistiken westlicher Industrienationen [245]. Gemeinsame Ursache aller Ausprägungen dieses Komplexes an Herz- und Gefäßerkrankungen ist meist die Arteriosklerose, deren Erforschung die medizinische Wissenschaft seit Beginn der Industrialisierung beschäftigt [136]. Durch die weltweite Erforschung der Arteriosklerose, ihrer Ätiopathologie und Pathobiochemie, hat sich unsere Sichtweise dieser Erkrankung im Laufe des letzten Jahrhunderts enorm gewandelt. War man Anfang der 20er Jahre noch der Ansicht, dass es sich um einen unvermeidbaren degenerativen Prozess mit Versteifung der Gefäßwand aufgrund eines Elastizitätsverlustes elastischer und muskulärer Fasern handelt [174], so weiß man heute, dass es sich um eine komplexe, multifaktorielle Erkrankung auf der Grundlage eng verwobener molekularer und zellulärer Ereignisse mit definierbaren Ursachen handelt. Erst diese Erkenntnis führte letztendlich dazu, dass aus dem vermeintlich Unvermeidbaren ein klar definierter und behandelbarer Krankheitsprozess entstand, der heutzutage in unterschiedlicher Ausprägung eine Vielzahl von medizinischen Fachrichtungen klinisch und wissenschaftlich beschäftigt.

Das zentrale Dogma der modernen Sicht der Atherogenese stellt die sog. Verletzungshypothese dar, welche 1973 erstmals von Ross formuliert wurde [192-196]. Nach dieser Hypothese stellen die arteriosklerotischen Läsionen der Gefäßwand eine spezielle Form einer protektiven, entzündlich-fibroproliferativen Antwort der zellulären Matrix auf verschiedenste physikalische, chemische oder auch biologische Verletzungsreize dar [192-196]. Ausgangspunkt ist dabei eine Verletzung vaskulärer Endothelzellen an prädisponierten Stellen des arteriellen Gefäßsystems. In der Folge führt eine Entzündungsreaktion zur Freisetzung verschiedenster Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche zum einen die Aktivierung von Zellen des Monozyten-Phagozytose-Systems, zum anderen aber auch proliferative Veränderungen weiterer Zellsysteme der vaskulären Zellmatrix, allen voran glatter Muskelzellen und Fibroblasten, bedingen [137, 195].

Die genaue Kenntnis der biochemischen und histopathologischen Vorgänge ermöglicht immer neue Ansätze für Prävention, Therapie und Rehabilitation des gefäßkranken Patienten sowohl auf dem nutritiven, als auch auf dem medikamentösen und therapeutisch-interventionellen Sektor. Insbesondere die Fortschritte auf dem Gebiet der Gefäßintervention mittels perkutaner Angioplastieverfahren trugen enorm dazu bei, die Lebensqualität, aber auch die

Lebenserwartung von Patienten mit fortgeschrittener peripherer und koronarer Arteriosklerose zu verbessern. Getrübt wird dieser Erfolg jedoch durch hohe Restenoseraten nach zunächst erfolgreicher Intervention aufgrund einer neointimalen Proliferation des Gefäßendothels [150, 180]. Somit spielen die physiologischen Reaktionen vaskulärer Endothelzellen auf einen definierten Verletzungsreiz auch bei dieser Behandlungsfolge der Arteriosklerose eine entscheidende Rolle [180]. Dies unterstreicht, wie wichtig die genaue Kenntnis aller intra- und extrazellulären Vorgänge nach Verletzung vaskulärer Endothelzellen für eine erfolgreiche Behandlung der Arteriosklerose und ihrer Folgeerkrankungen ist. Erst die vollständige Entschlüsselung aller beteiligten intrazellulären Signalübertragungswege wird es ermöglichen, die Genese, den Progress und das Rezidiv der Erkrankung therapeutisch zugänglich zu machen.

In den letzten Jahren konnten in vaskulären Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die durch mechanische und chemische Verletzungsreize aktiviert werden. Hierzu zählen unter anderem das Protoonkogen *c-fos* [123, 212, 213], der „Nuclear Factor κ B“ (NF- κ B) [138, 139], sowie das „Early Growth Response Gene-1“ (EGR-1) [116-119]. Sie sind Mitglieder der Familie der sog. „Immediate Early Response Genes“, welche als Transkriptionsfaktoren das Bindeglied zwischen einer durch extrazelluläre Reize aktivierten Proteinkinase-Kaskade und der gesteigerten transkriptionellen Aktivität spezifischer Genprodukte im Zellkern darstellen. Ihre Aktivierung wird gesteuert durch Proteinkinasen sowie weitere physiko-chemische Veränderungen der aktivierten Endothelzelle. Diese Erkenntnis ermöglicht neue therapeutische Ansätze für die medikamentöse Regulation der Antwort des Gefäßendothels auf Verletzungsreize, weshalb die Entschlüsselung der Vorgänge in vaskulären Endothelzellen auf transkriptioneller Ebene in den Mittelpunkt der internationalen Forschung gerückt ist.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Pathophysiologie und Pathobiochemie der Arteriosklerose

2.1.1 Epidemiologie

Die Arteriosklerose und ihre Folgeerkrankungen wie Myokardinfarkt, cerebrovaskulärer Insult und periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) stellt die häufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland dar. Allein 1999 verstarben daran in der BRD 406122 Personen (Quelle: Statistisches Bundesamt). Sie ist damit verantwortlich für über 40% der Todesfälle von Personen über 65 Jahren. Die Inzidenz und Prävalenz der Arteriosklerose ist alters- und geschlechtsabhängig. Während sie in der 5. – 7. Dekade verstärkt bei männlichen Individuen zu finden ist, kommt es ab der 7. Dekade zu einem Ausgleich der beiden Geschlechter. In der 8. Dekade sind bevorzugt weibliche Individuen betroffen [148].

Da es sich um eine Systemerkrankung handelt, sind i.d. Regel alle Abschnitte des arteriellen Gefäßsystems betroffen. Jedoch kann die Ausprägung der Symptome interindividuell unterschiedlich ausfallen. Insbesondere konzentriert sich die klinische Symptomatik nicht selten auf ein Organsystem, bevorzugt das Herz, wobei jedoch das Fehlen von Symptomen an anderen Organsystemen, z.B. des peripheren Gefäßsystems der Extremitäten, eine therapiebedürftige periphere Arteriosklerose nicht ausschließt. Eine überlappende Symptomatik an mehr als einem Organsystem ist nur selten zu finden.

Neben der Prävention der Erkrankung und der medikamentösen Therapie, sei es zur Verbesserung der Durchblutungssituation oder zur Verringerung atherogener Lipide, stellt die perkutane Revaskularisierung eines der wichtigsten Standbeine im Therapiekonzept der Herz-Kreislaufkrankheiten dar. Derzeit werden jährlich weit mehr als 1,5 Millionen perkutane transluminale (Coronar-) Angioplastien (PT(C)A) weltweit durchgeführt, wobei die unmittelbare Erfolgsrate in Abhängigkeit von der Erfahrung des Untersuchers bei über 90% liegt [120]. Langzeitstudien haben jedoch gezeigt, dass bereits 6 Monate nach der Behandlung bei etwa 30% der Patienten erneut eine klinisch signifikante und symptomatische Restenose des behandelten Gefäßabschnittes auftritt [70, 98]. Dabei liegen die Restenoserraten auch bei Implantation einer Gefäßstütze (Stent) nur unwesentlich niedriger (20%) [67].

Diese Daten unterstreichen die enorme Bedeutung einer umfassenden wissenschaftlichen Evaluation der gesamten mikro- und makromolekularen Pathogenese der Arteriosklerose und ihrer Folgeerkrankungen, insbesondere der Restenose nach Angioplastie.

2.1.2 Kurze Pathogenese der Arteriosklerose und ihrer Folgeerkrankungen

Das vaskuläre Gefäßendothel übernimmt eine Vielzahl von Aufgaben in der Gefäßphysiologie. So fungiert es unter anderem als Permeabilitätsbarriere und Anheftungsstelle für Leukozyten. Es hat jedoch auch sekretorische Funktionen und dient als Lieferant von vasoaktiven Faktoren, Wachstumsfaktoren und Makromolekülen der extrazellulären Gefäßwandmatrix. Dieses empfindliche Gleichgewicht an vasoprotektiven Faktoren kann durch eine Reihe an äußeren Einflüssen gestört werden (Tabelle 1). Allen gemein ist, dass durch eine Störung der intrazellulären Homöostase der Endothelzellen eine Überexpression von Adhäsionsmolekülen und chemoattraktiven Proteinen ausgelöst wird, die zur Aktivierung weiterer Zellsysteme, z.B. Monozyten, glatter Muskelzellen (Smooth Muscle Cells, SMC) und Fibroblasten führt (Verletzungshypothese der Atherogenese nach Ross [192-196]).

Physikalische, chemische und biologische Auslöser einer Endothelzellverletzung	
<i>Physikalische Noxen:</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Turbulenter Blutfluß (Shear-Stress) [188, 189] • Angioplastieverfahren [17]
<i>Chemische Noxen:</i>	<ul style="list-style-type: none"> • oxLDL [18, 246] • Homozystein [33] • Hyperglykämie (Diabetes) und AGE [203]
<i>Biologische Noxen:</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Bakterielle Toxine (Chlamydia pneumoniae [154, 199]) • Viren (Herpes simplex 1 [158], Zytomegalievirus [159]) • Immunologische Reaktionen [206]

Tabelle 1: Typische physikalische, chemische und biologische Noxen mit direkter oder indirekter Schädigung des Gefäßendothels (Verletzungshypothese nach Ross [192-196]).

Die makro- und mikromolekulare Pathogenese der Arteriosklerose und ihrer Komplikationen wird im Folgenden kurz dargestellt.

2.1.2.1 Makromolekulare Pathogenese

Unter dem Einfluss bestimmter Noxen (Zigarettenrauchen, Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus) kommt es zu einer Veränderung der Endothelfunktion mit Verminderung der NO-Produktion. In der Folge führt die gesteigerte Durchlässigkeit des Endothels zu einer vermehrten Ablagerung von Lipiden, überwiegend LDL, in der Intima. Die durch chronische

Stimuli aktivierte Endothelzelle bildet vermehrt Adhäsionsproteine auf ihrer Oberfläche mit der konsekutiven Adhäsion monozytärer und lymphozytärer Zellen am Endothel. Es folgt die Migration der Zellen in die subendotheliale Matrix der Intima (Abbildung 1A, Abbildung 3). Die Stimulation von Makrophagen durch bestimmte Wachstumsfaktoren (z.B. M-CSF) führt zu einer Überexpression des Scavenger-Rezeptors [125], der es den Makrophagen ermöglicht, in der Zellwand angereichertes oxidiertes LDL (oxLDL) verstärkt aufzunehmen. Die Folge ist die Bildung so genannter Schaumzellen. Zusätzlich wird die Zellteilung der Makrophagen überproportional stark angeregt. Es entstehen große Zellkonglomerate von Makrophagen in der Intima, beladen mit phagozytiertem lipidhaltigem Material. Makroskopisch bildet sich eine weiche, gelbliche Plaque in der Gefäßwand, der sog. „fatty streak“ (Abbildung 1B). Es handelt sich um ein potentiell reversibles Stadium der Atherogenese.

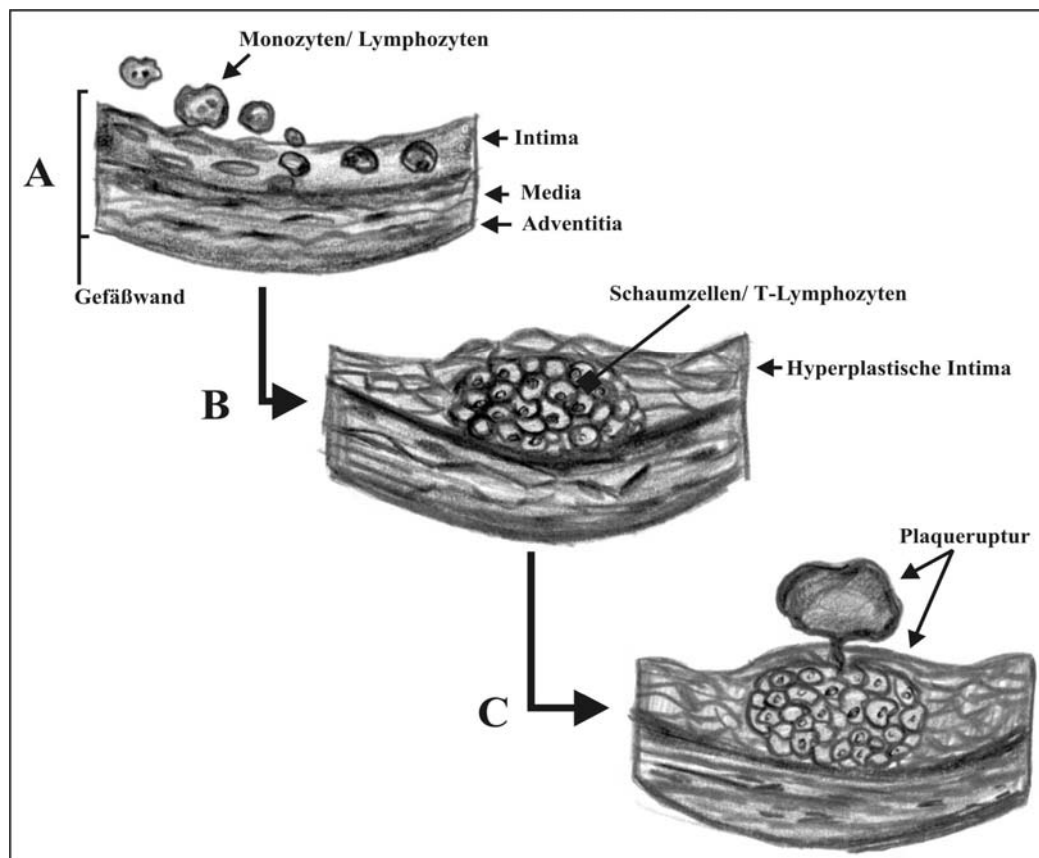


Abbildung 1: Kurz gefasste Pathogenese der Arteriosklerose und Plaqueruptur. A: Zellen des lymphatischen Systems adhären am chronisch stimulierten Gefäßendothel und migrieren in die subendotheliale Matrix. B: Durch massive Zellteilung und Phagozytose lipidhaltiger Partikel entstehen Konglomerate von Schaumzellen. Es entsteht der sog. „fatty streak“. Zusätzlich produzieren T-Zellen Wachstumsfaktoren und stimulieren die verstärkte Bildung von Makroproteinen der Gefäßwandmatrix sowie die Proliferation glatter Muskelzellen. Dies führt zu einer Intimahyperplasie und Reduktion des Gefäßlumens. Die Plaque wird zunächst geschützt durch eine fibröse Kapsel aus kollagenen Fasern. C: Wachstumsfaktoren unterdrücken die weitere Produktion von Matrixproteinen, Schaumzellen setzen proteolytische Enzyme frei. Die fibröse Kapsel der Plaque weicht auf, es folgt die Plaqueruptur. Die nun freiliegenden Bestandteile der subendothelialen Matrix wirken hoch thrombogen, es entsteht ein Gefäßthrombus mit konsekutivem Gefäßverschluss [136, 137].

Aktivierete T-Lymphozyten bilden Wachstumsfaktoren, die zum einen die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen, zum anderen die verstärkte Produktion von Makroproteinen der Gefäßwandmatrix stimulieren. Dies führt zu einer Hyperplasie der Gefäß-Intima mit konsekutiver Reduktion des Gefäßquerschnittes. In diesem Stadium ist die Plaque durch eine fibröse Kapsel vor dem Blutstrom und Scherkräften geschützt. Der bedeckende Endothelzellmonolayer ist unversehrt.

Im Endstadium der Atherogenese wird die Synthese von Matrixproteinen gestoppt. Zusätzlich beginnen Schaumzellen mit der Sekretion von Kollagenasen, welche sowohl die subendotheliale Matrix als auch die fibröse Kapsel der Plaque erweichen. Scherkräfte des Blutstromes, ausgelöst durch die nun nicht mehr laminare Strömung im querschnittsreduzierten Gefäß, können zu einer Ruptur der Plaque führen (Abbildung 1C). Dadurch liegen die hoch thrombogenen Bestandteile der Gefäßmatrix frei und die Gerinnungskaskade wird aktiviert [69]. Dies wird zusätzlich verstärkt durch eine vermehrte Produktion des prokoagulatorischen „Tissue Factor“ (TF). Der nun gebildete Thrombus führt zu einem akuten Gefäßverschluss.

Die Komplikationen der Arteriosklerose stellen vor allem der akute Myokardinfarkt, der akute zerebrovaskuläre Insult sowie der akute periphere Gefäßverschluss dar. Diese Komplikationen sind jedoch selten bedingt durch eine langsam progrediente Lumenreduktion der Gefäßwand im Rahmen der Atherogenese. Die Mehrzahl der akuten Gefäßverschlüsse entsteht in Gefäßabschnitten mit einer arteriosklerotischen Lumenreduktion von weniger als 50% des Ausgangslumens [216]. Hauptursache für den akuten Gefäßverschluss stellt vielmehr die akute Thrombose auf der Grundlage einer Ruptur eines atheromatösen Plaques dar [68].

2.1.2.2 Mikromolekulare Pathogenese

Die Vorgänge der Atherogenese werden durch ein kompliziertes Netzwerk an chemoattraktiven Proteinen (sog. Zytokinen), Wachstumsfaktoren, Oberflächenmarkern und Proteinasen gesteuert (Abbildung 2). Nach der Verletzungshypothese nehmen dabei vaskuläre Endothelzellen eine zentrale Stellung ein. Die Schädigung der Endothelzellen durch mechanische, chemische oder biologische Noxen (Tabelle 1) bedingt eine verstärkte Produktion spezifischer Zytokine, allen voran des „Monocyte Chemoattractant Protein-1“ (MCP-1) [83, 87], welches chemotaktisch auf Monozyten und Lymphozyten wirkt. Gleichzeitig kommt es zu einer verstärkten Produktion spezifischer Adhäsionsmoleküle, wie E- und P-Selectin [64, 65], VCAM-1 [121] und ICAM-1, welche die Adhäsion und Migration von aktivierten Monozyten und Lymphozyten begünstigen (Abbildung 3). Die Bedeutung

dieser Faktoren für die Atherogenese wurde durch tierexperimentelle Versuche an Minusvarianten ausführlich dargelegt (Tabelle 2).

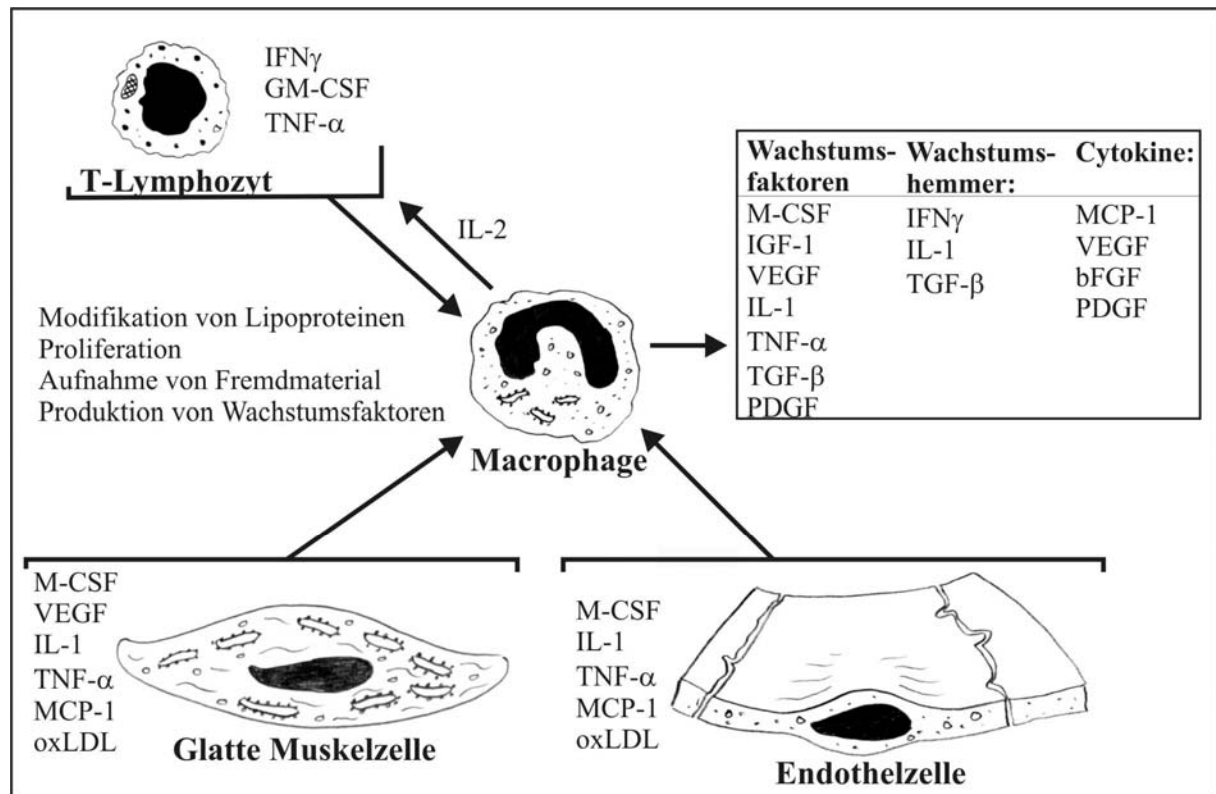


Abbildung 2: An der Atherogenese beteiligte Zellsysteme. Die Interaktion zwischen den einzelnen Zellfamilien wird durch eine Vielzahl an Zytokinen und Wachstumsfaktoren gesteuert. Eine wesentliche Rolle spielt dabei das Zytokin MCP-1, dass vor allem für die Akquisition von leukozytären Zellerivaten aus dem Blutstrom nach Schädigung des Gefäßendothels verantwortlich ist [192-196].

Faktor	Funktion	Resultat Minusvariante	Ref.
P-, E-Selectin	Rollen (Monozyten, Lymphozyten)	Reduktion „fatty streak“	[65]
P-Selectin	Rollen (Monozyten, Lymphozyten)	Reduktion Atherome	[64]
VCAM-1	Feste Adhäsion	Reduktion Plaque	[121]
MCP-1	Zytokin (Monozyten, Lymphozyten)	Reduktion Atherome	[83, 87]

Tabelle 2: Bedeutung wichtiger Zytokine und Adhäsionsmoleküle für die Atherogenese. Ergebnisse tierexperimenteller Untersuchungen an Minusvarianten.

Für eine Vielzahl der in Tabelle 1 dargelegten Noxen konnte mittlerweile eine direkte Aktivierung der Expression der in Tabelle 2 genannten Zytokine und Adhäsionsmoleküle nachgewiesen werden, wodurch die mikromolekularen Vorgänge der Atherogenese weiter entschlüsselt werden konnten.

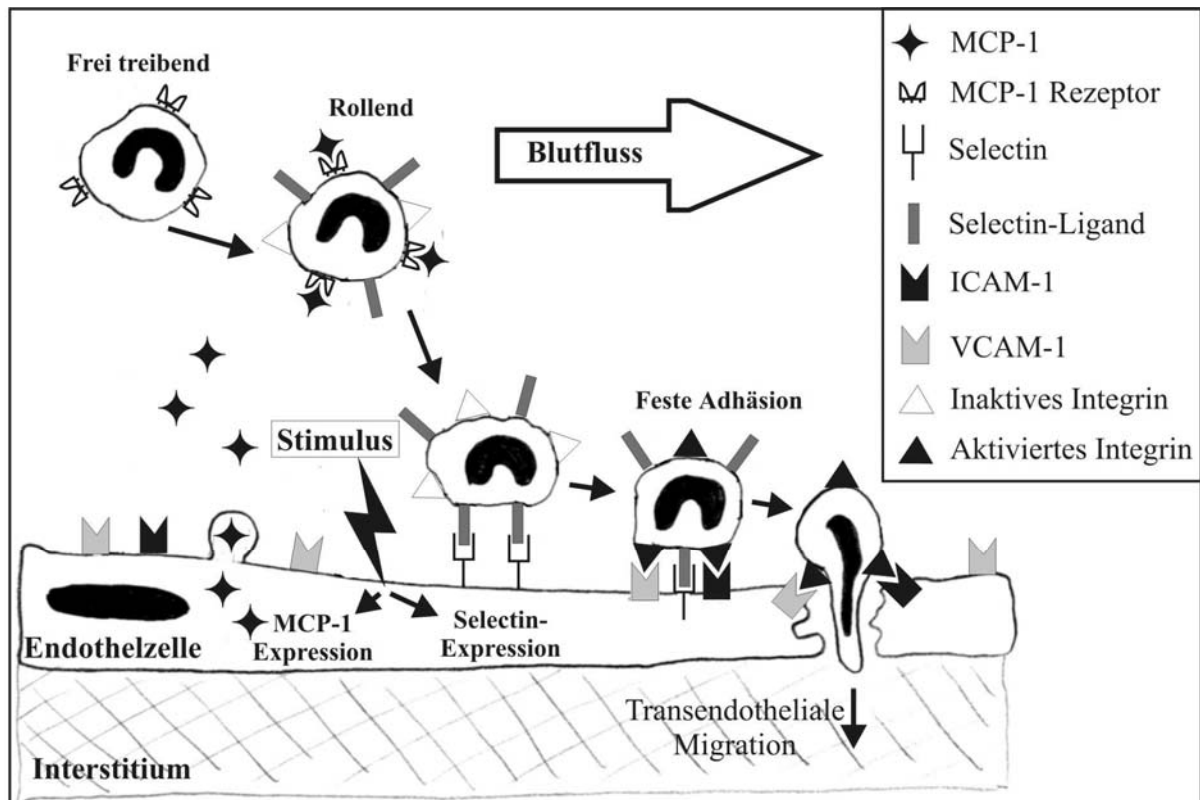


Abbildung 3: Mechanismus der Rekrutierung von Blutmonozyten durch vaskuläre Endothelzellen im Rahmen der Atherogenese. Ausgelöst durch einen endothelschädigenden Reiz beginnt die Endothelzelle mit der verstärkten Expression von chemotaktischen Proteinen (MCP-1) und von leukozytenspezifischen Oberflächenmarkern. MCP-1 aktiviert frei treibende Blutmonozyten, welche daraufhin an Selectine der Zelloberfläche binden. Die zusätzliche Bindung an Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) führt zu einer festen Verbindung mit der Zielzelle. Es folgt die transendotheliale Migration in die subendotheliale Gefäßmatrix [126].

Die am besten untersuchten Noxen stellen sicherlich die „Lipoproteine niedriger Dichte“ (LDL) dar. Die Zusammenhänge zwischen erhöhten Serumcholesterinspiegeln, erhöhten LDL-Werten und der Atherogenese werden seit Jahrzehnten intensiv erforscht. Inzwischen ist bekannt, dass LDL-Partikel, welche z.B. im Rahmen einer alimentären oder familiären Hypercholesterinämie, in der Gefäßwand akkumulieren, oxidativ verändert werden [18, 246]. Diese modifizierten Lipide stellen einen starken Reiz für die Expression von P-Selectin, VCAM-1 und MCP-1 durch vaskuläre Endothelzellen dar. Dies führt zu der beschriebenen Aktivierung von lymphozytären Zelllinien des Blutstromes und damit zur Initiierung der Atherogenese.

Ähnliche Wirkungsbeziehungen konnten auch für weitere Noxen identifiziert werden. So wird beispielsweise die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 durch hämodynamischen Stress induziert [233, 240], was einen ersten Erklärungsansatz für die Tatsache liefert, weshalb arteriosklerotische Läsionen bevorzugt an Stellen des Gefäßbaumes mit verstärkter Belastung durch turbulente Strömungen, z.B. Gefäßaufzweigungen, entstehen. Ähnliche

Ergebnisse konnten für eine Reihe weiterer Genprodukte gefunden werden. So induzieren biomechanische Kräfte (Shear-Stress) *in vitro* auch die Expression von MCP-1 und PDGF [10, 11], COX-2 [79] sowie VEGF [48] in vaskulären Endothelzellen (siehe Abschnitt 2.2).

Trotz dieser Erkenntnisse bleiben die wichtigen intrazellulären Vorgänge, welche zu einer verstärkten Expression der proatherogenen Faktoren führen, in weiten Teilen unklar. Als ersten Erfolg muss die Entdeckung der verletzungsbedingten Aktivierung spezifischer intrazellulärer Transkriptionsfaktoren gewertet werden. Transkriptionsfaktoren stehen am Ende der intrazellulären Signalübertragungskette und bewirken im Zellkern eine gesteigerte Transkription und Expression spezifischer Genprodukte, welche entsprechende Bindungsstellen in der Promotorregion der zugehörigen Gensequenz besitzen.

Der Nachweis einer Aktivierung *in vitro* und *in vivo* durch atherogene Faktoren gelang mittlerweile für das Protoonkogen *c-fos* [123, 212, 213], den „Nuclear Factor κ B“ (NF- κ B) [139] sowie das „Early Growth Response Gene-1“ (EGR-1) [116-119]. Diese Erkenntnis gewann jedoch erst an Bedeutung, als eine Wirkungsbeziehung zwischen aktivierten Transkriptionsfaktoren und der verstärkten Synthese proatherogener Zytokine und Adhäsionsmoleküle im Verletzungsmodell nachgewiesen werden konnte. So konnte in der Promotorregion der Gene für E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 (transkriptionell aktive Form des Protoonkogens *c-fos* (siehe Abschnitt 2.3.8.2) [102-104, 106, 152, 183], nachgewiesen werden.

Insbesondere NF- κ B spielt für die Expression weiterer an der Atherogenese beteiligter Genprodukte eine wichtige Rolle (Tabelle 3). Gerade letzterem konnte in den letzten Jahren eine zentrale Rolle in der Atherogenese zugeordnet werden, da es an der verstärkten Expression einiger wichtiger Proteine mit zentraler Bedeutung für die Atherogenese, allen voran MCP-1 [249], welches eines der wichtigsten proatherogenen Chemokine darstellt, beteiligt ist. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für EGR-1, welches z.B. an der Regulation der Expression von PDGF beteiligt ist [153].

Durch diese Erkenntnis bietet sich erstmals die Möglichkeit, die intrazellulären Signalübertragungswege im Rahmen der Atherogenese mit modernen, molekularbiologischen Methoden durch gezielte Blockade bekannter Signalübertragungskaskaden genauer zu erforschen.

Genprodukt	Transkriptionsfaktor	Zellsystem	Referenz
E-Selectin	NF- κ B	Vaskuläre Endothelzellen	[102-104, 152]
	AP-1	Vaskuläre Endothelzellen	[102-104, 152]
VCAM-1	NF- κ B	Vaskuläre Endothelzellen	[106]
	AP-1	Vaskuläre Endothelzellen	[102-104, 152]
ICAM-1	NF- κ B	Vaskuläre Endothelzellen	[183]
	AP-1	Vaskuläre Endothelzellen	[102-104, 152]
PDGF	EGR-1	Vaskuläre Endothelzellen	[153]
TNF-α	NF- κ B	Leukozyten	[14]
	NF- κ B	Leukozyten	[12]
M-CSF	NF- κ B	Vaskuläre Endothelzellen	[44]
MCP-1	NF- κ B	Vaskuläre Endothelzellen	[249]
TF	NF- κ B	Monozyten	[143]
	AP-1	Monozyten	[143]

Tabelle 3: An der Atherogenese beteiligte Zytokine und Adhäsionsmoleküle: Für die dargestellten Transkriptionsfaktoren konnte eine direkte Wirkung auf die verstärkte Produktion der spezifischen Genprodukte in verschiedenen, an der Atherogenese beteiligten Zellsystemen nachgewiesen werden.

2.1.3 Die fortgeschrittene Arteriosklerose: Pathogenese der Restenose

Im fortgeschrittenen Stadium der generalisierten Arteriosklerose mit multiplen Gefäßverengungen findet sich der Patient insoweit in einer ausweglosen Situation, als dass die Mehrzahl der arteriosklerotischen Läsionen bereits ein irreversibles Stadium erreicht hat. Eine pharmakologische Therapie dient allenfalls einer Verzögerung der Progression und Linderung der Akutsymptomatik. Dennoch kann der akute Gefäßverschluss sowie die klinisch symptomatische arteriosklerotische Gefäßverengung durch perkutane Angioplastieverfahren in der Regel gut therapiert werden. Hierzu werden mittels röntgengestützter Katheterverfahren kleine und kleinste Ballons an die Engstelle im Gefäß gebracht und durch Inflation derselben die Engstelle beseitigt. Diese Methode ist oftmals die letzte Alternative, um den drohenden Herztod oder die ischämie-bedingte Amputation einer Extremität zu verhindern. Die Verfahren sind mittlerweile gut etabliert und werden weltweit in großer Zahl durchgeführt. Die initial guten Ergebnisse werden jedoch getrübt durch hohe Raten an Restenosen innerhalb der ersten 6 Monate nach Therapie (epidemiologische Daten siehe Abschnitt 2.1.1).

Da bei den Verfahren ein nicht unerhebliches Trauma des meist noch intakten Endothels ausgelöst wird, liegt die Vermutung nahe, dass bei dieser Form der proliferativen Gefäßverengung ähnliche Pathomechanismen eine Rolle spielen, wie bei der initialen Atherogenese nach der Verletzungshypothese. Der bisherige Kenntnisstand über die Pathogenese der Restenose wird im Folgenden kurz dargestellt.

2.1.3.1 Mechanismen der Restenose

Im Rahmen einer Ballon-Angioplastie kommt es zu einer Überdehnung der Gefäßwand mit konsekutivem Einriss des Endothels, Ruptur der Lamina interna sowie einer Dissektion der Lamina Media und Adventitia [59, 114]. Die initiale Erweiterung des Gefäßlumens kann durch verschiedene Faktoren postinterventionell reduziert werden (Abbildung 4):

1. Elastische Reformation:

Die arterielle Gefäßwand ist reich an glatten Muskelzellen und elastischen Fasern. Diese bewirken trotz der Überdehnung im Rahmen der Angioplastie ein erneutes Zusammenziehen des Gefäßes innerhalb weniger Minuten nach dem Eingriff. Dadurch werden bis zu 40% der initialen Erweiterung des Gefäßlumens zunichte gemacht [187]. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, kann die adjuvante Einlage einer Gefäßstütze (Stent) erwogen werden, wodurch die akute elastische Reformation signifikant reduziert werden kann [93].

2. Reorganisation des Thrombus:

Bedingt durch die Angioplastie wird das schützende Endothel über dem Plaque zerstört und die thrombogene subendotheliale Matrix bekommt Kontakt mit dem Blutstrom. Dies bewirkt eine lokale Blutgerinnung mit Bildung eines Plättchenthrombus [38]. Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch die aktivierten Plättchen bewirkt eine Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten, was zu einer fibro-vaskulären Organisation des Thrombus führen kann [34-37].

3. Bildung einer Neointima:

Bedingt durch Proliferation und Hyperplasie verbliebener Zellen. Ausführliche Darstellung unter Punkt 2.1.3.2.

4. *Remodelling des Gefäßes:*

Im Gegensatz zur Bildung einer Neointima handelt es sich bei dem arteriellen Remodelling nach Angioplastie nicht um einen proliferativen Vorgang mit aktiver Vermehrung der Zellmatrix. Vielmehr bedingt eine strukturelle Reorganisation der Protein- und Zellmatrix einen Querschnittsverlust des überdehnten Gefäßes [150].

Die postinterventionelle Restenose ist immer ein Produkt der Wirkung aller vier beschriebenen Mechanismen, wobei die jeweilige Ausprägung interindividuell sehr unterschiedlich ausfallen kann. Von Interesse ist insbesondere die neointimale Proliferation, da Hinweise existieren, dass ihre Pathogenese der Atherogenese in weiten Teilen ähnelt oder sich überschneidet [57, 175].

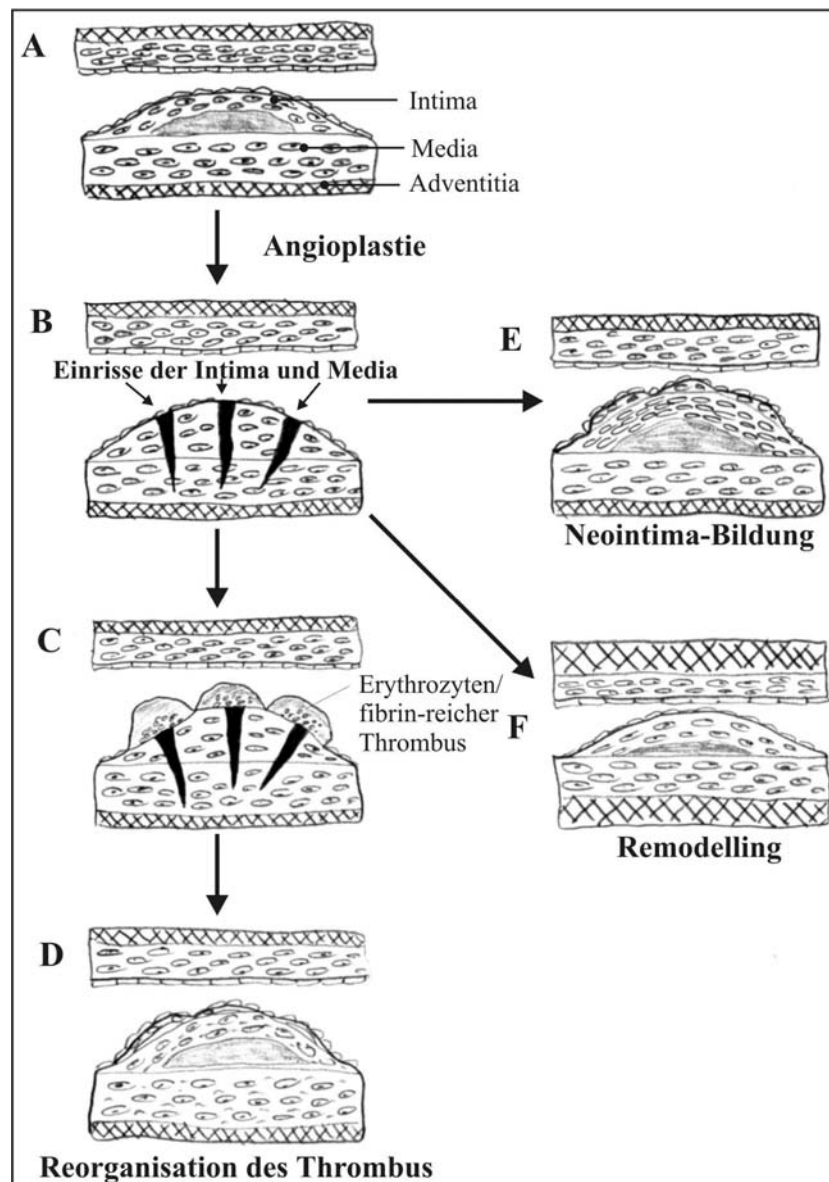


Abbildung 4: Pathomechanismen der Restenose [17].

2.1.3.2 Pathobiochemie der neointimalen Proliferation

Die mechanische Angioplastie führt zu einer großflächigen Abtragung des Endothels mit Freilegung der darunter liegenden subendothelialen Gefäßmatrix, bestehend aus Makroproteinen wie Kollagen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Diese ausgeprägte Verletzung des Gefäßendothels zieht, ähnlich wie bei der Atherogenese, eine initial entzündliche Reaktion mit Aktivierung monozytärer und lymphozytärer Zelllinien nach sich [7, 20], was sich zusätzlich bestätigen lässt durch den nachweisbaren Anstieg des Serumspiegels des Entzündungsmarkers C-reaktives Protein (CRP) [32].

In der Folge kommt es durch eine Aktivierung von glatten Muskelzellen und Fibroblasten zu deren Migration und einer verstärkten Produktion von Makromolekülen der Gefäßmatrix, ähnlich der Atherogenese [7]. Das geschädigte Gefäßendothel proliferiert ebenfalls und bedeckt den Defekt. Diese Vorgänge dauern beim Menschen bis zu 3 Monate [86]. An der Aktivierung der genannten Zelllinien sind dabei dieselben Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle beteiligt wie bei der Atherogenese [173]. Somit beginnen sowohl Atherogenese als auch die neointimale Proliferation nach Angioplastie mit einer entzündlichen Aktivierung von Monozyten und Lymphozyten.

Der genaue Pathomechanismus, der zur Aktivierung von leukozytären Zelllinien führt, war lange Zeit unklar. Erst vor kurzem ist es gelungen, erste Hinweise für einen der Atherogenese ähnlichen Mechanismus zu finden. So lässt sich im Serum von Patienten nach koronarer Angioplastie ein Anstieg des proatherogenen Zytokins MCP-1 nachweisen [42]. Zusätzlich existiert eine Korrelation zwischen der Stärke des Anstiegs der Serumspiegel von MCP-1 und dem Risiko einer postinterventionellen Restenose [97]. Diese Ergebnisse ließen jedoch noch keine endgültigen Rückschlüsse auf die direkte Beteiligung von MCP-1 an der postinterventionellen neointimalen Proliferation zu. Erst vor kurzem gelang es im Tierversuch, diesen Nachweis durch direkte Blockade von MCP-1 [75] bzw. seines monozytären Rezeptors (CCR2) [100], zu führen. In beiden Fällen bedingt die Blockade eine reduzierte Proliferation von glatten Muskelzellen und eine signifikant geringere Ausprägung der Neointima.

Aber auch für andere wichtige Faktoren der Atherogenese konnte mittlerweile eine Beteiligung an der Bildung einer Neointima nach Angioplastie gezeigt werden (Tabelle 4). So gelang z.B. der Nachweis einer verstärkten Expression des für die Atherogenese sehr wichtigen Transkriptionsfaktors NF- κ B in Carotiden der Ratte nach Angioplastie [8, 31], aber auch in humanen Endothelzellen durch Shear-Stress [94]. Ebenfalls nachgewiesen werden

konnte eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors AP-1 (c-fos) [102-104] sowie von EGR-1 [116-119, 217].

Faktor	Funktion	Ergebnis	Spezies	Referenz
MCP-1	Zytokin	Erhöhte Plasmaspiegel von MCP-1 nach PTCA	Mensch	[42]
		Positive Korrelation zw. erhöhtem MCP-1 Spiegel nach PTCA und Risiko der Restenose	Mensch	[97]
		Blockade von MCP-1 führt zu verringerter neointimaler Proliferation	Ratte	[75]
		Blockade des MCP-1 Rezeptors CCR2 führt zu verringerter neointimaler Proliferation	Primaten	[100]
NF-κB	Transkriptionsfaktor	Blockade von NF-κB führt zu verringerter Expression von MCP-1 und verringerter neointimaler Proliferation	Kaninchen	[31]
		Blockade von NF-κB führt zu verminderter Proliferation von SMC und reduzierter neointimaler Proliferation	Ratte	[8]
AP-1	Transkriptionsfaktor	Erhöhte Expression in SMC nach Angioplastie	Ratte	[103, 104]
EGR-1	Transkriptionsfaktor	Erhöhte Expression unter Shear-Stress in HUVEC	Mensch	[116-119, 217]

Tabelle 4: Nachgewiesene Beteiligung proatherogener Faktoren an der Bildung einer Neointima nach Angioplastie.

Ähnlich wie bei der Atherogenese bleiben jedoch die intrazellulären Signalübertragungswege, welche die gesteigerte Expression der genannten Faktoren bewirken, weiterhin unklar. Problematisch ist zusätzlich, dass die Mehrzahl der genannten Nachweise bislang ausschließlich im Tiermodell erfolgte und die Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen noch bewiesen werden muss.

2.2 Biomechanische Endothelzellverletzung: Shear-Stress und Early-Gen Expression

Die Atherogenese ist ein multifaktorieller Prozess und wird durch eine Vielzahl von Risikofaktoren beeinflusst (Tabelle 1). Die mechanische Belastung der Endothelzellen durch den Blutstrom nimmt jedoch insofern eine Sonderstellung unter den Risikofaktoren ein, als dass sie einen ubiquitären Reiz darstellt, deren Wirkung in jeder Phase der Atherogenese vorhanden und beteiligt ist [247]. Dies zeigt sich u.a. in der Tatsache, dass arteriosklerotische Läsionen bevorzugt an Stellen des Gefäßbaumes mit verstärkter mechanischer Belastung durch turbulenten Blutfluss (sog. Shear-Stress) entstehen, wie z.B. an Gefäßaufzweigungen [55, 56]. Aber auch auf die Progression und Komplikation der arteriosklerotischen Plaque hat die biomechanische Belastung der Endothelzellen einen wesentlichen Einfluss, sei es als Auslöser der Plaqueruptur oder im Rahmen der Angioplastie als Auslöser einer neointimalen Proliferation der zellulären Gefäßmatrix. Sie hat somit eine Schlüsselfunktion in der Atherogenese weshalb die intrazellulären Vorgänge nach mechanischer Endothelzellverletzung intensiv erforscht werden.

Die biomechanische Belastung der Endothelzellen im Zusammenhang mit der Arteriosklerose und ihrer Folgeerkrankungen muss bezüglich Art, Stärke, Dauer und der unmittelbaren Folgen der Krafteinwirkung auf das Endothel (Zerstörung des Monolayers) prinzipiell in zwei Kategorien eingeteilt werden. Zum einen die stetige Belastung durch turbulente Strömungen des Blutflusses (Shear-Stress), zum anderen in kurzzeitige vertikale Scherkräfte mit Zerstörung des Endothelzellmonolayers im Rahmen der Angioplastie. Beide Arten des biomechanischen Stresses rufen sowohl sekretorische als auch proliferative Reaktionen des Endothels hervor [39, 61]. Bisher wurden jedoch vor allem die physiologischen Reaktionen der Endothelzelle auf Strömungsreize intensiv untersucht, wohingegen die intrazellulären Vorgänge nach abrupter Zerstörung des Endothels noch weitgehend unbekannt sind. Die derzeit gesicherte Datenlage wird im Folgenden kurz dargestellt.

2.2.1 Shear-Stress als Regulator der Gen-Expression in vaskulären Endothelzellen

Die Untersuchung der physiologischen Reaktion von Endothelzellen auf Shear-Stress erfolgt vorzugsweise *in vitro*, wofür verschiedene Modelle zur Simulation des Blutstromes entworfen wurden [39, 116-119, 169, 184, 185]. Allen ist gemein, dass *in vitro* gezüchtete Endothelzellmonolayer in einer Strömungskammer bestimmten Strömungsformen ausgesetzt

werden. Dabei unterscheidet man zwischen stetiger laminarer Strömung, laminaren pulsierenden Strömungen sowie einer turbulenten Strömung. Die Reaktionen der Endothelzellen sind stark abhängig von der Strömungsform, wobei stetige laminare und pulsierende laminare Strömungen ähnliche Einflüsse auf die endotheliale Genexpression haben, sich diesbezüglich aber wiederum beinahe vollständig von der turbulenten Strömung unterscheiden [39, 101].

2.2.1.1 Shear-Stress induzierbare Proteine

Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Genprodukten isoliert, deren Expression durch Shear-Stress induziert wird (Tabelle 5). Dabei ist die Art und Funktion der Genprodukte abhängig von der induzierenden Strömungsform. Laminare Strömungen induzieren bevorzugt antiatherogene Gene, wie iNOS, COX-2 und Mangan-Superoxiddismutase [229, 230]. Dahingegen führen turbulente Strömung bevorzugt zur Expression von proatherogenen Faktoren wie bFGF [145], ICAM-1 [156, 237], VCAM-1 [167] und MCP-1 [212, 213]. Diese Faktoren sind in unterschiedlicher Ausprägung auch an der Regulation der Vorgänge der Atherogenese beteiligt. Diese Ergebnisse unterstreichen die tragende Rolle der biomechanischen Endothelzellverletzung für die Atherogenese und rechtfertigen die Verwendung von in-vitro Simulationsmodellen zur Erforschung der intrazellulären Signalübertragung nach Endothelzellverletzung.

Funktion	Faktor	Referenz
Vasoaktivität	iNOS	[164, 184, 185]
	CNP (C-Typ des natriuretischen Peptids)	[41, 169]
Wachstumsfaktoren	PDGF-A	[116-119]
	PDGF-B	[188, 189]
	bFGF	[145]
Adhäsionsmoleküle	ICAM-1	[156, 237]
	VCAM-1	[167]
Koagulation	COX-2	[229, 230]
Antioxidantien	Mn-SOD	[229, 230]
Zytokine	MCP-1	[212, 213]

Tabelle 5: Übersicht über einige der derzeit bekannten Shear-Stress induzierbaren Gene.

2.2.1.2 Shear-Stress induzierbare Transkriptionsfaktoren

Die Expression spezifischer Genprodukte wie in Tabelle 5 wird intrazellulär gesteuert durch Transkriptionsfaktoren. Analog zu den Erkenntnissen über Shear-Stress induzierbare Proteine konnten mittlerweile eine Reihe von Transkriptionsfaktoren isoliert werden, deren Aktivität durch Shear-Stress induziert wird (Tabelle 6). Es finden sich darunter die klassischen Transkriptionsfaktoren c-fos, EGR-1 und NF- κ B, denen auch im Rahmen der Atherogenese eine entscheidende Bedeutung zugemessen werden konnte.

AP-1, ein Homo- oder Heterodimer aus den Protoonkogenen c-fos und c-jun (siehe Abschnitt 2.3.8.2) bindet spezifisch an DNA-Sequenzen (TRE, CRE), welche in der Promotorregion einiger Shear-Stress induzierbarer Gene gefunden werden konnten [55, 56, 178, 179]. Bislang konnte jedoch eine AP-1 abhängige Regulation der Genexpression durch mechanischen Stress nur für MCP-1 und VCAM-1 sicher nachgewiesen werden [123, 212, 213].

Transkriptionsfaktor	Induziertes Genprodukt	Referenz
AP-1 (FOS/JUN)	MCP-1	[212, 213]
	VCAM-1	[123]
NF-κB	TF	[138, 139]
	PDGF-B	[188, 189]
EGR-1	PDGF-A	[116-119]

Tabelle 6: Shear-Stress induzierbare Transkriptionsfaktoren und zugehörige induzierte Genprodukte [178, 179].

Auch die DNA-Bindungskapazität von NF- κ B wird durch Shear-Stress induziert und nimmt bereits in der ersten Stunde nach Beginn der Exposition deutlich zu [132]. Dies führt zur gesicherten Expression der proatherogenen Faktoren PDGF-B [188, 189] und TF [138, 139]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für EGR-1 [116-119].

Bedeutend war die Entdeckung einer spezifischen Gensequenz in der Promotorregion der Sequenz des humanen PDGF-B durch Resnick et al. [188, 189], das sog. „Shear-Stress Response element“ (SSRE). Diese Sequenz ist entscheidend für die Shear-Stress induzierte Expression von PDGF-B [117]. Es konnte gezeigt werden, dass an dieser Sequenz bevorzugt der Transkriptionsfaktor NF- κ B bindet [119]. Damit konnte zum ersten Mal in der Sequenz eines humanen Genes ein Element nachgewiesen werden, welches für die selektive Expression dieses Genes durch mechanische Stimuli unmittelbar verantwortlich ist.

2.2.1.3 Shear-Stress induzierte Mechanotransduktion

Die Aktivierung der Genexpression durch einen externen Stimulus bedarf der Übertragung des spezifischen Reizes über die Zellmembran auf intrazelluläre Signalkaskaden, welche die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren bedingen. Diese Signalübertragung beinhaltet die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren, Botenstoffen (sog. Second Messenger) und Proteinkinasen. Mittlerweile ist bekannt, dass eine große Zahl an Faktoren mit den genannten Eigenschaften durch Shear-Stress aktiviert wird, u.a. Kalium-Kanäle [170], G-Proteine [88, 89], intrazelluläres Calcium [5], cAMP [186], cGMP [165, 166], Inositol-Triphosphat [163], Proteinkinase C [127], mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) wie ERK und JNK [134, 135, 236] sowie Protein-Tyrosin Kinasen wie FAK [108, 109] (ausführliche Beschreibung der intrazellulären Signalübertragung siehe Abschnitt 2.3).

Obwohl es Hinweise gibt, dass all die genannten Faktoren an der Umsetzung mechanischer Stimuli in ein bestimmtes Muster der Genexpression beteiligt sind, ist weiterhin nicht geklärt, wie und in welcher Reihenfolge sie untereinander verkettet sind. Insbesondere die Frage, welche Rezeptoren den mechanischen Stimulus aufnehmen und in eine Reaktion der Zelle überführen ist unklar. Unter den in Frage kommenden Rezeptoren finden sich membranständige Ionenkanäle, G-Protein gebundene Rezeptoren, Tyrosin-Kinase gebundene Rezeptoren sowie Integrine [55, 109, 178, 179]. Aber auch Veränderungen des Zytoskelettes und Einflüsse von gestörten Zell-Zell Verbindungen scheinen an der Aktivierung der Signalübertragungskaskade nach mechanischer Stimulation beteiligt zu sein [107].

Integrine sind heterodimere transmembrane Glykoproteine, welche als Adhäsionsmoleküle an der Interaktion zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix beteiligt sind. Sie spielen unter anderem eine Rolle in der Zelladhäsion, -migration, -proliferation und -differenzierung [204]. Sie sind beteiligt an der flussinduzierten Freisetzung von NO [155] und könnten somit auch für die Shear-Stress induzierte Signalübertragung von Bedeutung sein. Neben den Integrinen könnten auch sog. Caveolae, spezialisierte Domänen der Plasmamembran, reich an Cholesterol, welche an der transmembranen Signalübertragung beteiligt sind, eine Rolle spielen [26]. Ein zentraler Bestandteil der Caveolae ist das Protein Caveolin-1, welches mit einer Reihe von Signalproteinen, u.a. G-Proteinen, PKC und ERK-1/ -2, interagiert [51]. Chronische Belastung der Zellen durch Shear-Stress führt zu einer vermehrten Bildung von Caveolae durch Translokation von Caveolin-1 aus dem Golgi-Apparat zur Plasmamembran mit konsekutiver Aktivierung der MAP-Kinase ERK [26]. Weitere mögliche Mechano-Rezeptoren stellen mechanosensitive Kalium- und Calcium-Kanäle dar [160]. Insbesondere Kalium-Kanäle scheinen an der Mechanotransduktion wesentlich beteiligt zu sein [28], da

eine Blockade dieser Kanäle die Shear-Stress induzierte Bildung von NO [238] und TGF- β [165, 166] wirkungsvoll unterbinden kann. Es gibt jedoch inzwischen eindeutige Hinweise, dass für die Mechanotransduktion die Aktivierung membranständiger G-Proteine einen der wesentlichsten Schritte darstellt [88, 89, 108, 109]. So wird durch Blockade membranständiger G-Proteine die Shear-Stress induzierte Steigerung der Aktivität der ras-GTPase [88, 89] sowie die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/ -2 [113] wirkungsvoll gehemmt.

Das im Zusammenhang mit Shear-Stress am Besten untersuchte Proteinkinase-System stellt das System der MAP-Kinasen dar [90, 108, 109, 222, 223]. In diesem System von Serin/Threonin-Kinasen findet sich eine Vielzahl von verschiedenen Proteinkinasen, die insbesondere für die Regulation der Zellproliferation und des Zelltodes eine große Rolle spielen (siehe Abschnitt 2.3.7). Die interessantesten Mitglieder der Familie stellen die MAP-Kinasen ERK-1 und -2, sowie die JN-Kinasen (JNK) dar. Während bei ersteren bekannt ist, dass sie eine Reihe von Faktoren aktivieren, die auch im Rahmen der Atherogenese eine Rolle spielen (z.B. c-fos [108, 109, 178, 179]), sind letztere unter anderem beteiligt an der Reorganisation der zytoskelettalen Mikrofilamente [109].

Es ist bekannt, dass Shear-Stress in bovinen aortalen Endothelzellen zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1 und ERK-2 führt [236]. Interessanterweise ist dieser Vorgang Calcium-unabhängig [233, 234, 236]. Gerade Calcium spielt als Second Messenger und Aktivator der Proteinkinase C, welche wiederum die Aktivierung von MAP-Kinasen bedingen kann, eine wichtige Rolle in endothelialen Signalübertragungskaskaden (siehe Abschnitt 2.3.7). Dennoch konnte gezeigt werden, dass Shear-Stress auch zu einer Aktivierung der Proteinkinase C führt. Die Calcium-Unabhängigkeit der Shear-Stress induzierten Aktivierung von MAP-Kinasen steht somit im Widerspruch zu dem bisherigen Wissen über die endotheliale intrazelluläre Signalübertragung. Inzwischen konnten neue Isoformen der PKC isoliert werden (z.B. PKC- ϵ), die im Gegensatz zur klassischen Form Calcium-unabhängig arbeiten und die Shear-Stress induzierte Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/ -2 bedingt [234].

Der aktuelle Kenntnisstand über Shear-Stress induzierte intrazelluläre Signalübertragungswege wird in Abbildung 5 graphisch dargestellt.

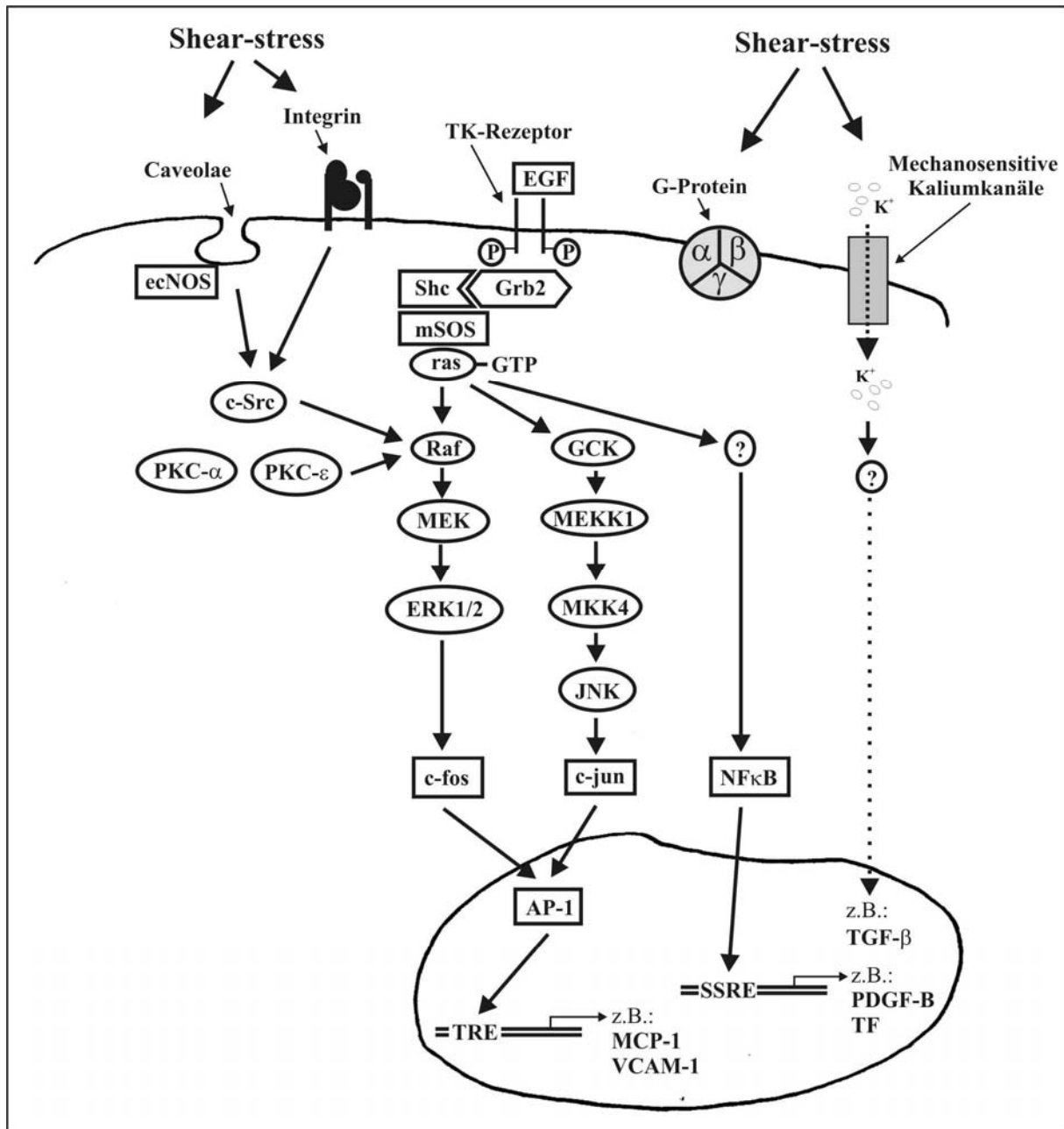


Abbildung 5: Shear-Stress induzierte intrazelluläre Signalübertragungswege in vaskulären Endothelzellen [233].

2.2.2 Mechanische Verletzung von Endothelzellmonolayern in vitro – Einflüsse auf die Genexpression

Wie bereits erwähnt, ist Art, Dauer und Stärke der Krafteinwirkung des Blutstromes auf das vaskuläre Endothel zu unterscheiden von den massiven Scherkräften, denen das Endothel im Rahmen einer Angioplastie ausgesetzt ist. Wie in Abschnitt 2.1.3.1 bereits beschrieben, führt die Angioplastie zu einer massiven Überdehnung der Gefäßwand mit konsekutivem Einriss des Endothels, Ruptur der Lamina interna sowie einer Dissektion der Lamina Media und

Adventitia [59, 114]. Das Endothel wird zerstört und es entsteht eine große Wundfläche in der Gefäßwand. Es folgt eine massive Proliferation von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Es konnte gezeigt werden, dass an der Regulation dieser Vorgänge z.T. die gleichen Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren beteiligt sind, wie auch im Rahmen der Atherogenese. Dennoch wurden die intrazellulären Vorgänge nach einer derartigen biomechanischen Verletzung des Endothels bislang nicht umfassend untersucht. Insbesondere ist nicht geklärt, ob bei dieser Art der Endothelzellverletzung die gleichen intrazellulären Signalübertragungswege eine Rolle spielen, wie im Rahmen der Shear-Stress induzierten Genexpression.

Erste Untersuchungen an kultivierten Endothelzellen *in vitro* haben gezeigt, dass die Verletzung des Endothelzellmonolayers erwartungsgemäß zur Migration und Proliferation benachbarter, überlebender Endothelzellen führt [49]. Es ist wahrscheinlich, dass an der Regulation dieser Vorgänge die in Abschnitt 2.1.3.1 beschriebenen Zytokine und Wachstumsfaktoren beteiligt sind, da nach Angioplastie *in vivo* und auch *in vitro* eine gesteigerte Expression dieser Faktoren nachgewiesen werden konnte. Jedoch gibt es erste Hinweise, dass die intrazellulären Signalübertragungsvorgänge nach einer der Angioplastie gleichkommenden Verletzung des Endothels durch andere Mediatoren reguliert werden, als bei der Shear-Stress induzierten Genexpression. Sammak et al. [201] zeigten, dass die Verletzung eines Endothelzellmonolayers *in vitro* zu einem raschen, sich wellenartig in den überlebenden Zellen ausbreitenden Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass Calcium bei dieser Form der verletzungsinduzierten Genexpression eine größere Rolle als Second Messenger spielt, als dies z.B. bei der Shear-Stress induzierten Genexpression der Fall ist. Zwar ist bekannt, dass durch Shear-Stress in vaskulären Endothelzellen Calcium- [5] und Kalium-Kanäle [28, 170] aktiviert werden und dies zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration dieser Kationen führt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass gerade die Shear-Stress induzierte Aktivierung der an der Regulation der Proliferation und Migration der Endothelzelle beteiligten Familie der MAP-Kinasen nicht abhängig ist von einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration [233, 236].

Es ist demnach möglich, dass durch Angioplastie und verwandte Verfahren andere intrazelluläre Signalübertragungswege in der vaskulären Endothelzelle aktiviert werden als durch den für die Atherogenese so wesentlichen Shear-Stress, auch wenn als Endergebnis durch beide Formen der Endothelzellverletzung die gleichen Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren induziert werden.

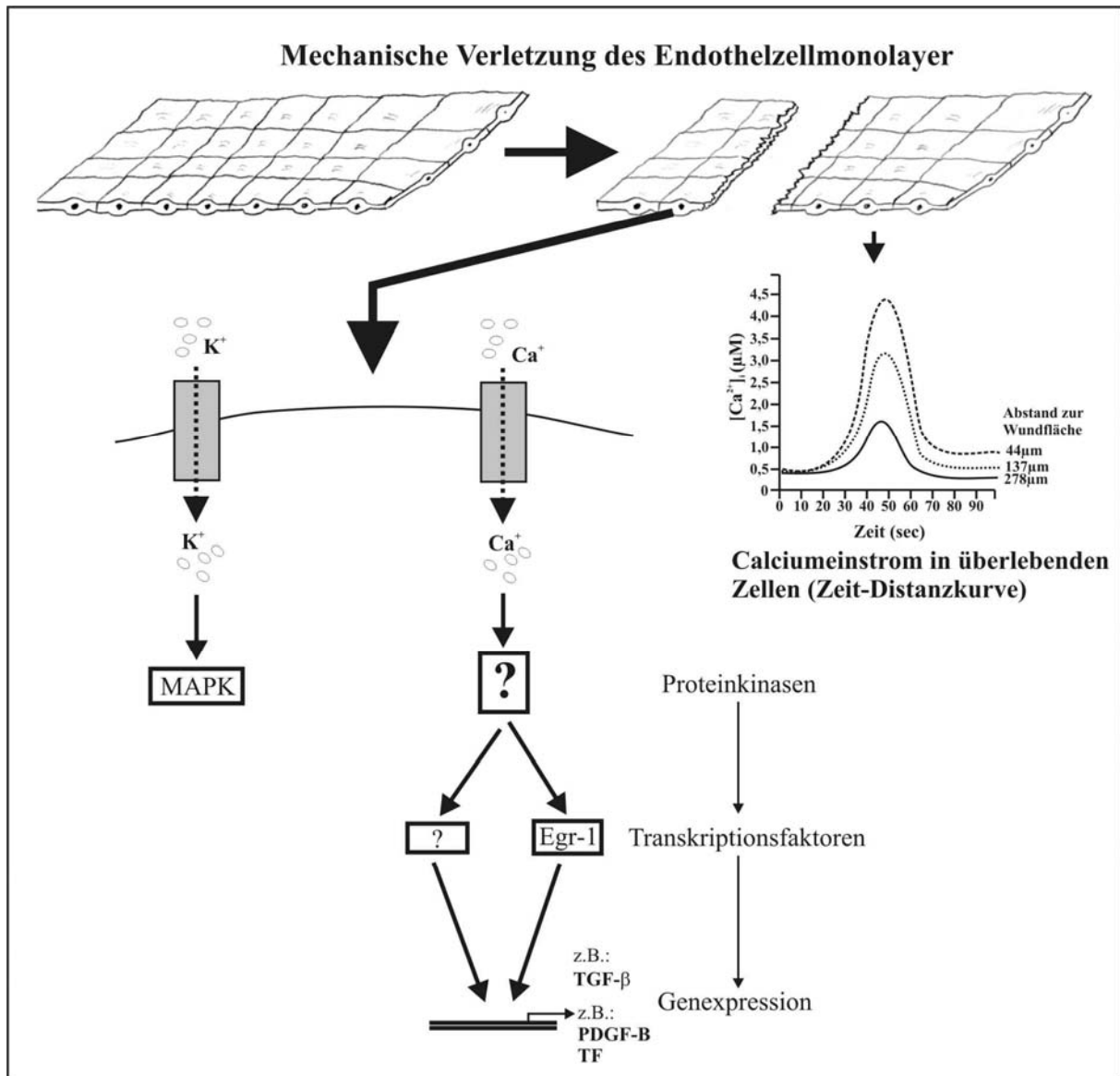


Abbildung 6: Derzeit bekannte intrazelluläre Vorgänge nach mechanischer Verletzung von vaskulären Endothelzellmonolayern in vitro, welche die Grundlage für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit bildeten.

2.3 Intrazelluläre Signalübertragungswege

Damit ein Zellsystem auf extrazelluläre Stimuli reagieren kann, bedarf es spezifischer intrazellulärer Signalübertragungswege, die ein extrazelluläres Signal in ein bestimmtes Muster der Genexpression überführen. Mittlerweile ist eine Vielzahl solcher Signalübertragungswege bekannt. Deren Kenntnis bildet die Grundlage für die Untersuchung der Regulation der Expression spezifischer Genprodukte durch extrazelluläre Reize wie mechanischen Stress.

2.3.1 Grundsätze der intrazellulären Signalübertragung

Zu Beginn der intrazellulären Signalübertragung steht ein meist membrangebundener Rezeptor. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor bewirkt dessen Aktivierung, wodurch membrangebundene G-Proteine aktiviert werden, welche die Aktivierung der intrazellulären Signalübertragung regulieren. Abbildung 7 stellt die Grundzüge der intrazellulären Signalübertragung vereinfacht dar.

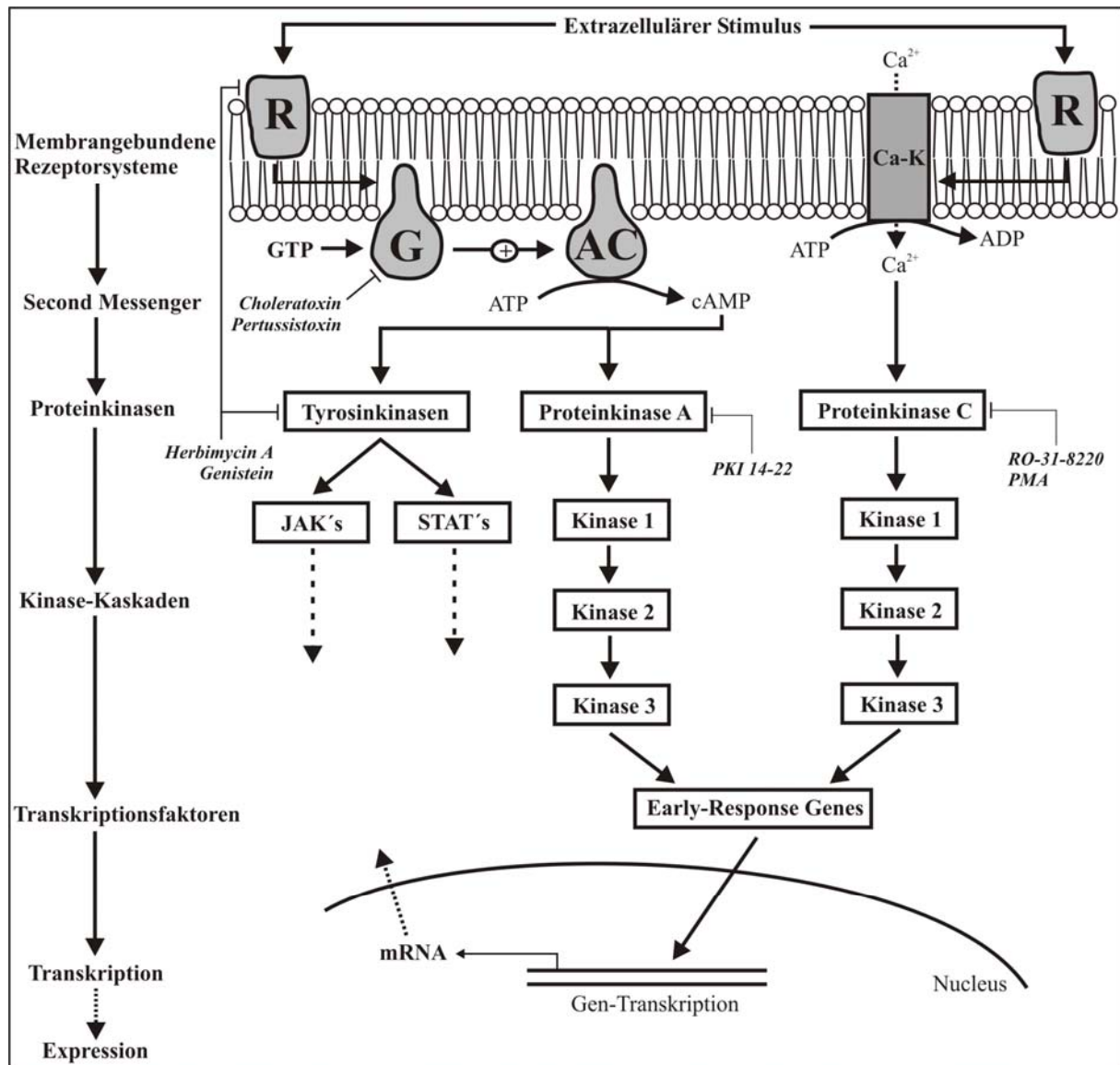


Abbildung 7: Vereinfachtes Schema der Grundprinzipien der intrazellulären Signalübertragung am Beispiel der Proteinkinasen A und C. Die wichtigsten Inhibitoren der dargestellten Signalübertragungswege wurden, soweit sie in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden, mit ihrem Angriffspunkt eingezeichnet. Abkürzungen: R = Rezeptor, G = G-Protein, AC = Adenylatcyclase, CaK = Calcium-Kanal.

Durch Wirkung der G-Proteine und anderer Mediatoren werden intrazelluläre Botenstoffe freigesetzt, welche die eigentlichen intrazellulären Signalübertragungskaskaden in Gang setzen. Diese Botenstoffe werden als „Second Messenger“ bezeichnet. Hierzu gehören beispielsweise Calcium, cAMP (cyclisches Adenosin-Monophosphat) und IP₃ (Inositol-Triphosphat). Second messenger wiederum bedingen die Aktivierung spezifischer Proteinkinasen. So ist z.B. die Aktivierung der Proteinkinase A an die erhöhte Konzentration des Second Messengers cAMP gekoppelt. Ähnliche Wirkungsbeziehungen sind bekannt für Proteinkinase C und Calcium. Dennoch existiert eine Vielzahl weiterer Second Messenger Systeme, die an dieser Stelle nicht weiter beschrieben werden sollen. Die aktivierten Proteinkinasen bilden Kaskaden der Aktivierung und Deaktivierung weiterer Kinasen, wodurch sich der Baum der Signalübertragung in viele Einzelschritte unterteilt. Am Ende solcher Proteinkinase-Kaskaden steht die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Expression spezifischer Genprodukte im Zellkern regulieren. Mittlerweile konnten eine Reihe von Transkriptionsfaktoren definiert werden, deren Aktivierung nicht an eine de-novo Synthese ihrer Proteinmatrix gebunden ist. Sie liegen in einer inaktiven Form bereits innerhalb der Zelle vor und ihre transkriptionelle Aktivität wird durch Bindung spezifischer Aktivatorproteine reguliert. Die Familie dieser Rezeptoren wird als „Immediate Early Response Genes“ bezeichnet. Sie stellen das Endglied in der intrazellulären Signalübertragung dar und binden an spezifische Gensequenzen in der Promotorregion ihrer Zielgene, wodurch deren Transkription und Expression gesteuert wird.

2.3.2 Membranständige Signaltransduktion

2.3.2.1 G-Proteine

Die Superfamilie der regulatorischen GTPasen (GTP-spaltende Enzyme) lässt sich anhand der Sequenz der α -Untereinheit in die heterotrimeren G-Proteine, die Ras-Proteine (kleine GTPasen) und die Elongations-, Initiationsfaktoren (z.B. EF-Tu) sowie Bestandteile des SRP-Partikels untergliedern. Die Ras-Proteine werden durch die Ligandenbindung an Tyrosinkinase gekoppelte Rezeptoren aktiviert während die Mitglieder der heterotrimeren G-Proteine nachgeschaltete, ebenfalls in der Regel membrangebundene Effektoren wie z.B. Phospholipase, cGMP-spezifische Phosphodiesterasen und die Adenylatcyclase positiv oder auch negativ regulieren. Die G-Proteine liegen im inaktiven Zustand als Trimer (α , β , γ -Untereinheit) vor, wobei die α -Untereinheit GDP bindet.

Die heterotrimeren G-Proteine weisen eine vielfältige Kombinationsmöglichkeit auf, da es mindestens 100 unterschiedliche α , 5 β und 20 γ -Untereinheiten gibt. Sie werden entsprechend der α -Untereinheit in drei Unterklassen eingeteilt: G_i , G_s und G_q . Die ubiquitär vorkommenden α_s -Proteine vermitteln das Effektorsignal über eine Aktivierung der Adenylatcyclase, während die inhibitorischen G_i -Proteine cGMP-spezifische Phosphodiesterasen aktivieren und damit zu einer Erniedrigung der intrazellulären cGMP-Konzentration führen.

Da die G-Proteine ubiquitär und in einer unendlichen Vielfalt vorkommen, spielen sie eine zentrale Rolle in der intrazellulären Signalübertragung. Auf spezifische Eigenschaften und Bedeutungen für die Atherogenese wird in den folgenden Kapiteln bei der Beschreibung spezifischer Signalübertragungswege eingegangen.

2.3.2.2 Möglichkeiten der experimentellen Beeinflussung von G-Proteinen

Aufgrund ihrer exponierten Lage an der Membran eukaryotischer Zellen sind sowohl G-Proteine als auch Rezeptorkinasen nicht selten Angriffspunkt bakterieller Toxine. Deshalb finden sich gerade unter diesen einige potente Inhibitoren aktivierender und inhibierender G-Proteine (siehe Abbildung 7, Tabelle 7).

Choleratoxin:

Das Toxin des Bakteriums *Vibrio cholerae* besteht aus einer A-Untereinheit (27 kDa), welche von 5 B-Untereinheiten (je 12 kDa) umgeben wird und mit deren Hilfe das Toxin an das Gangliosid GM1 der Zellmembran bindet. Die A-Untereinheit bewirkt eine ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit aktivierender G-Proteine, wodurch deren GTPase Aktivität reduziert wird. Konsekutiv wird sowohl die Hydrolyse von GTP gehemmt als auch die Aktivität der Adenylatcyclase gesteigert, was zu einer Überstimulation des Systems führt [78]. Im Rahmen der Choleraerkrankung bewirkt dieser Vorgang in den Zellen des Darmepithels eine verstärkte Sekretion in das Darmlumen und heftige wässrige Durchfälle.

Pertussistoxin:

Das Toxin von *Bordetella pertussis* bewirkt ähnlich dem Choleratoxin eine ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine, insbesondere inhibitorischer Varianten der Gruppe G_i . Dies bewirkt eine Hemmung der Bindung an den Rezeptor und führt somit zu einer Unterbrechung der Signalübertragung [115].

Wirkstoff	Ziel	Wirkung	[c]	Referenz
Choleratoxin	α_s -Untereinheit	cAMP \uparrow	1:1000	[78]
Pertussistoxin	α_i -Untereinheit	Rezeptorbindung \downarrow	1:500	[115]

Tabelle 7: Inhibitoren aktivierender und inhibierender G-Proteine.

2.3.3 Tyrosinkinaseaktivität als universelles Motiv intrazellulärer Signalübertragung

Proteinkinasen sind die zentralen Effektoren jeder intrazellulären Signalübertragungskaskade, da sie durch gezielte Phosphorylierung spezifischer Aminosäureseitenketten (= Target) die Aktivität nachgeschalteter Proteine regulieren. Dabei kann es sich wiederum um Proteinkinasen oder z.B. um Transkriptionsfaktoren handeln, welche erst durch diese Modifikation in der Lage sind, in den Zellkern zu wandern und an den DNA-Strang zu binden. Anhand des Aminosäuretargets werden die Proteinkinasen in zwei Hauptgruppen unterteilt: Serin-Threonin-Kinasen (z.B. MAPK, PKC) und Tyrosinkinasen. Letztere stellen die größere und zugleich inhomogenere Gruppe dar. Seit Abschluss des „Human Genome Project“ weiß man, dass diese Gruppe beinahe 1000 Mitglieder zählt, von denen bislang jedoch nur 91 identifiziert werden konnten. Ihre Bedeutung für die Regulation des Zellwachstums und die Apoptose spiegelt sich in der Tatsache wieder, dass über 70% der bekannten Onkogene und Protoonkogene für Protein-Tyrosinkinasen kodieren, so z.B. das Hybridgen ABL-BCR, dessen Syntheseprodukt eine weit über die Norm gesteigerte und nicht kontrollierbare katalytische Aktivität besitzt und dadurch entscheidend an der Entstehung der chronischen myeloischen Leukämie beteiligt ist.

Aus diesen Erkenntnissen ist zu folgern, dass die Tyrosinkinaseaktivität ein ubiquitäres Motiv der intrazellulären Regulation und Signalübertragung darstellt. Demzufolge kann die Gruppe der Tyrosinkinasen weiter unterteilt werden in membranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen und zytoplasmatische Tyrosinkinasen, die an den unterschiedlichsten Prozessen der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt sind. Prominente Vertreter der Rezeptor-Tyrosinkinasen sind unter anderem die Insulinrezeptoren sowie Rezeptoren weiterer wichtiger Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF, VEGF, etc.

2.3.3.1 Möglichkeiten der experimentellen Beeinflussung von Tyrosinkinasen

Aufgrund ihrer Vielzahl sind die Möglichkeiten der selektiven Inhibierung einzelner Tyrosinkinasen bislang sehr beschränkt. Dennoch existieren einige universelle Inhibitoren, die

wenig selektiv eine Vielzahl von Rezeptor-Tyrosinkinasen und intrazellulärer Tyrosinkinasen hemmen. Hierdurch wird ermöglicht, die potentielle Beteiligung von Tyrosinkinasen in zu untersuchenden Signalübertragungskaskaden zu beurteilen. Dieser Erkenntnis kann gegebenenfalls eine tiefer greifende Untersuchung folgen. Die wichtigsten Inhibitoren werden im Folgenden kurz dargestellt.

Herbimycin A:

Herbimycin A ist ein Produkt des Hefepilzes *Streptomyces hygroscopicus* und wurde 1979 erstmals isoliert [172]. Dieses Antibiotikum aus der Gruppe der Anasamycine inhibiert intrazellulär wenig selektiv eine Vielzahl von Tyrosinkinasen, z.B. src-Kinase. Experimentelle Verwendung findet es unter anderem als potenter Inhibitor der Onkogenese hämatopoetischer Tumoren im Maus-Modell [168] sowie als Inhibitor der Angiogenese [244].

Genistein:

Genistein ist ein Flavonoid, welches in hohen Konzentrationen in Sojabohnen vorkommt. Als potenter Tyrosinkinase-Inhibitor zeigt es ein ähnliches Wirkungsspektrum wie Herbimycin A und wird experimentell in der Tumorforschung verwendet. Zudem besitzt es ebenfalls eine antiangiogene Wirkung [72].

Wirkstoff	Ziel	Wirkung	[c]	Referenz
Herbimycin A	Tyrosinkinasen	Unselektive Hemmung	5µM	[168, 244]
Genistein	Tyrosinkinasen	Unselektive Hemmung	5µM	[72]

Tabelle 8: Unselektive Inhibitoren von Protein-Tyrosinkinasen.

2.3.4 Calcium als Second Messenger und Regulator der Proteinexpression in vaskulären Endothelzellen

Calcium ist einer der wichtigsten intrazellulären Second Messenger und als solcher beteiligt an der Regulation des Zellzyklus, Genexpression und Apoptose. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist um den Faktor 20.000 niedriger als die des extrazellulären Raumes und liegt bei etwa 100nM. Der wichtigste intrazelluläre Calciumspeicher ist das endoplasmatische Retikulum (eR). Seine Ca^{2+} -Konzentration kann bis zu 3mM betragen [200]. In der Mehrzahl der Fälle ist ein Anstieg der Konzentration intrazellulären Calciums bedingt durch eine Freisetzung aus diesem Zellkompartiment. Um die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase zu

regulieren, steht der Zelle eine Vielzahl an aktiven und passiven Ca^{2+} -Kanälen zur Verfügung, welche kurz dargestellt werden.

2.3.4.1 Zelluläre Calcium-Kanäle

Der am Besten untersuchte Ca^{2+} -Kanal ist der Inositol-Triphosphat-Rezeptor (IP_3R), welcher sich überwiegend auf dem endoplasmatischen Retikulum findet und in 3 Isoformen vorkommt. Er wird aktiviert durch Bindung des Second Messengers IP_3 , welcher durch das membrangebundene Protein Phospholipase C (PLC) gebildet wird. Die Aktivierung des an die Plasmamembran gebundenen Proteins PLC wird auf 2 verschiedene Arten reguliert. Zum einen durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche in vaskulären Endothelzellen klassischerweise durch die Hormone Bradykinin, Angiotensin II und Serotonin aktiviert werden. Zum anderen durch Tyrosin-Kinase Rezeptoren, welche z.B. durch klassische Wachstumsfaktoren wie PDGF und EGF aktiviert werden [232]. Neben dem IP_3 -Rezeptor existiert am ER noch der Ryanodin-Rezeptor [181] sowie ATP verbrauchende Ca^{2+} -Pumpen, welche das freigesetzte Calcium unter Energieverbrauch wieder zurück in das ER pumpen [243].

Im Gegensatz zu den Ca^{2+} -Kanälen des eR existieren auf der Zelloberfläche vaskulärer Endothelzellen auch Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, deren Funktion und Bedeutung jedoch bis heute unklar ist [23], sowie direkt Rezeptor-gebundene Kanäle, z.B. für Thrombin, Bradykinin und Serotonin [30, 45]. Obwohl für bestimmte Mediatoren spezifische Rezeptoren existieren, spielt für die Ca^{2+} -abhängige intrazelluläre Signalübertragung der IP_3 -Rezeptor des endoplasmatischen Retikulum die größte Rolle.

2.3.4.2 Calcium-abhängige Proteinkinase-Systeme

Die Freisetzung von intrazellulärem Calcium führt zu der Aktivierung wichtiger Kinase-Systeme. Das bekannteste Enzym stellt die Proteinkinase C dar, welche durch den Einfluss von Calcium und Diacylglycerol (DAG) aktiviert wird [6]. DAG entsteht als Nebenprodukt bei der Freisetzung von IP_3 aus dem gemeinsamen Precursor Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2). Die PKC wiederum ist in der Lage, eine Vielzahl weiterer Kinase-Systeme, u.a. das MAPKinase-System, zu aktivieren.

Neben der PKC spielt für die Ca^{2+} -abhängige Signalübertragung das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin eine entscheidende Rolle [40]. Es handelt sich um ein 16,7 kD Protein, welches die Aktivität der sog. Calcium/ Calmodulin abhängigen Kinasen (CaMK) reguliert. Hierzu

gehören die CaM-Kinasen I – IV, die Myosin-Leichtketten-Kinase sowie die Phosphorylasekinase [149] (Abbildung 8). Insbesondere die CaM-Kinasen spielen für die Regulation der Ca²⁺-abhängigen Gentranskription eine entscheidende Rolle.

2.3.4.3 Calcium als Regulator der Gentranskription

Mittlerweile konnten eine Reihe von Aktivatoren der Gentranskription identifiziert werden, deren Aktivität durch Ca²⁺-abhängige Proteinkinasen gesteuert wird. Der bekannteste dieser Faktoren ist das „Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element Binding Protein“ (CREB). CREB wurde initial mit der durch Proteinkinase A regulierten zellulären Genexpression in Verbindung gebracht [82]. Inzwischen ist bekannt, dass es auch bei der Ca²⁺-abhängigen Signalübertragung eine wesentliche Rolle spielt und durch CaM-Kinasen aktiviert wird [207, 208]. Der wichtigste Aktivator von CREB stellt die CaM-Kinase IV dar [147]. Sie aktiviert CREB durch Phosphorylierung an Serin 133, ebenso wie PKA [82] und CaM-Kinase I und II. Im Gegensatz zu CaM-Kinase IV phosphoryliert jedoch die CaM-Kinase II zusätzlich Serin 142, wodurch die Aktivität von CREB inhibiert wird. Die durch CREB regulierten Gene tragen in ihrer Promotorregion das „cAMP Response element“ (CRE). Eines der wichtigsten Gene mit einer solchen CREB-Bindungsstelle ist das Gen des Transkriptionsfaktors c-fos [207]. Typische Genprodukte, deren Transkription durch CREB reguliert wird, sowie Aktivatoren CREB-gekoppelter intrazellulärer Signalübertragungswege sind in Tabelle 9 dargestellt.

Neben CREB spielt auch der Transkriptionsfaktor ATF-1 (Activating Transcription Factor-1) eine Rolle in der Ca²⁺-abhängigen intrazellulären Signalübertragung [138, 140, 141]. ATF-1 ist ein Mitglied der CREB-Familie von Transkriptionsfaktoren und wirkt als solches als ein Kofaktor von CREB. Es bildet mit CREB Heterodimere und beeinflusst dadurch dessen transkriptionelle Aktivität. Die wichtigsten Aktivatoren von ATF-1 stellen die CaM-Kinasen I und IV dar [220]. Weiterhin spielt der Transkriptionsfaktor SRF (Serum Response Factor) eine Rolle in der Ca²⁺-abhängigen Signalübertragung. SRF bindet entweder als Homodimer oder als Heterodimer mit Mitgliedern der ETS-Familie von Transkriptionsfaktoren (z.B. ELK-1) an spezifische Bindungssequenzen in der Promotorregion bekannter Gene, SRE (Serum Response Element) genannt. Das bekannteste Gen mit einem SRE in der Promotorsequenz ist c-fos. Die transkriptionelle Aktivität von SRF wird reguliert durch die CaM-Kinase IV [151], wodurch die Verbindung zu den klassischen Ca²⁺-abhängigen Signalübertragungswegen hergestellt wird.

	Zytokin	Referenz
Aktivatoren CREB-regulierter Signalübertragungswege	TGF- β	[230]
	TNF- α	[176]
	Genprodukt	Referenz
CREB-regulierte Genprodukte	c-fos	[207, 208]
	tPA	[50]
	NOS2	[76]

Tabelle 9: Bedeutung von CREB in der intrazellulären Signalübertragung. Mittlerweile konnten Zytokine identifiziert werden, deren Einfluss auf die Genexpression durch CREB-gekoppelte Signalübertragungswege erfolgt. Zusätzlich sind mittlerweile einige Proteine bekannt, welche in ihrer Promotorregion ein CRE-Element besitzen und deren Transkription somit durch CREB-gekoppelte Signalübertragungswege reguliert wird.

2.3.4.4 Möglichkeiten der experimentellen Beeinflussung Ca^{2+} -abhängiger Signalübertragungswege

Für die Untersuchung Ca^{2+} -abhängiger Signalübertragungswege in vitro stehen verschiedene Substanzen zur Verfügung, mit deren Hilfe gezielt einzelne Schritte der Ca^{2+} -Signalkaskade gehemmt werden können oder die intra- und extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration unabhängig von einem spezifischen Stimulus beeinflusst werden kann. Die wichtigsten Substanzen werden, sofern sie im Rahmen dieser Arbeit Verwendung finden, im Folgenden kurz besprochen:

EGTA:

EGTA (Ethylene Glycol-bis(b-Aminoethyl Ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid) wirkt als Chelator freien Calciums im Extrazellularraum. Pro Molekül kann es 2 Ca^{2+} -Ionen binden. Durch Zugabe in das Kulturmedium in adäquaten Konzentrationen (2mM) kann dadurch die Konzentration freien Calciums in der Kulturflüssigkeit beinahe auf Null reduziert werden [19]. In der Folge kommt es zu einer intrazellulären Freisetzung von Calcium aus den Speicherorganen, bevorzugt dem eR und Mitochondrien [190]. Hierdurch werden zum einen auf unselektive Weise intrazelluläre Ca^{2+} -abhängige Signalübertragungswege aktiviert. Auf der anderen Seite kann dadurch ein Ca^{2+} -Einstrom vom extrazellulären Raum in den intrazellulären Raum, z.B. durch Rezeptor-gebundene oder Spannungs-abhängige Ca^{2+} -Kanäle unterbunden werden (Abbildung 8).

Lanthan-Trichlorid:

Lanthan, ein Element aus der Gruppe der seltenen Erden, ist aufgrund seiner Trivalenz und starken positiven Ladung bezüglich seiner chemischen Eigenschaften sehr ähnlich den Erd-Alkalimetallen. In experimentellen Umgebungen findet es Verwendung für die Untersuchung von Calcium-Kanälen, da es mit Calcium um die membranständigen Transportsysteme konkurriert, diese jedoch aufgrund seiner Größe blockiert. Aufgrund dieser Tatsache bleibt ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration aus bzw. fällt deutlich geringer aus als bei anderen Substanzen [54, 95].

BAPTA-AM:

Die membran-permeable Verbindung BAPTA-AM (1,2-bis(2-Aminophenoxy)Ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid-Acetoxy-Methylester) ist in der Lage, nach Permeation in das Zellinnere intrazelluläres Calcium effektiv zu binden. Hierzu muss jedoch die zunächst inaktive Verbindung durch intrazelluläre Esterasen in die aktive Säure hydrolysiert werden [224]. Die nun aktive Form BAPTA cheliiert 2 Ca^{2+} -Ionen im Verhältnis 2:1. Die Wirkung von BAPTA-AM auf Ca^{2+} -abhängige intrazelluläre Signalübertragungswege in vaskulären Endothelzellen wurde umfassend untersucht. So konnte z.B. die Ca^{2+} -abhängige Bildung von PGI_2 durch VEGF durch BAPTA-AM wirkungsvoll geblockt werden [81]. Auch die durch bFGF induzierte Freisetzung von VEGF, welche durch eine Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von MAP-Kinasen reguliert wird, lässt sich durch BAPTA-AM unterbinden [227]. Zusätzlich ist bekannt, dass BAPTA-AM zu einer Translokation und Inaktivierung der PKC führt [62]. BAPTA-AM stellt somit eine gut etablierte Substanz zur Evaluierung intrazellulärer Ca^{2+} -abhängiger Signalübertragungswege in vaskulären Endothelzellen dar.

A23187:

Die synthetische Verbindung A23187 (4-Bromo-Calcimycin) bewirkt einen unselektiven massiven Einstrom von Calcium in die Zelle. Durch Komplexbildung mit extrazellulären Kationen im Verhältnis 2:1 [58, 182] erreicht das Ionophor Ladungsneutralität und kann durch die Zellmembran permeieren. Nach Dissoziation im intrazellulären Raum kommt es dort zur Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration, wodurch Ca^{2+} -abhängige Enzyme aktiviert werden. Durch erneute Komplexbildung mit monovalenten intrazellulären Kationen wird das Ionophor wieder membranpermeabel und gelangt in den extrazellulären Raum zurück [58].

Thapsigargin:

Der Tumor-Promotor Thapsigargin bewirkt eine Hemmung der Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Retikulums. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, einerseits durch Hemmung der Wiederaufnahme in das eR, zum anderen durch gesteigerten Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum [111, 225]. Von Vorteil ist, dass dieser Vorgang nicht zu einer vermehrten Produktion von IP_3 führt, weshalb IP_3 -abhängige intrazelluläre Rezeptorsysteme nicht aktiviert werden [84]. Im Übrigen bewirkt Thapsigargin keine Änderungen des intrazellulären pH-Wertes, weshalb das Zellmilieu, abgesehen von einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration, weitgehend unbeeinflusst bleibt [84].

TMB-8:

Die synthetische Substanz TMB-8 (3,4,5-Trimethoxybenzoic Acid 8-Diethylamino-Octylester) gilt als zuverlässiger Inhibitor einer Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum [96]. Es ist wahrscheinlich, jedoch bislang nicht erwiesen, dass dies durch eine Hemmung des IP_3 -Rezeptors des eR geschieht [222, 223]. Der durch TMB-8 ausgelöste Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist nur von kurzer Dauer und vollständig reversibel.

Wirkstoff	$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Wirkprinzip	[c]	Referenz
EGTA	↑	Chelierung freien Calciums im Interstitium	2 mM	[19]
Lanthan	↓	Kompetitiver Inhibitor an Ca^{2+} -Kanälen	10-50 μM	[54, 95]
BAPTA-AM	↓	Chelierung freien Calciums in der Zelle	10– 100 μM	[224]
A23187	↑	Calcium-Ionophore	10 μM	[58, 182]
Thapsigargin	↑	Hemmung der Ca^{2+} -ATPase des eR	100nM	[111, 225]
TMB-8	↓	Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem eR	10-100 μM	[96]
KN-62	↔	Hemmung der CaM-Kinasen I und II	10 μM	[99]

Tabelle 10: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inhibitoren und Aktivatoren intrazellulärer Calcium-abhängiger Signalübertragungswege.

KN-62:

KN-62 (1-[N,O-bis-(5-Isoquinolinesulphonyl)-N-Methyl-L-Tyrosyl]-4-Phenylpiperazine) wirkt bereits in niedrigen Konzentrationen von 0,8µM als Inhibitor der CaM-Kinase II [228]. Obwohl bislang davon ausgegangen wurde, dass es spezifisch auf die CaM-Kinase II wirkt, ist inzwischen bekannt, dass es in identischer Konzentration auch die CaM-Kinase I und in wesentlich höherer Konzentration (3µM) die CaM-Kinase IV inhibiert [99]. Es dient als etablierter Inhibitor Calcium/ Calmodulin-abhängiger intrazellulärer Signalübertragungswege ohne wesentliche Zytotoxizität im wirksamen Dosisbereich.

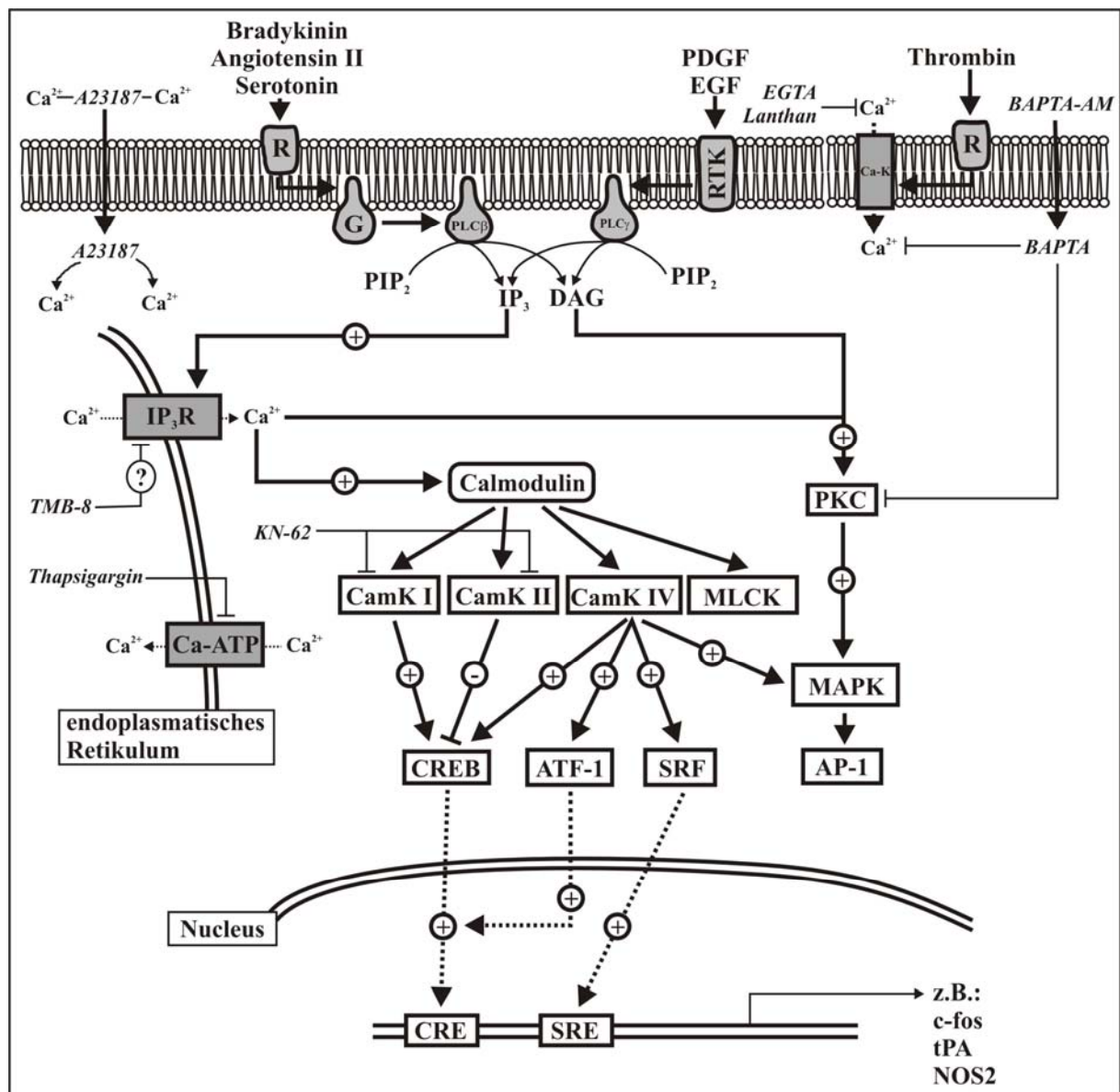


Abbildung 8: Darstellung der intrazellulären Ca²⁺-abhängigen Signalübertragungswege, soweit bekannt. Die Ansatzpunkte der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inhibitoren sind ebenfalls angegeben (kursiv). Abkürzungen: R = G-Protein gekoppelter Rezeptor, G = G-Protein, RTK = Rezeptor-Tyrosinkinasen, Ca-K = Rezeptor-gekoppelter Calcium-Kanal.

2.3.5 Proteinkinase A

Das cyclische Adenosin-Monophosphat (cAMP) dient als Second Messenger für eine große Anzahl von Hormonen, Neurotransmittern und Zytokinen. Dadurch ist cAMP beteiligt an der Regulation einer Vielzahl von Prozessen des Zellwachstums, -differenzierung und Apoptose. Der wichtigste intrazelluläre Sensor des cAMP ist die cAMP-abhängige Proteinkinase A (siehe Abbildung 7), welche erstmals 1968 von Walsh, Perkins und Krebs in Muskelzellen von Kaninchen isoliert werden konnte [241]. Die Proteinkinase A (PKA) ist ein tetrameres Holoenzym, welches aus einer cAMP-bindenden regulierenden und 2 katalytischen Untereinheiten besteht. Nach Bindung von 4 Molekülen cAMP dissoziieren die beiden katalytischen Untereinheiten und phosphorylieren Serin- und Threonin-Reste des Zielmoleküls [15]. Mittlerweile konnten zwei Isoformen der PKA, PKA-I und PKA-II isoliert werden, die sich hinsichtlich ihres zellulären und geweblichen Verteilungsmusters teilweise beträchtlich unterscheiden [215]. Diese beiden Isoenzyme werden bezüglich Ihrer Spezifität weiter untergliedert durch Variationen der regulatorischen und katalytischen Untereinheiten. Obwohl dadurch eine nicht unerhebliche Zahl an Varianten der PKA existiert, wurde dennoch lange Zeit nicht verstanden, wie eine Vielzahl an externen Stimuli unterschiedliche zelluläre Reaktionen durch ein einzelnes Transmittersystem wie cAMP bedingen können. Ein möglicher Lösungsansatz bot sich durch die Entdeckung der sog. „A Kinase Anchoring Proteins“ (AKAP's), durch welche die PKA an einzelne zelluläre Kompartimente wie Nukleus, Mitochondrien oder endoplasmatisches Retikulum gebunden ist [215].

2.3.5.1 Bedeutung PKA-abhängiger Signalübertragungswege in der Atherogenese

Die Bedeutung PKA-abhängiger Signalübertragungswege insbesondere im Rahmen der Atherogenese und neointimalen Proliferation ist längst nicht vollständig untersucht und bislang nur fragmentär bekannt. So konnte z.B. kürzlich nachgewiesen werden, dass Shear-Stress zu einer PKA-abhängigen Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) führt [21], wodurch deren Aktivität positiv getriggert wird. Ein weiteres wichtiges Indiz für eine ubiquitäre Beteiligung PKA-abhängiger Signalübertragungswege ist die Tatsache, dass die Synthese von VEGF in Endothelzellen durch Inhibitoren der PKA suffizient gehemmt werden kann, wodurch sich im Tiermodell die Angiogenese und Vaskularisierung von Implantaten verhindern ließ [4]. Diese ersten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Bedeutung PKA-abhängiger Signalübertragungswege für Prozesse der Atherogenese, Revaskularisierung und neointimaler Proliferation weitaus größer ist, als ursprünglich angenommen.

2.3.5.2 Möglichkeiten der experimentellen Beeinflussung der PKA

Bislang existieren nur wenige selektive und erprobte Inhibitoren der PKA. Der wichtigste wird im Folgenden kurz dargestellt (siehe auch Abbildung 7).

PKI 14-22:

Das Oligopeptid PKI 14-22 besteht aus 9 Aminosäuren, deren Sequenzfolge identisch ist mit der Sequenz des zelleigenen PKA Inhibitors PKI an Position 14 bis 22 [80]. Wie gezeigt werden konnte, besitzt dieses Peptid eine sehr hohe und spezifische Affinität zur katalytischen Untereinheit der PKA. Durch Myristolisierung des C-Terminus konnte seine Zellpermeabilität wesentlich gesteigert werden, weshalb dieses Peptid regelmäßig als potenter und selektiver Inhibitor der PKA Verwendung findet [191].

Wirkstoff	PKA	Wirkprinzip	[c]	Referenz
PKI 14-22	↓	Bindung an die katalytische UE	500nM	[80]

Tabelle 11: Selektive Inhibitoren der PKA.

2.3.6 Proteinkinase C

Die Grundzüge der Aktivierung der in gewissem Umfang Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase C wurde in Abschnitt 2.3.4 bereits beschrieben (siehe Abbildung 5, Abbildung 7 und Abbildung 8). Dennoch sollen die wichtigsten Eigenschaften dieses Kinase-Systems sowie die Möglichkeiten der experimentellen Hemmung kurz dargestellt werden.

2.3.6.1 Die Familie der C-Kinasen

Die Proteinkinase C stellt eine der am längsten bekannten Proteinkinasen dar [9]. Diese Familie von Proteinkinasen ist ein integraler Bestandteil der zellulären Signalübertragung und besteht aus einer Vielzahl von Subtypen und Isoformen, die sich vor allem hinsichtlich ihrer Verteilung in den einzelnen Zellkompartimenten und ihrer Aktivierung teilweise erheblich unterscheiden [157, 161, 162]. Mittlerweile wurden in Endothelzellen von Säugetieren 11 verschiedene Isoformen isoliert, die in 4 Gruppen eingeteilt werden: klassische (classical) PKC (cPKC), neue PKC (nPKC), atypische PKC (aPKC) und exzentrische PKC (ePKC)

[161, 162]. Die Untergruppen der PKC unterliegen unterschiedlichen Regulationsmechanismen und unterscheiden sich auch bezüglich ihrer Verteilung im Zellkompartiment und ihrer Rollen in der intrazellulären Signalübertragung. Aus biochemischer Sicht kann eine einfache Unterteilung der Untergruppen der PKC anhand ihrer Sensitivität für Calcium und Phorbol ester getroffen werden. Die Isoformen der cPKC (α , β I, β II, γ) besitzen eine Calcium-Bindungsdomäne und sind sensitiv für Phorbol ester. Die Isoformen der nPKC (δ , ϵ , θ , η) besitzen im Gegensatz dazu keine Bindungsdomäne für Calcium, sind aber sensitiv für Phorbol ester. Die Mitglieder der aPKC (ξ , λ/ι) besitzen keine dieser Eigenschaften. Aus der Gruppe der ePKC ist bislang erst ein Mitglied identifiziert worden (μ) und dieses wurde bislang nur wenig untersucht. Dennoch sind Vertreter jeder Gattung universal in allen menschlichen Gewebetypen zu finden [162].

So unterschiedlich die einzelnen Isoformen agieren, so unterschiedlich ist auch ihr Effekt auf den Zellzyklus. Insbesondere die cPKC- α ist wesentlich an der Regulation der Zellproliferation beteiligt, da ihre Downregulation in Endothelzellen zur Apoptose führt [91] und in einer Vielzahl von Tumorzellen ihre Aktivität deutlich über die Norm gesteigert ist [142]. Demgegenüber spielt die nPKC- δ eine wesentliche Rolle in der Zellapoptose, was in einer Vielzahl von Zellsystemen untersucht wurde [52]. Es wird deutlich, dass die Familie der PKC eine große Bedeutung hat für die positive aber auch negative Regulation des Zellzyklus.

PKC-Gruppe	Isoformen	Ca ²⁺ -Bindungsdomäne	Phorbol ester sensitiv	Referenz
cPKC	α , β I, β II, γ	+	+	
nPKC	δ , ϵ , θ , η	-	+	[157, 161, 162]
aPKC	ξ , λ/ι	-	-	
ePKC	μ	?	?	

Tabelle 12: Gruppen und Isoformen der PKC sowie deren wesentlichen Eigenschaften.

2.3.6.2 Downstream-Kinasen der PKC

Eine der wesentlichsten Rollen der PKC ist die Übertragung von über die Zellmembran empfangenen Signalen auf nachgeschaltete, komplexe, intrazelluläre Kinase-Systeme. Sie stellt somit ein wesentliches Bindeglied zwischen Rezeptor-gekoppelten Tyrosinkinase-Systemen und nachgeschalteten Kinase-Systemen, welche einen spezifischen Reiz in ein bestimmtes Muster der Genexpression übersetzen, dar. In dieser Funktion ist sie entscheidend an der Regulation des Zellzyklus und der Tumor-Promotion beteiligt [171]. Das wichtigste Ziel der PKC stellt

die Familie der MAP-Kinasen dar (siehe Abschnitt 2.3.7). Dieses komplexe und mehrfach vernetzte System aus Serin-/ Threonin-Kinasen ist ganz wesentlich an der Übertragung proliferativer Reize auf den Nukleus beteiligt, weshalb eine Vielzahl von Interaktionen zwischen diesen beiden Kinase-Systemen bekannt ist [112]. Diese werden zusammen mit der Familie der MAP-Kinasen in Abschnitt 2.3.7 näher beschrieben.

2.3.6.3 Möglichkeiten der experimentellen Beeinflussung der PKC

Die wichtigsten Substanzen zur selektiven Hemmung der PKC werden, soweit sie in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden, im Folgenden kurz dargestellt (siehe auch Abbildung 7).

Ro-31-8220

Das Staurosporin-Analogon Ro-31-8220 (2-{1-[3-(Amidinothio)Propyl]-1H-Indol-3-yl}-3-(1-Methylindol-3-yl)-Maleimide) ist einer der bekanntesten und ubiquitär verwendeten Inhibitoren der PKC. Es handelt sich um einen potenten Inhibitor der PKC ohne zytotoxische Nebeneffekte [27]. Eine Selektivität für bestimmte Gruppen oder Isoformen der PKC ist bislang nicht bekannt, weshalb von einer unselektiven Hemmung aller Mitglieder der PKC auszugehen ist. Zu bedenken ist jedoch, dass neben der Inhibition der PKC auch eine deutliche Aktivierung der JN-Kinase1, einem Mitglied der MAP-Kinasefamilie, mit konsekutiver Überexpression des Transkriptionsfaktors c-Jun, bewirkt wird [16].

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

Phorbolster sind sehr potente Aktivatoren der Proteinkinase C indem sie die Wirkung von DAG imitieren. Die am häufigsten verwendete Substanz ist Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA). Durch verlängerte Stimulationszeit (>12h) führt die anhaltende Aktivierung der PKC zu deren Downregulation, weshalb PMA bei entsprechender Anwendung auch als potenter Inhibitor der PKC Verwendung findet [209]. Wie in Tabelle 12 dargestellt, wirken Phorbolster nicht auf alle Gruppen und Isoformen der PKC. Eine Hemmung der PKC durch PMA ist nur möglich für die Gruppen cPKC und nPKC, nicht jedoch für die Gruppe der aPKC [157].

Wirkstoff	PKC	Wirkprinzip	[c]	Referenz
Ro-31-8220	↓	Direkter Inhibitor aller Isoformen der PKC	3µM	[27]
PMA	↓↑	Downregulation der PKC nach > 12h	600nM	[209]

Tabelle 13: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inhibitoren und Aktivatoren der Proteinkinase C.

2.3.7 Die Familie der MAP-Kinasen

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und sind beteiligt an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Reaktionen auf externe Stimuli, einschließlich Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose [218]. Inzwischen sind verschiedene Subtypen der MAP-Kinasen isoliert worden, welche an primär voneinander unabhängigen Signalkaskaden beteiligt sind und unterschiedliche Aufgaben in der Regulation des Zellzyklus wahrnehmen. Bedingt durch diese Rolle sind MAP-Kinasen auch wesentlich beteiligt an den Vorgängen der Atherogenese und an der zellinternen Übertragung mechanischer Reize wie z.B. bei der Angioplastie [135, 233, 234]. Eine Übersicht über durch MAP-Kinasen regulierte Vorgänge in der Pathogenese von Gefäßerkrankungen liefert Tabelle 14.

Krankheitsbild	Effekte von p38 und SAP-Kinasen
Ischämie	Verstärkte transkriptionelle Aktivität von c-jun und ATF-2
	Induktion von c-jun
	Induktion von Adhäsionsmolekülen
	Wachstumsstop und Apoptose
Atherosklerose	Modulierung der inflammatorischen Vorgänge in der Gefäßwand
	Induktion von E-selectin
	Induktion von c-jun
	Verstärkte Expression von TNF-a und IL-1
Herzinfarkt	Verstärkte Expression von TNF-a
	Regulierung der Apoptose von Myozyten
Restenose nach PTA	Negative Regulation der Wirkung von Wachstumsfaktoren

Tabelle 14: Bedeutung des MAP-Kinasesystems (p38 und SAP-Kinasen) in der Pathogenese von Gefäßerkrankungen [71].

2.3.7.1 Die wichtigsten Subfamilien der MAP-Kinasen

Die wichtigsten Vertreter der Familie der MAP-Kinasen stellen die p42/p44 „Extracellular Signal-Related Kinase“ (ERK1 und 2) [24], die c-Jun N-Terminal Proteinkinase (JNK) bzw. Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) [129] und die p38 MAP-Kinase dar [92]. Diese Kinasen repräsentieren den Endpunkt von Signalkaskaden, welche extrazelluläre Stimuli in ein Muster der zellulären Genexpression überführen.

Die Aktivierung der JNK/ SAPK und p38 MAP-Kinasen ist im Allgemeinen assoziiert mit der Regulation der Zellapoptose, während p42/p44 ERK wesentlich an der Regulation der Zellproliferation beteiligt ist [52]. Allen Mitgliedern der Familie ist gemein, dass sie nach ihrer Aktivierung in den Zellkern translozieren und dort durch gezielte Phosphorylierung/ Dephosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression regulieren. Jeder MAP-Kinase Signalweg besteht aus einer dreischichtigen Signalkaskade, an deren Anfang entweder G-Protein gekoppelte Kinasen wie Ras-GTP/Raf oder durch andere Reize aktivierte Kinase-Systeme wie die MAPK/ ERK Kinase Kinasen (MEKK 1-4) stehen. Am besten untersucht ist bislang die Aktivierung der ERK-Kinase durch Ras-GTP/ Raf, woran auch die PKC wesentlich beteiligt ist (siehe auch Abbildung 5) [60]. Diese Kinasen aktivieren durch Phosphorylierung nachgeschaltete Kinasen wie MAPK/ ERK Kinase (MEK 1/ 2), welche wiederum die Aktivität der eigentlichen Effektor-Kinasen (ERK, JNK, p38 MAPK) regulieren. Letztere translozieren in den Nukleus und regulieren die Genexpression auf die beschriebene Weise. Das System der MAP-Kinasen ist in Abbildung 9 graphisch dargestellt.

2.3.7.2 Physiologisch relevante Substrate der MAP-Kinasen

Die wichtigsten Substrate der MAP-Kinasen können primär in zwei Kategorien unterteilt werden: Transkriptionsfaktoren und/ oder Chromatin-Proteine sowie Serin/ Threonin-Effektorkinasen. Zu den am besten untersuchten Transkriptionsfaktoren, die unter der Kontrolle von MAP-Kinasen stehen, gehören das bereits mehrfach erwähnte c-fos und c-jun (siehe auch Abschnitt 2.3.8). Gerade c-fos und c-jun nehmen in der Steuerung des Zellzyklus und der –proliferation eine zentrale Stellung ein. Sie sind deshalb vor allem Ziel der ERK-Kinasen. Die Regulation der Expression von c-fos durch MAP-Kinasen erfolgt durch Phosphorylierung bestimmter Bindungskomplexe (sog. Ternary Complex Factor, TCF), welche permanent an die Promotorregion des Genes gebunden sind [235, 248]. Ähnliche regulative Vorgänge existieren auch für den wesentlich komplexer aufgebauten Promotor der

Gensequenz von c-jun. Er enthält eine Bindungsstelle für AP-1, dessen Aktivierung ebenfalls durch verschiedene Mitglieder der MAP-Kinasefamilie gesteuert wird [197].

Neben c-fos wird auch die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B beeinflusst, jedoch ist die Verschaltung der verantwortlichen Kinase-Systeme weitaus komplexer und weniger gut erforscht als bei den zuvor genannten Faktoren. Gesichert ist, dass die MAPK/ ERK Kinase Kinase 1 (MEKK1) durch Phosphorylierung des NF- κ B Profaktors I κ B dessen Autodisaggregation verhindert und somit die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B verlängert und verstärkt [73]. Auch der in Abschnitt 2.3.4.3 bereits beschriebene Transkriptionsfaktor CREB kann durch Mitglieder der MAP-Kinasen in seiner Aktivität reguliert werden. Dies erfolgt vor allem durch die sog. MAP-Kinase aktivierte Proteinkinase 1 und 2 (MAPKAPK1/2), welche zum einen durch ERK1/2, zum anderen durch die p38-MAPK reguliert werden [226]. Zusätzlich besteht eine Interaktion zwischen ERK1/2 und CREB-Kinase [226].

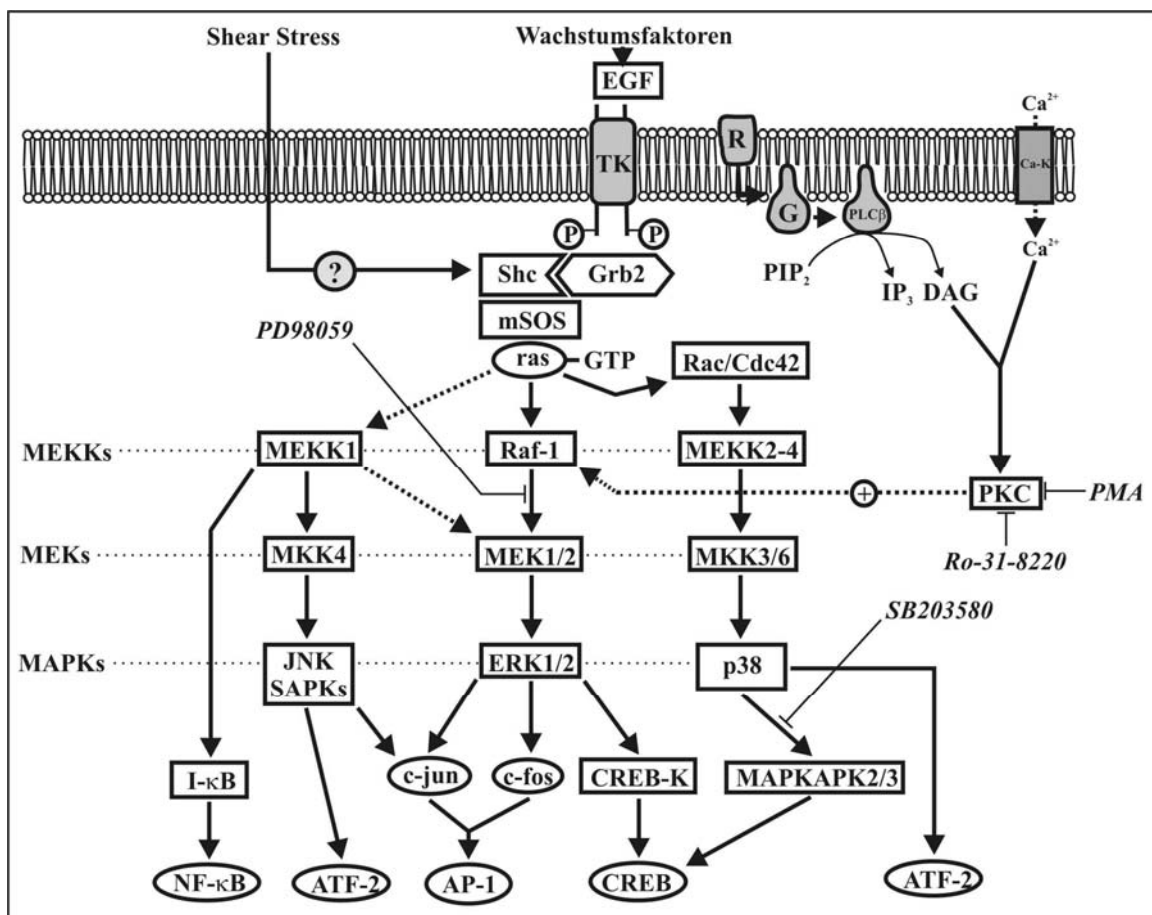


Abbildung 9: Leicht vereinfachte Darstellung des MAP-Kinasesystems. Die wichtigsten nukleären Substrate der einzelnen Effektor-Kinasen sind dargestellt. Ebenso sind die Angriffspunkte der im Text beschriebenen Inhibitoren der MAPKs und PKC angegeben. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden einige Nebenwege nicht dargestellt, so z.B. die durch ERK1/2 regulierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB durch MAPKAPK1.

2.3.7.3 Möglichkeiten der experimentellen Beeinflussung der MAP-Kinasen

Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, besteht das System der MAP-Kinasen aus einer Vielzahl von teilweise komplex vernetzten Serin/ Threonin-Kinasen. Bedingt durch Seitenwege und Vernetzung der einzelnen Hauptstränge ist die selektive Inhibition einzelner Kinasen schwierig, insbesondere wenn der aktivierende Stimulus nicht exakt definiert werden kann, wie z.B. im Verletzungsmodell. Dennoch existieren 2 potente und selektive Inhibitoren einzelner Mitglieder der Familie, die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden.

PD98059:

PD98059 (2'-Amino-3'-Methoxyflavon) ist ein potenter und selektiver Inhibitor der Aktivierung der MAPK/ ERK Kinase 1 (MEK1) durch Ras-GTP/Raf (siehe Abbildung 9) [3, 177]. Es bewirkt dadurch eine Hemmung der Aktivierung des ERK-1/-2 Kinasen, welche in der Regulation der Zellproliferation durch Aktivierung von c-fos eine wesentliche Rolle spielen. Die maximale Hemmkonzentration liegt je nach Zelltyp bei 10 – 100µM. Neben der spezifischen Inhibition der MAP-Kinasen besteht zusätzlich eine unspezifische Hemmwirkung auf die COX-1 und -2 [22].

SB203580:

Das Pyridinyl-Imidazol-Derivat SB203580 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-Methylsufinylphenyl)-5-(4-Pyridyl)1H-Imidazol) bewirkt eine selektive Hemmung der p38 MAP-Kinase (siehe Abbildung 9) durch Konkurrenz mit ATP um das katalytische Zentrum [43, 250]. Die IC₅₀ liegt bei 70nM. Analog zu PD98059 besitzt auch SB203580 eine unspezifische Hemmwirkung auf die COX-1 und -2 [22].

Wirkstoff	Ziel	Inhibierter MAPK Weg	[c]	Referenz
PD98059	MEK1	ERK-1/-2	50µM	[3, 177]
SB203580	P38 MAPK	P38/ MAPKAP-2/-3	10µM	[43]

Tabelle 15: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inhibitoren der MAPK.

2.3.8 Transkriptionsfaktoren als Regulatoren der Genexpression

Transkriptionsfaktoren stellen das Endglied der intrazellulären Signalübertragung dar, an dem die verschiedenen Kinase-Systeme zusammenlaufen. Grundsätzlich werden zwei Systeme von Transkriptionsfaktoren unterschieden: die sog. „Immediate-Early Response“ Gene und die nukleären Faktoren. In beiden Familien finden sich Vertreter, die an der durch mechanischen Stress induzierten Genexpression beteiligt sind. Die wichtigsten, welche auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, werden im Folgenden kurz dargestellt.

2.3.8.1 Immediate-Early Response Gene

Unter dem Begriff „Immediate-Early Response Genes“ (IEG) werden Gene verstanden, die meist für Transkriptionsfaktoren kodieren und deren Induktion sehr schnell (in wenigen Minuten) erfolgt sowie unabhängig von einer de-novo Proteinsynthese ist. In der Regel liegt das Protein bereits in einer inaktiven Form im Nukleus vor und wird durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung aktiviert. Es kann dann auch die Expression seines eigenen Gens induzieren. Die wichtigsten Vertreter dieser Gattung von Transkriptionsfaktoren, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sind c-fos und EGR-1.

2.3.8.2 c-fos

Das Protoonkogen c-fos wurde 1984 entdeckt als wichtiger Effektor in RNA-Tumorzellen der Maus (FBJ-Osteosarkomvirus und FBR-Osteosarkomvirus) [74]. Das Protein hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 55kDa und eine Halbwertszeit von etwa 2h [124]. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor mit typischem Leucin-Zipper Motiv (Abbildung 10), das es ihm ermöglicht, mit sich selbst Homodimere oder mit Mitgliedern der JUN-Familie von Transkriptionsfaktoren Heterodimere zu bilden. Die transkriptionell aktive Form wird als „Activating Protein 1“ (AP-1) bezeichnet, bei dem es sich um FOS-Homo- oder FOS/ JUN-Heterodimere handelt [105].

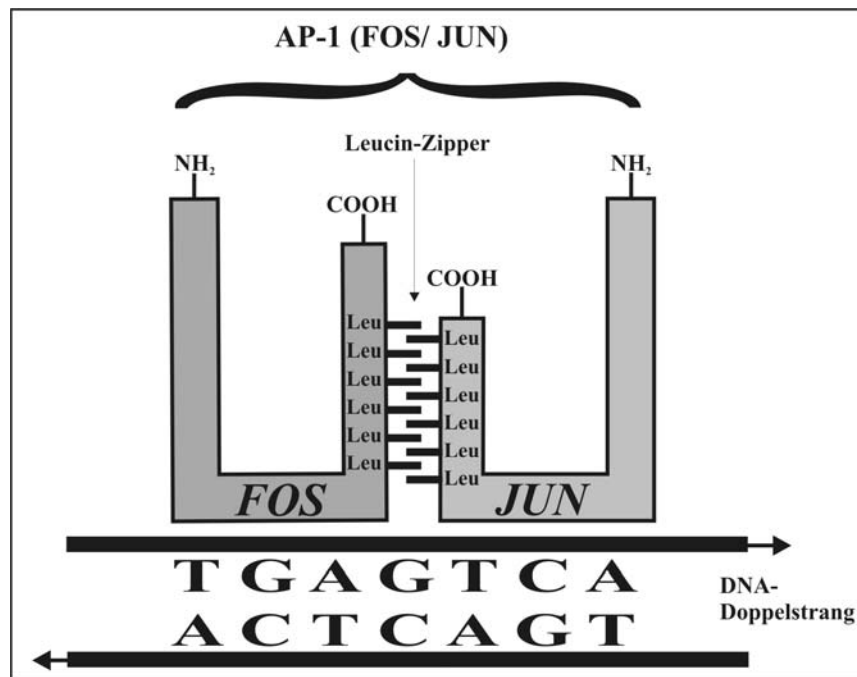


Abbildung 10: Leucin-Zipper der Transkriptionsfaktoren FOS und JUN. Hier: Bildung eines Heterodimers (AP-1) aus FOS und JUN und konsekutive Bindung an die Konsensus-Sequenz der AP-1 Bindungsstelle am DNA-Doppelstrang (TGAGTCA).

Mittlerweile sind 4 wichtige Isoformen des FOS Proteins bekannt: FOS, FOSB, FRA-1 und FRA-2 [85]. Sie kommen ubiquitär in allen wichtigen Gewebetypen vor und übernehmen unterschiedliche Aufgaben in der Regulation der Genexpression. Während FOS und FOSB einer für IEG typischerweise schnellen Aktivierungskinetik unterliegen, handelt es sich bei FRA-1 und FRA-2 um Langzeitaktivatoren der Genexpression, welche vor allem durch repetitierende Stimulation aktiviert werden. Sowohl FOS als auch JUN unterliegen einer post-translationalen Phosphorylierung durch FOS-regulierende Kinase (FRK) und c-jun N-terminal Kinase (JNK), welche beide der Regulation durch MAP-Kinasen unterliegen [124]. Die Bedeutung von FOS begründet sich vor allem durch seine wichtige Funktion in der Regulation des Zellzyklus. So wird sowohl seine transkriptionelle Aktivität als auch die de-novo Expression des Proteins durch eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren und mitogene Stimuli induziert (siehe Tabelle 16). Daran ist beinahe jedes der zuvor beschriebenen Kinase-Systeme beteiligt. Entsprechend finden sich in der Promotorregion von c-fos eine Vielzahl von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, u.a. CRE (CREB), SRE (TCF), SIE (Sis-Inducible Element) sowie AP-1RE (AP-1) (Abbildung 11) [124]. Letzteres ist für eine negative Feedback-Regulation der Expression von c-fos verantwortlich.

Ziel	Stimulus	Kinase-System	Referenz
c-fos	EGF	unbekannt	[110]
	Homozystein	JNK	[221]
	IL-1	unbekannt	[47]
	Shear-Stress	ERK1/2	[10, 11, 184, 185]
	Thrombin	CaMK	[131]
ET1	diverse	unbekannt	[133]
ICAM-1	TNF-a	unbekannt	[37, 242]
IL-8	H2O2	unbekannt	[130]
MCP-1	inflammatorische Stimuli	unbekannt	[242]
PDGF	Shear-Stress	unbekannt	[101]
tPA	PMA	unbekannt	[122]
VCAM-1	TNF-a	unbekannt	[2]

Tabelle 16: Bedeutung von c-fos für die Genexpression in Endothelzellen. Verschiedenste Wachstumsfaktoren und mitogene Stimuli bewirken eine durch FOS regulierte Expression proliferativer Genprodukte, nicht zuletzt auch von FOS selbst.

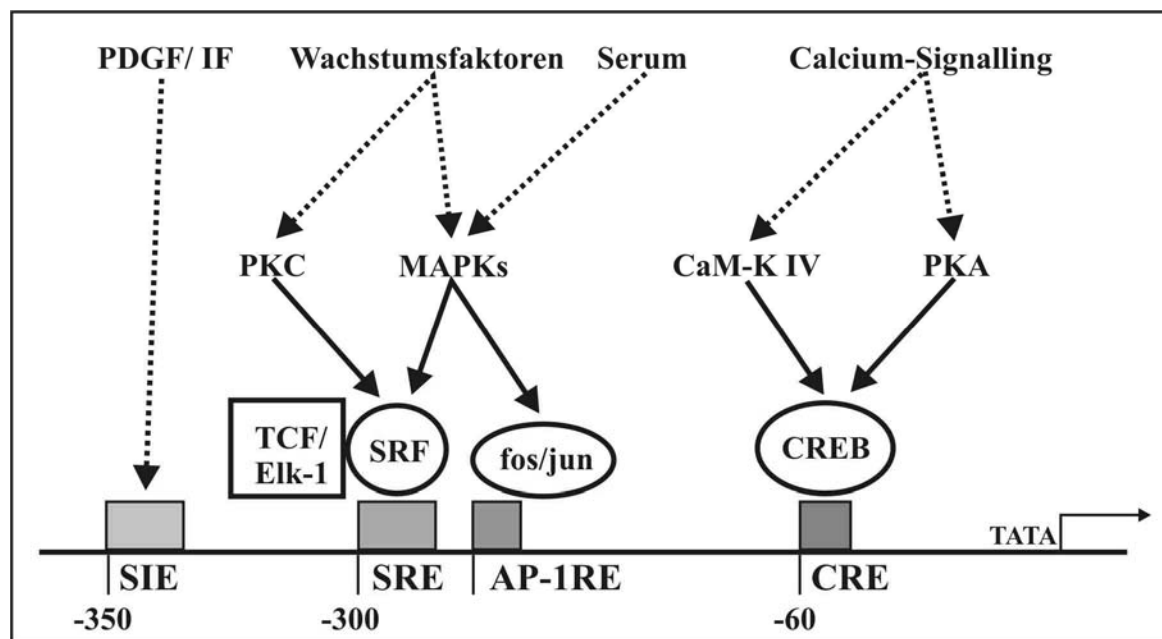


Abbildung 11: Aufbau der Promotorregion von c-fos [124].

Neben den bekannten Wachstumsfaktoren führt auch mechanischer Stress, insbesondere Shear-Stress zu einer verstärkten Induktion von c-fos [10, 11, 184, 185] sowie zu einer durch FOS vermittelten Expression von PDGF [101], worin sich seine Bedeutung für die Pathogenese der Arteriosklerose und Restenose ergibt (siehe auch Abschnitt 2.1 und 2.2).

2.3.8.3 EGR-1

Der „Early Growth Response Factor-1“ (EGR-1) gehört wie c-fos zur Gruppe der IEGs. Er ist ein typischer Vertreter der Zink-Finger Familie von Transkriptionsfaktoren und wurde 1988 von Sukhatme in serumstimulierten Fibroblasten isoliert [219]. Sein mittleres Molekulargewicht liegt bei 75-80 kDa. Das Protein besitzt drei Zink-Finger (Abbildung 12), wobei jeder aus einer α -Helix und einem β -Faltblatt, verbunden durch ein Zink-Molekül, besteht. Damit interagiert es direkt mit seiner Konsensus-Sequenz des DNA-Doppelstranges (GCGGGGGCG) [116].

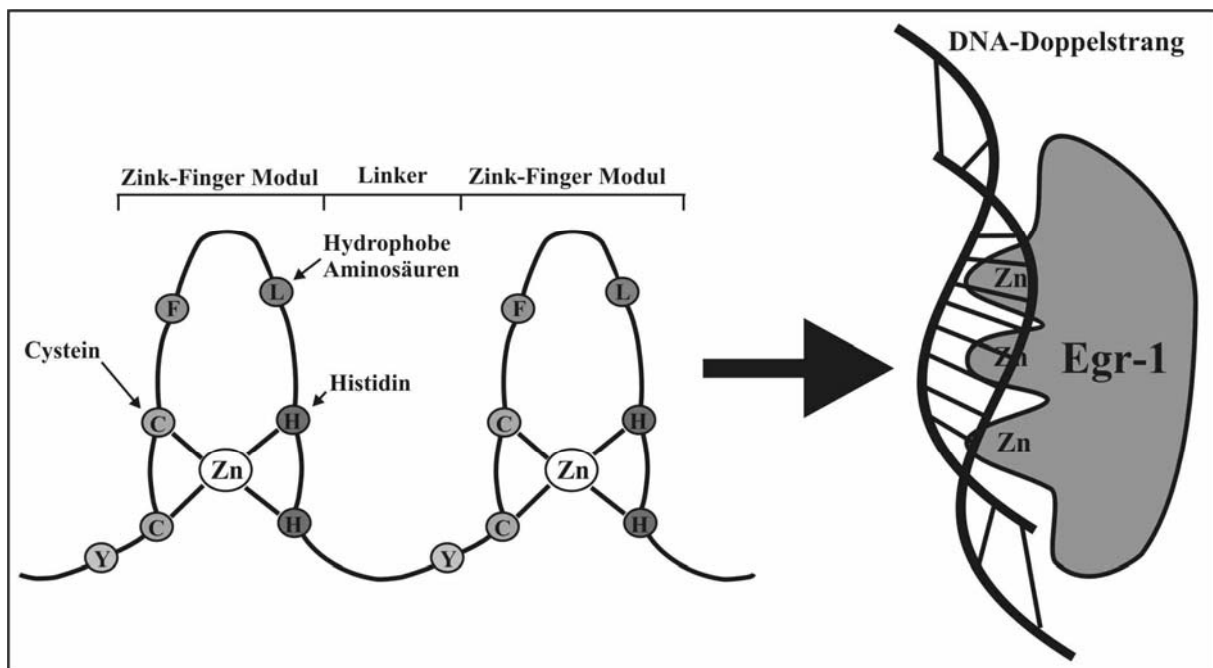


Abbildung 12: Aufbau des Zink-Finger Moduls in EGR-1 und strukturelle Interaktion zwischen EGR-1 und der DNA-Doppelhelix.

Wie FOS spielt auch EGR-1 eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus, z.B. nach mitogener Stimulation. Dementsprechend finden sich in seiner Promotorregion ähnliche Bindungssequenzen wie bei c-fos (Abbildung 13), weshalb beide Gene oftmals koexprimiert werden. Auch die Abhängigkeit von den beschriebenen Kinase-Systemen ähnelt sich bei c-fos und EGR-1 in den wesentlichen Abschnitten.

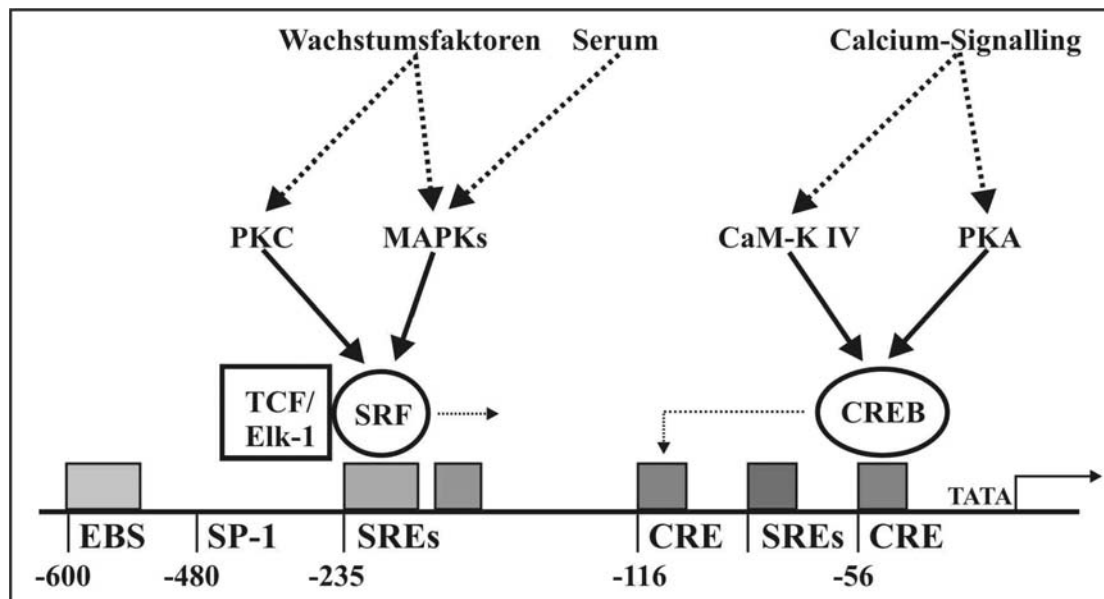


Abbildung 13: Aufbau der Promotorregion von EGR-1. Es finden sich viele Elemente, die auch schon aus der Promotorregion von c-fos bekannt sind (Abbildung 11). EBS = EGR-1 Binding Site.

Eine besondere Rolle konnte EGR-1 in der Pathogenese der Arteriosklerose und Restenose zugeordnet werden. So besitzt eine Vielzahl von Proteinen, die an der Pathogenese der Arteriosklerose beteiligt sind, eine EGR-1 Bindungsstelle in ihrer Promotorregion (Tabelle 17). Auch ist es gelungen, sowohl in arteriosklerotischen Plaques, als auch in neointimalen Restenosen erhöhte Spiegel dieses wichtigen Transkriptionsfaktors nachzuweisen [116-119]. Besonders deutlich wurde seine Bedeutung für die Pathogenese der Restenose jedoch, als es gelang, die Intimaverdickung nach Angioplastie in Carotiden der Ratte durch selektive Inhibition von EGR-1 zu unterbinden [202].

Genprodukt	Referenz
PDGF	[116-119]
TGF- β	[140]
FGF-2	[102]
TF	[53]
ICAM-1	[146]

Tabelle 17: Proatherosklerotische Faktoren, die einer Regulation durch den Transkriptionsfaktor EGR-1 unterliegen.

2.3.8.4 Der Nuclear Factor kappa B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B aus der Familie der nukleären Faktoren nimmt eine zentrale Stellung in der Regulation inflammatorischer Prozesse ein. Als solcher spielt er eine wichtige Rolle in der Initiierung und Progression der Pathogenese der Atherosklerose und ihrer Folgeerkrankungen, Glomerulonephritiden, septischem Schock, Asthma und AIDS [13, 34, 77]. Er wurde erstmals entdeckt als ein ausschließlich im Zellkern reifer B-Zellen und bestimmter monozytärer Zelllinien vorkommendes Heterodimer aus 2 Proteinen mit 50 und 65 kDa Molekulargewicht [205]. Inzwischen ist bekannt, dass es sich um eine ubiquitär in alle Gewebe vorkommende Familie von Transkriptionsfaktoren handelt, deren Mitglieder durch eine Vielzahl auch proatherogener Faktoren, wie z.B. Sauerstoffradikale, Zytokine, PKC-Aktivatoren, MAPK-Aktivatoren, LPS, etc., aktiviert werden. Die wichtigsten Mitglieder der Familie sind NF- κ B1 (p50/ p105), NF- κ B2 (p52/ p100), Rel-A (p65) und Rel-B [25, 198]. Alle tragen eine erweiterte amino-terminale Region, die sog. „Rel Homology Domain“ (RHD), welche wie FOS ein Leucin-Zipper Motiv, eine Kern-Erkennungssequenz für die Einschleusung in den Zellkern sowie eine DNA-Bindungsdomäne trägt [35]. Über das Leucin-Zipper Motiv bilden sich Dimere aus NF- κ B1/2 und Rel-A/ Rel-B, welche jedoch im Zytoplasma durch Komplexierung mit dem NF- κ B Inhibitorprotein I κ B an der Translokation in den Nukleus gehindert werden [63]. Der entscheidende Prozess in der Aktivierung von NF- κ B ist die Degradation von I κ B, wodurch die Translokation in den Zellkern und damit die transkriptionelle Aktivierung seiner Zielgene ermöglicht wird (Abbildung 14) [210].

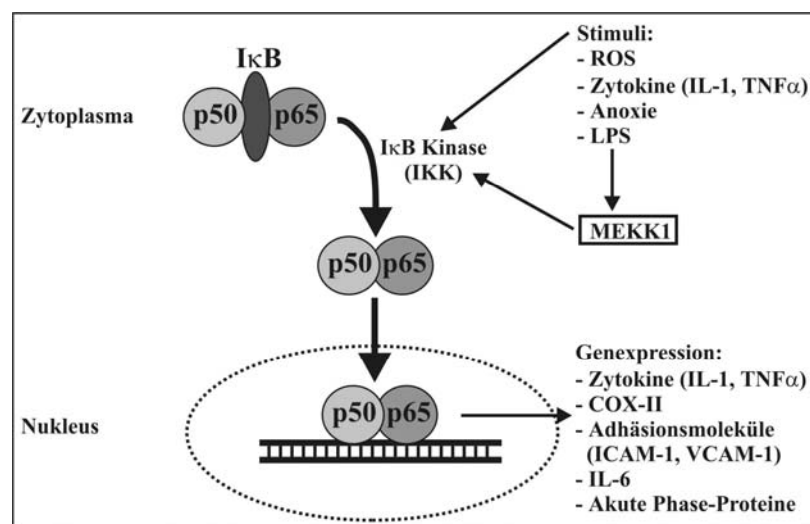


Abbildung 14: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Auslösend ist die Degradation des Inhibitors I κ B durch IK-Kinasen (IKK), welche entweder durch externe Stimuli direkt, oder durch Vertreter der MAP-Kinasefamilie (z.B. MEKK1), aktiviert werden [239].

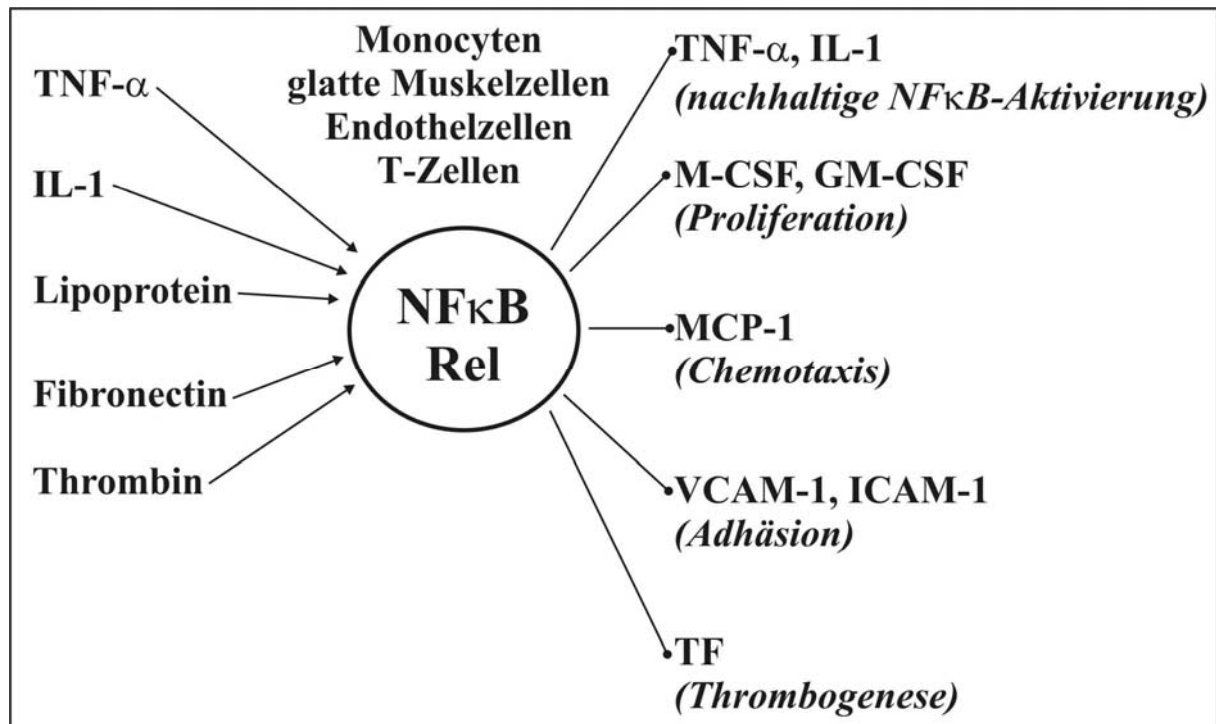


Abbildung 15: Mögliche zentrale Stellung des Transkriptionsfaktors NF-κB in der Pathogenese der Arteriosklerose und ihrer Folgeerkrankungen [29].

Die Bedeutung von NF-κB für die Pathogenese der Arteriosklerose wurde umfassend untersucht (z.B. [46]) und in Abschnitt 2.1 und 2.2 bereits umfassend dargelegt. Von Bedeutung ist dabei, dass die Expression einer Vielzahl proatherogener Faktoren in den 3 an der Atherogenese beteiligten Zellsystemen unter anderem auch durch NF-κB reguliert wird (siehe auch Tabelle 3, Tabelle 4 und Tabelle 6). Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass NF-κB eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose und ihrer Folgeerkrankungen spielt (Abbildung 15), weshalb dieser relativ neue Transkriptionsfaktor in den Mittelpunkt der Forschung gerückt ist.

3 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die große Bedeutung einer erfolgreichen Therapie und Prävention der Arteriosklerose und ihrer Folgeerkrankungen wurde in Abschnitt 1 bereits ausführlich dargestellt. Während die Grundlagen der Atherogenese in einer Vielzahl internationaler Studien in weiten Teilen aufgedeckt werden konnte, sind die Vorgänge, welche für die Ätiopathogenese der Folgeerkrankungen und Behandlungsfolgen der Arteriosklerose eine Rolle spielen, in weiten Teilen noch ungeklärt. Insbesondere die oftmals unerwartet früh eintretende Restenosierung initial erfolgreich rekanalisierter Gefäßabschnitte ist in ihren Grundzügen bislang wenig erforscht.

Es ist demnach von großer Bedeutung, die pathophysiologischen und pathobiochemischen Reaktionen vaskulärer Endothelzellen in der Folge von angioplastischen Verfahren zu untersuchen um Ansatzpunkte für neue Therapieverfahren zu finden, welche insbesondere die frühzeitige Restenose nach Angioplastie verhindern können.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die biochemische Antwort vaskulärer Endothelzellen auf die Zerstörung eines zunächst intakten Monolayers an einem in-vitro Modell zu untersuchen. Hierbei wird besonderes Augenmerk gelegt auf die Expression des an der Regulation der Zellproliferation beteiligten Transkriptionsfaktors c-fos. Es soll untersucht werden, inwieweit die Endothelzellverletzung zu einer Induktion dieses Faktors führt und welche intrazellulären Signalübertragungswege an dieser Induktion beteiligt sind. Zusätzlich wird an einem etablierten Verletzungsmodell die Expression weiterer wachstumsregulierender Transkriptionsfaktoren und Zytokine, speziell EGR-1 und MCP-1, verifiziert.

4 Materialien und Methoden

4.1 Zellkultur

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurden an humanen umbilikalvenösen Endothelzellen durchgeführt (HUVEC).

4.1.1 Reagenzien und Kulturmedien

Tabelle 18: Kulturmedium für Endothelzellversuche, 12% Fetal Calf Serum (FCS).

Bestandteil	Menge	Hersteller/ Nummer
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)	500ml	PromoCell/ C-22020
Supplement Mix/ ECGM	25ml	PromoCell/ C-39215
<ul style="list-style-type: none"> • <i>ECGS/ H</i> • <i>Fetal calf serum</i> • <i>Epidermal Growth Factor</i> • <i>Hydrocortison</i> • <i>Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)</i> • <i>Amphotericin B</i> • <i>Gentamycin</i> 	<ul style="list-style-type: none"> 0,4% 2% 0,1ng/ ml 1µg/ ml 1ng/ ml 50ng/ ml 50µg/ ml 	
Fetal Bovine Serum (FBS/ FCS)	50ml	Sigma/ F-2442

Tabelle 19: Weitere Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur.

Bestandteil	Menge	Hersteller/ Nummer
PBS_{Gentamycin}		
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Dulbecco's Phosphate-buffered saline</i> • <i>Gentamycin</i> 	<ul style="list-style-type: none"> 500ml 125ng/ ml 	<ul style="list-style-type: none"> Invitrogen/ 14040133 Fluka/ 46305
Kollagen-Lösung		
<ul style="list-style-type: none"> • <i>PBS_{Gentamycin}</i> • <i>Collagen G</i> 	<ul style="list-style-type: none"> 3mg/ ml 	<ul style="list-style-type: none"> Seromed/ L-7213
Chymotrypsin-Lösung		
<ul style="list-style-type: none"> • <i>PBS_{Gentamycin}</i> • <i>Chymotrypsin</i> 	<ul style="list-style-type: none"> 1mg/ ml 	<ul style="list-style-type: none"> Sigma/ C-6423

4.1.2 Präparation und Kultur der Endothelzellen

Die Zellkultur erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei 37°, 5% CO₂ und 90% rel. Luftfeuchte in einem industriellen Inkubator. Als Kulturbedeignis wurden Plexiglas-Petrischalen und Plexiglas-Kulturkolben verwendet, die zur besseren Adhäsion der Endothelzellen zuvor mit Kollagen beschichtet wurden (Kollagen-Lösung, Tabelle 19).

4.1.2.1 Präparation der Endothelzellen

Die verwendeten Endothelzellen wurden aus Nabelschnüren komplikationslos und gesund geborener Säuglinge präpariert. Post partum wurden die Nabelschnüre unter permanenter Kühlung bei +4° in das Labor verbracht. Nabelschnüre, die älter als 2 Tage oder nicht permanent gekühlt waren, wurden verworfen.

Die Präparation der Zellen erfolgte nach etablierten Methoden [1]. Die Nabelschnüre wurden zunächst gewaschen mit auf 37° angewärmtem PBS, welches zur Wahrung der Keimfreiheit mit Gentamycin versetzt wurde. Anschließend wurden sie unter sterilen Bedingungen hängend in einen Ständer gespannt, die Umbilikalvene mit einer Hohlnadel sondiert und am oberen Ende mit einer sterilen Klammer abgedichtet. Über die Hohlnadeln wurde das Gefäß zunächst zweimal mit je 10ml einer auf 37° angewärmten PBS-Lösung, anschließend zweimal mit einer auf 37° angewärmten Lösung aus PBS und Chymotrypsin gespült. Schließlich wurde das Gefäß auch am unteren Ende mit einer sterilen Klemme abgedichtet, mit 10ml der Chymotrypsin-Lösung gefüllt und der Ansatz für 20min bei 37° im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurden die Klammern entfernt und die Flüssigkeit mit den nun darin gelösten Zellen in einen sterilen Kolben verbracht. Der Ansatz wurde bei 800rpm für 10min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die gewonnenen Zellen in 7ml angewärmtem Kulturmedium gelöst. Dieser Primäransatz wurde in kollagenbeschichtete Kulturkolben mit einem Volumen von 50ml verbracht und im Brutschrank kultiviert, bis ein konfluenter Zellrasen entstanden war (siehe Abbildung 16). Bei diesem Primäransatz erfolgte der Mediumwechsel zunächst nach 2h und 24h, dann alle 3Tage.

4.1.2.2 Kultur der Endothelzellen

Die Überprüfung des Zelltypus erfolgte anhand der Zellmorphie, welche das typische Bild eines konfluenten kultivierten Endothelzellmonolayers ergeben musste (Abbildung 16). Sobald der Zellrasen im Primäransatz konfluent war, wurde die Zellkultur gesplittet. Hierfür wurde der Kulturkolben zunächst mit 3ml einer auf 37° angewärmten Chymotrypsin-Lösung

gespült und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden erneut 3ml der Chymotrypsin-Lösung eingebracht und der Ansatz für 5min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen durch leichtes Beklopfen des Brutkolbens von der Unterfläche abgelöst und der gesamte Ansatz mit 170ml frischem, angewärmtem Kulturmedium verdünnt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde direkt auf frische kollagenisierte Petrischalen und Kulturkolben (Gesamtvolumen 140ml) ausgesät (je 10ml pro Einheit). Dies ergab den Sekundär- oder Versuchsansatz, welcher für die Experimente herangezogen wurde. Die neu angesetzten Kulturkolben dienten der Weiterführung des Primäransatzes. Jede Präparation wurde für insgesamt 5 Zyklen auf die beschriebene Weise kultiviert und für Experimente verwendet, bevor eine neue Präparation durchgeführt wurde. Es erfolgte ein Mediumwechsel nach 3 Tagen. Die Durchführung der Versuche erfolgte nach 7 Tagen ohne neuerlichen Mediumwechsel, um die Zellen vor Durchführung der Versuche nicht erneut zu stimulieren. Das Splitting der Zellen zur Weiterführung der Präparation erfolgte nach 7 Tagen.

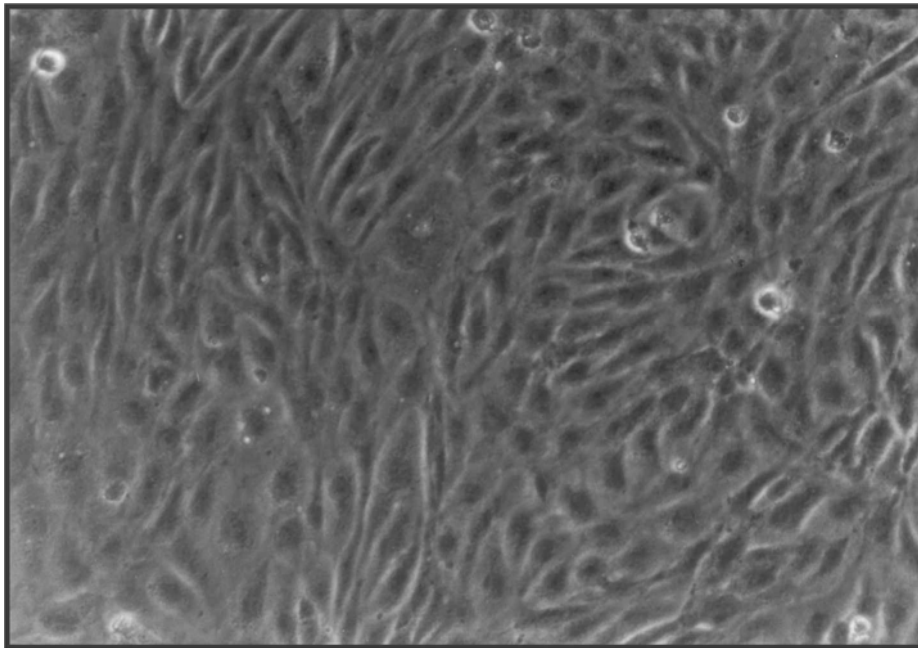


Abbildung 16: Konfluenter Endothelzellmonolayer mit typischer Morphologie kultivierter vaskulärer Endothelzellen (Lichtmikroskopische Aufnahme, 400fache Vergrößerung).

4.2 Durchführung der Versuche

4.2.1 Verwendete Substanzen und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Lösungen in autoklaviertem doppeltdestilliertem Reinstwasser angesetzt und anschließend durch einen 0,2µm Sterilfilter filtriert. Einige der verwendeten Inhibitoren erforderten eine Rekonstitution in Ethanol oder DMSO. Eine mögliche Zytotoxizität sowie eine potentielle Beeinflussung der Experimente wurden durch Mitführung von Negativ-Kontrollen in den jeweiligen Versuchen sowie in Vorversuchen ausgeschlossen.

Tabelle 20: Kulturmedien und Lösungen für die Durchführung der Experimente.

Bestandteil	Menge	Hersteller/ Nummer
ECGM, frei von FCS und Wachstumsfaktoren	500ml	PromoCell/ C-22020
Inkubationspuffer (pH7.4)	1000ml	
• <i>CaCl₂ (optional!)</i>	1mM	
• <i>KCl</i>	2,7mM	
• <i>NaHCO₃</i>	25mM	
• <i>KH₂PO₄</i>	1,4mM	
• <i>HEPES</i>	20mM	
• <i>NaCl</i>	120mM	
• <i>MgSO₄</i>	0,7mM	
• <i>D-Glucose</i>	10mM	

Tabelle 21: Übersicht über die verwendeten Stimuli.

Stimulus	[c]	Lösungsmittel	Hersteller/ Nummer
TNF-α, rekombinant E. coli	10IU	FCS	Upstate/ 01-164
PMA	10nM/ 600nM	DMSO	Sigma/ P-1585
PDGF-AB, rekombinant E. Coli	10ng/ ml	FCS	Upstate/ 01-310

Tabelle 22: Übersicht über die verwendeten Inhibitoren.

Stimulus	[c]	Lösungsmittel	Hersteller/ Nummer
Choleratoxin	1:1000	H ₂ O	Sigma/ C3012
Pertussistoxin	1:500	H ₂ O	Sigma/ P2980
Herbimycin A	5µM	DMSO	Biomol/ EI-227
Genistein	5µM	DMSO	Biomol/ EI-147
EGTA	2mM	H ₂ O	Sigma/ E-3889
BAPTA-AM	10-50µM	DMSO	Calbiochem/ 196419
A23187	5µM	DMSO	Fluka/ 21045
Lanthan-Trichlorid	10-50µM	H ₂ O	Sigma/ L4131
Thapsigargin	100nM	DMSO	Calbiochem/ 586005
TMB-8	10-100µM	DMSO	Sigma/ T-3288
KN-62	10µM	DMSO	Calbiochem/ 422706
PKI 14-22	500nM	H ₂ O	Biomol/ P-210
Ro-31-8220	3µM	DMSO	Calbiochem/ 557520
PD 98059	50-100µM	DMSO	Biomol/ EI-360
SB 203580	10-100µM	DMSO	Biomol/ EI-286

4.2.2 Durchführung der Verletzungsversuche

Um die Verletzung vaskulärer Endothelzellmonolayer wie z.B. durch angioplastische Verfahren zu simulieren, wurde ein standardisiertes in-vitro Verfahren angewendet [1]. Hierzu wurde ein eigens angefertigtes, kamm-ähnliches Instrument verwendet, das genau den Abmessungen einer Petrischale entspricht und an dessen Unterseite sich ca. 20 „Zähne“ im Abstand von je 0,5mm befinden. Wird das Instrument in die zuvor entleerte, konfluent bewachsene Kulturschale gesetzt und um 180° gedreht, dann werden aus dem Zellmonolayer kreisförmig 10-20 Zellreihen herausgelöst (Abbildung 17).

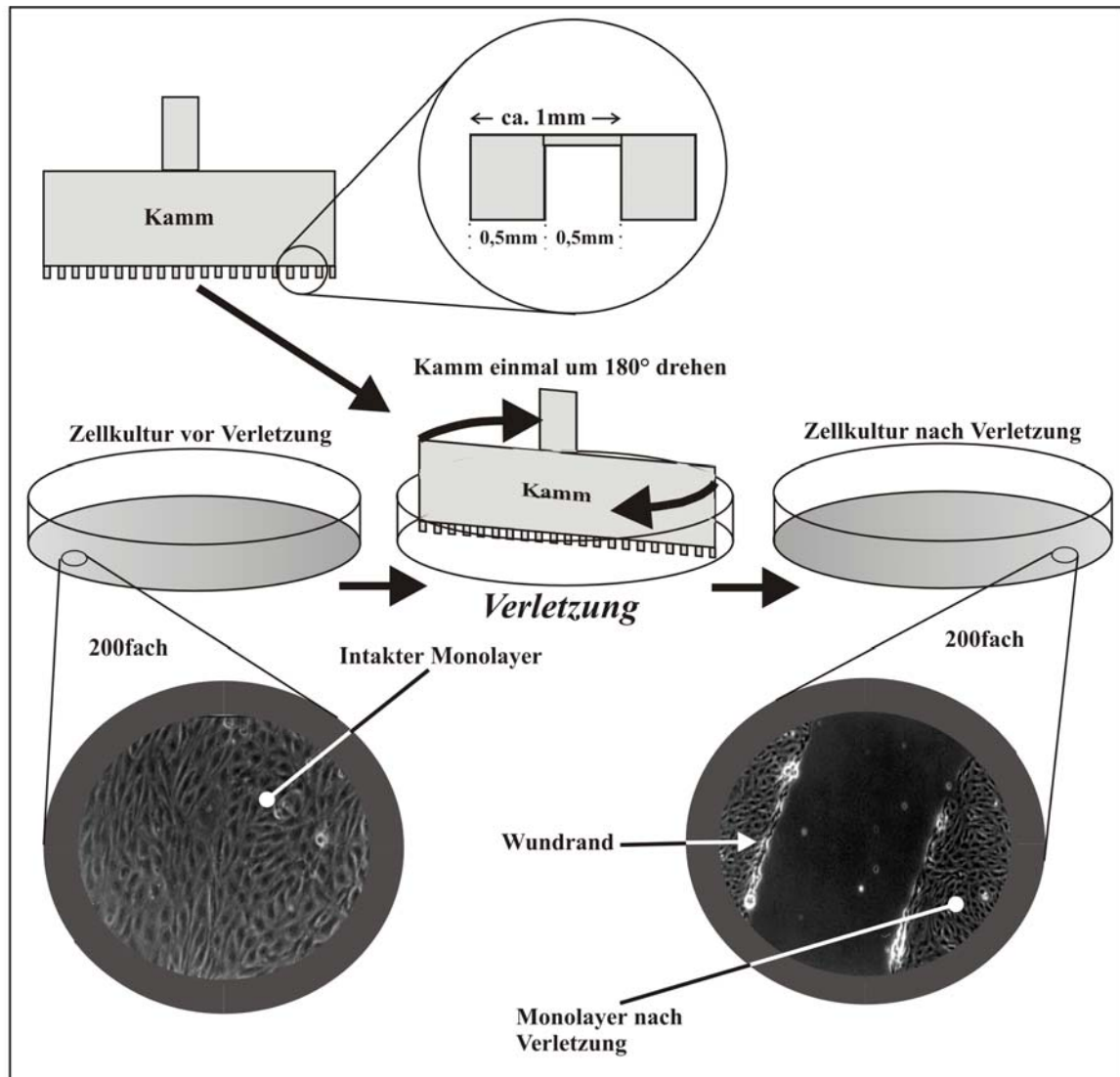


Abbildung 17: Modell der Endothelzellverletzung in vitro [1].

Inhibitoren der Signalübertragung wurden vor der Durchführung der Verletzung zugegeben und für die angegebene Zeit inkubiert. Hierzu musste zunächst das seit dem letzten Mediumwechsel verdunstete Medium auf 10ml ergänzt werden, um identische Versuchsvolumina zu erhalten. Bei einigen Versuchen über die Calcium-abhängige Signalübertragung wurde das Kulturmedium vor der Versuchsdurchführung komplett durch einen speziellen Inkubationspuffer ersetzt (Tabelle 20). Die jeweiligen verwendeten Konzentrationen und Stimulationszeiten der verwendeten Stimuli und Inhibitoren sind bei der Versuchsbeschreibung angegeben.

Für die Durchführung der eigentlichen Verletzung wurde zunächst das Kultur- oder Inkubationsmedium an einem sterilen Arbeitsplatz mit Abzugsgebläse entfernt und für jede Kulturschale getrennt gesammelt. Dann erfolgte zügig die Verletzung des Monolayers. Anschließend wurden die Kulturschalen gewaschen mit 10ml PBS, welches zuvor auf 37°

angewärmt wurde. Zuletzt wurde das Kultur- oder Inkubationsmedium wieder vorsichtig in die Kulturschalen gefüllt und die Zellen für die jeweils angegebene Zeit im Brutschrank inkubiert. Kulturschalen, die nicht einer Verletzung unterzogen wurden, sondern alternativ Kontrollstimuli wie TNF- α erhielten, wurden identisch behandelt.

Da durch die Verletzung etwa 50% der Zellmasse verloren gehen, mussten, um eine entsprechende Ausbeute an RNA zu erhalten, für die Verletzungsversuche jeweils zwei identische Ansätze erfolgen.

Jeder der in Abschnitt 5 beschriebenen Versuche wurde jeweils 3 Mal durchgeführt.

4.3 RNA-Isolierung und Northern-Blot Analysen

4.3.1 Verwendete Substanzen und Reagenzien

Alle angegebenen Lösungen wurden in steril autoklaviertem DEPC-H₂O angesetzt. DEPC (Diethylen-Pyrocyanat) ist ein RNase-Inhibitor.

Tabelle 23: Lösungen für die RNA-Extraktion.

Bestandteil	Menge	Hersteller/ Nummer
Purescript RNA-Extraction Kit		Gentra/ R5000A
• <i>Cell Lysis Solution</i>		<i>Gentra/ R5002</i>
• <i>RNA Hydration-Solution</i>		<i>Gentra/ R5004</i>
Ethanol 99,9%		Fluka/ 02483
Isopropanol		Fluka/ 40219

Tabelle 24: Lösungen für das Vakuum-Blotting.

Bestandteil	Menge	Hersteller/ Nummer
20 x SSC Blottingpuffer	1000ml	
• <i>NaCl</i>	<i>3M</i>	
• Na-Citrat	<i>300mM</i>	
Blotting-Lösung 5 x SSC	1000ml	
• <i>20 x SSC</i>	25 Vol-%	
• NaOH 10N	0,1 Vol-%	
Nytran-Membran 0,45μm		Schleicher&Schuell/ 10 416 196

Tabelle 25: Lösungen für die Gelelektrophorese.

Bestandteil	Menge	Hersteller/ Nummer
10 x MOPS Elektrophoresepuffer	1000ml	
• <i>MOPS (Morpholinopropanesulfonic acid)</i>	500mM	
• <i>Na-Acetat</i>	500mM	
• <i>EDTA</i>	500mM	
RSB Probenpuffer für Elektrophorese	10ml	
• <i>Formamid 99%</i>	50 Vol-%	Sigma/ F 7508
• <i>Formaldehyd 37%</i>	17,5 Vol-%	Supelco/ PS2031
• <i>10 x MOPS</i>	10 Vol-%	
RLP Probenpuffer für Elektrophorese	10ml	
• <i>Ficoll 400</i>	1,5g	Sigma/ F 1418
• <i>10 x MOPS</i>	50 Vol-%	
• <i>Ethidiumbromid</i>	240mM	Sigma/ E 4391
• <i>Bromophenolblau</i>	13,4mM	Sigma/ B 0126
Agarose-Gel	150ml	
• <i>Agarose</i>	1,5g	Fluka/ 05068
• <i>Formaldehyd 37%</i>	18 Vol-%	Supelco/ PS2031
• <i>10 x MOPS</i>	10 Vol-%	

4.3.2 RNA-Extraktion

Im Anschluss an die Durchführung der Verletzungsversuche wurde aus den Zellen die totale zelluläre RNA isoliert. Hierfür wurde ein kommerzielles Kit der Firma Gentra Systems, Minneapolis USA, verwendet. Zunächst wurden die Kulturschalen nach Ablauf der Stimulationszeit mit angewärmten PBS gewaschen und die Flüssigkeit abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 600µl der Cell Lysis Solution aufgeschlossen. Nach 5 min wurde das zelluläre Lysat mit einem sterilen Schaber von der Oberfläche der Kulturschale abgeschabt und in sterilisierte, gekühlte 1,5ml Eppendorf-Cups überführt. Durch Zugabe von 200µl der Protein-DNA-Precipitation Solution kommt es zu einem Niederschlag aller gelösten Protein- und DNA-Bestandteile. Der Ansatz wurde für 5min auf Eis gekühlt und anschließend bei 80.000rpm und 4° C für 5min zentrifugiert

(Kontron Table-Top Ultrazentrifuge). Der Überstand wurde in frische sterile 1,5ml Eppendorf-Cups überführt. Durch Zugabe von 600µl Isopropanol kommt es zu einem Ausfällen der gelösten RNA, welche durch erneutes Zentrifugieren in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 14.000rpm für 3min pelletiert wurde. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet durch Zugabe von 1ml 70% Ethanol gewaschen und erneut für 1min in einer Tischzentrifuge bei 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100µl DEPC-H₂O gelöst. Die nun fertige RNA-Probe wurde beschriftet und bei -20° bis zur Durchführung der Gelelektrophorese eingefroren.

Vor Verwendung der RNA wurde die gewonnene Konzentration photometrisch bestimmt und auf eine Endkonzentration der Probe von 0,5µg/ µl eingestellt.

4.3.3 RNA Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden standardisierte Agarose-Gele mit einem Volumen von 150ml und 20 Wells in einer Standard-Apparatur (Sub-Cell 192, Bio-Rad, USA) verwendet.

Von jeder Probe wurden je 10µg RNA verwendet. Diese wurden zunächst in ein steriles Eppendorf-Cup überführt und das Lösungsmittel durch zentrifugieren in einer Speed-Vac Vakuum-Zentrifuge verdampft. Anschließend wurde das Pellet mit 16µl des RSB-Probenpuffers und 4µl des RLB-Probenpuffers gelöst. Der Ansatz wurde für 15min bei 60° inkubiert, um eine Enthelikalisierung der RNA zu bewirken. Dadurch werden die Laufeigenschaften im Agarose-Gel verbessert. Die Ansätze wurden anschließend in die entsprechenden Wells des Agarose-Gels überführt und die Elektrophorese mit 1,5l 1 X MOPS Elektrophoresepuffer bei einer Spannung von 100V über 4h durchgeführt. Um eine übermäßige Wärmeentwicklung zu verhindern, wurde der Laufpuffer mittels einer Umwälzpumpe gekühlt.

Im Anschluss an den Elektrophorese-Lauf wurde die Qualität des Ergebnisses unter einer UV-Lampe kontrolliert. Kriterien zur Beurteilung der Qualität waren eine gleichmäßige Größe der Banden sowie eine symmetrische Laufrichtung und Laufweite (Abbildung 18).

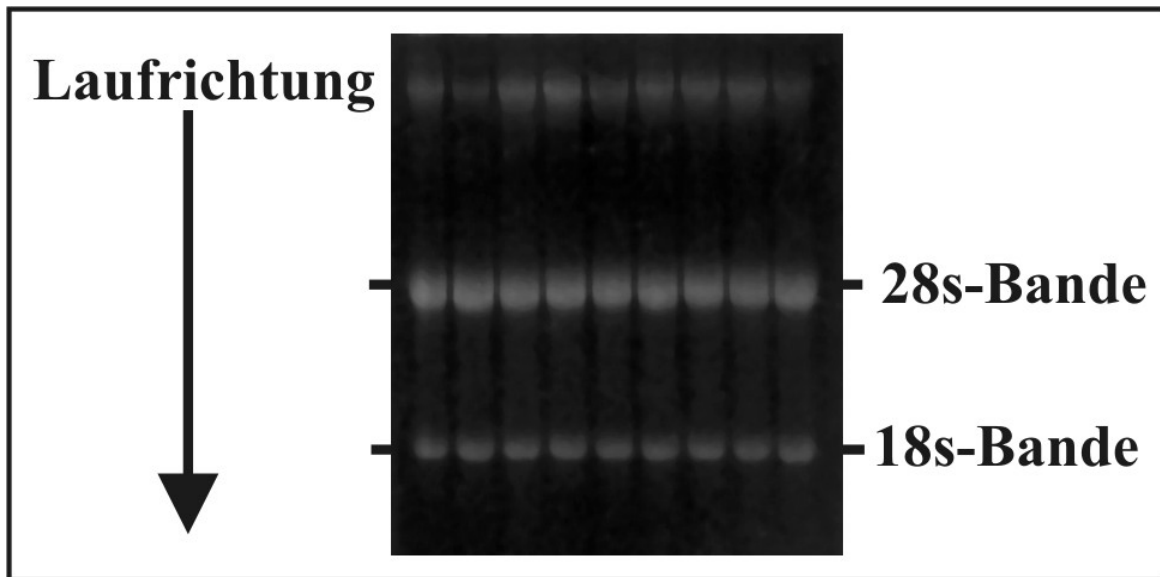


Abbildung 18: UV-Licht Aufnahme einer erfolgreich durchgeführten RNA Gelelektrophorese. Durch das unter UV-Licht fluoreszierende Ethidiumbromid wird die 28s- und 18s-Bande der aufgetragenen RNA sichtbar gemacht.

4.3.4 Vakuum-Blotting

Bevor die durch Gelelektrophorese aufgetrennten RNA-Proben für die Hybridisierung mit Riboprobes verwendet werden können, muss die im Gel vorhandene RNA auf Filtermembranen übertragen werden, welche dann für die eigentliche Elektrophorese verwendet werden können.

Hierzu wurde die im Gel gelöste RNA mittels einer Vakuum-Apparatur (VacuGene XL, Amersham, USA) auf eine Nitrocellulose-Membran (Nytran N, Schleicher & Schuell) mit einer Porengröße von $0,45\mu\text{m}$ übertragen. Als Blottingpuffer wurde eine 5 X SSX/ NaOH-Lösung verwendet. Der Blot dauerte 2h. Anschließend wurde die übertragene RNA durch hochenergetische UV-Licht Impulse fest mit der Membran verbunden (sog. Linking). Zuletzt wurden die Membranen nach einer Trocknungsphase von ca. 2h bis zur endgültigen Verwendung in sterile Plastikfolie eingeschweißt. Die vollständige Übertragung der RNA auf die Membran wurde durch Kontrolle von Membran und Gel unter UV-Licht sichergestellt. Nach einem erfolgreichen Blot durfte im Gel keine RNA-Bande mehr nachweisbar sein.

4.4 RNA-Hybridisierung der Northern-Blots

4.4.1 Verwendete Substanzen und Reagenzien

Alle angegebenen Lösungen wurden in steril autoklaviertem DEPC-H₂O angesetzt. Das radioaktiv markierte CTP wurde jeweils am Tag der Hybridisierung frisch vom Hersteller (Amersham) bezogen.

Tabelle 26: Lösungen für die Synthese der Riboprobes.

Bestandteil	Menge	Hersteller/ Nummer
SP6-RNA-Polymerase		Promega/ P1081
T7-RNA-Polymerase		Promega/ P2075
RNase freie DNase		Promega/ M6101
RNasin RNase-Inhibitor		Promega/ N2111
5 x Transkriptionspuffer		Promega/ P1181
DTT	100mM	Promega/ P1171
NTP-Mix		
• <i>ATP</i>	2,5mM	Promega/ P1132
• <i>UTP</i>	2,5mM	Promega/ P1171
• <i>GTP</i>	2,5mM	Promega/ P1152
[α-³²P]-CTP	800Ci/ mmol	Amersham/ P20382
CTP	0,1mM	Promega/ P1142
10 x DNase I-Puffer		
• <i>Tris-HCl</i>	500mM	
• <i>MgCl₂</i>	50mM	
1 x STE		
• <i>NaCl</i>	100mM	
• <i>Tris-HCl</i>	20mM	
• <i>EDTA</i>	10mM	

Tabelle 27: Lösungen für die Hybridisierung.

Bestandteil	Menge	Hersteller/ Nummer
20 x SSPE		
• <i>NaCl</i>	3,6M	
• <i>Na₂HPO₄ x 2H₂O</i>	0,2M	
• <i>EDTA</i>	20mM	
50 x Denhardt	100ml	
• <i>Ficoll 400</i>	1%	
• <i>Polyvinylpyrrolidone (PVP)</i>	1%	
• <i>Bovines Serum-Albumin (BSA)</i>	1%	
• <i>EDTA</i>	1mM	
Salmon Sperm DNA	10mg/ ml	Sigma/ D1626
Hybridisierungslösung	10ml	
• <i>Formamid 99%</i>	50 Vol-%	Sigma/ F 7508
• <i>20 x SSPE</i>	25 Vol-%	
• <i>50 x Denhardt</i>	4 Vol-%	
• <i>SDS</i>	20 Vol-%	
• <i>Salmon Sperm DNA</i>	0,1mg/ ml	
Waschlösung	1000ml	
• <i>20 x SSPE</i>	1 Vol-%	
• <i>SDS</i>	0,1 Vol-%	
HiSalt-Lösung	1000ml	
• <i>20 x SSC</i>	10 Vol-%	
• <i>SDS</i>	0,1 Vol-%	

Tabelle 28: Art, Größe und Herkunft der zur Synthese der Riboprobes verwendeten cDNA.

cDNA	RNA-Polymerase	Größe und Herkunft der cDNA
c-fos	T7-Polymerase	0,48kB c-fos Fragment, Exon 4, Mensch
EGR-1	SP6-Polymerase	2,6kB EGR-1 Fragment, Maus
MCP-1	T7-Polymerase	0,8kB MCP-1 Fragment, Maus
GAPDH	SP6-Polymerase	0,8kB GAPDH Fragment, Ratte

4.4.2 Synthese der radioaktiven Riboprobes

Zur Synthese der radioaktiven Riboprobes wurde 1 µg der linearisierten cDNA des gesuchten Genes mit 5 x Transkriptionspuffer, DTT, NTP-Mix sowie kaltem CTP versetzt. Die Synthese wurde gestartet durch Zugabe des radioaktiv markierten CTP, RNasin und der entsprechenden RNA-Polymerase (siehe Tabelle 28). Der Ansatz wurde für 1h bei 37° inkubiert. Anschließend wurde die noch vorhandene DNA durch Zugabe von DNase I-Puffer, RNase freie DNase und Inkubation für 15min bei 37° denaturiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden aus der Probe entfernt durch Reinigung über eine Chromatographie-Säule (NucTrap, StrataGene USA). Der Einbau radioaktiven Phosphors in die fertige Riboprobe wurde mittels eines Szintillations-Zählers gemessen, um bei der Hybridisierung eine definierte Menge der radioaktiven Riboprobe zusetzen zu können.

4.4.3 Durchführung der Hybridisierung

Die getrockneten Membranen mit den RNA-Proben wurden zunächst mit HiSalt-Lösung befeuchtet und in hitzefeste Hybridisierungsröhrchen aus Glas (Hybaid HB-OV BS) bestückt. Anschließend wurden 8ml der Hybridisierungslösung zugegeben und der Ansatz für 2h bei 60° in einem Hybridisierungsöfen (Hybaid Mini Oven MkII) prähybridisiert. Dadurch wurden unspezifische DNA-RNA- sowie Protein-RNA-Interaktionen geblockt.

Für die eigentliche Hybridisierung wurde im Anschluss die Hybridisierungslösung erneuert und die radioaktive Riboprobe zugegeben. Die spezifische Aktivität der zugegebenen Menge der Riboprobe betrug konstant 2Mio. counts/ ml Hybridisierungslösung. Der Ansatz wurde für 12h bei 65° im Ofen hybridisiert.

Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Membranen mit angewärmter Waschlösung in 3 Waschgängen à 45 und zweimal 30min von nicht gebundenen Riboprobes gereinigt, luftgetrocknet und schließlich in sterile Plastikfolie eingeschweißt. Die Exposition der Röntgenfilme erfolgte bei -80°, da die verwendeten Verstärkerfolien bei dieser Temperatur ihren optimalen Arbeitspunkt hatten. Die Expositionszeit richtete sich nach der messbaren Aktivität der Membranen und lag im Schnitt zwischen 2 und 24h. Zuletzt wurden die exponierten Filme bei Rotlicht nass entwickelt und getrocknet.

Standardmäßig wurde bei jedem Versuch eine Hybridisierung mit GAPDH durchgeführt, um einen gleichmäßigen Probenauftrag überprüfen zu können.

Die Auswertung der Filme erfolgte zunächst rein visuell durch Vergleich der Bandenstärke. Zusätzlich erfolgte eine densitometrische Auswertung der Banden mithilfe eines Laser-Densitometers sowie die Auswertung der Messwerte mittels kommerzieller Software (Scanalytics ZeroScan), um auch geringe Unterschiede in der Expression quantifizieren zu können sowie um Effekte durch ungleichmäßigen Probenauftrag ausschließen zu können.

4.5 Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

4.5.1 Technischer Hintergrund

Der Nachweis der Stimulation eines Genproduktes auf der Ebene der Transkription ist nicht beweisend dafür, dass im Anschluss daran die mRNA aus dem Zellkern ausgeschleust und das zugehörige Protein transkribiert wird. Ein hoher Prozentsatz der gebildeten mRNA wird nach dem Transport aus dem Zellkern wieder zerstört, ohne dass die Synthese des spezifischen Proteins stattfindet.

Gerade für den Nachweis aktivierter Transkriptionsfaktoren im Zellkern bietet sich die Methodik des sog. „electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA) an. Sie beruht auf der Interaktion eines aktivierten Transkriptionsfaktors mit seiner zugehörigen Erkennungssequenz auf dem DNA-Strang, welche hoch spezifisch ist für den jeweiligen Transkriptionsfaktor. Zur Durchführung des EMS-Assays werden demnach kurze DNA-Stränge (sog. Oligonukleotide) benötigt, die genau die Bindungssequenz für den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor enthalten. Im Gegensatz zur Northern-Blot Analyse wird bei dem EMS-Assays nicht die totale zelluläre RNA sondern das gesamte nukleäre Protein im Anschluss an die Stimulation der Zelle extrahiert. Die Oligonukleotide werden mit Hilfe von Polynukleotidkinasen und radioaktiv markiertem ATP mehrfach reproduziert und dabei radioaktiv markiert. Anschließend wird der nukleäre Proteinextrakt mit den markierten Oligonukleotiden inkubiert und der gesamte Ansatz mit Hilfe einer Acrylamid-Gel Elektrophorese aufgetrennt. Sollte es in der stimulierten Zelle zur Aktivierung des gesuchten Transkriptionsfaktors gekommen sein, so wird dieser an das markierte Oligonukleotid binden. Es entsteht ein Komplex, der wesentlich größer und schwerer ist als das ungebundene Oligonukleotid und somit auch schlechtere Laufeigenschaften in der Elektrophorese besitzt (Abbildung 19). Analog zur Northern-Blot Analyse werden die EMS-Assays mittels Autoradiographie auf einem Röntgenfilm ausgewertet.

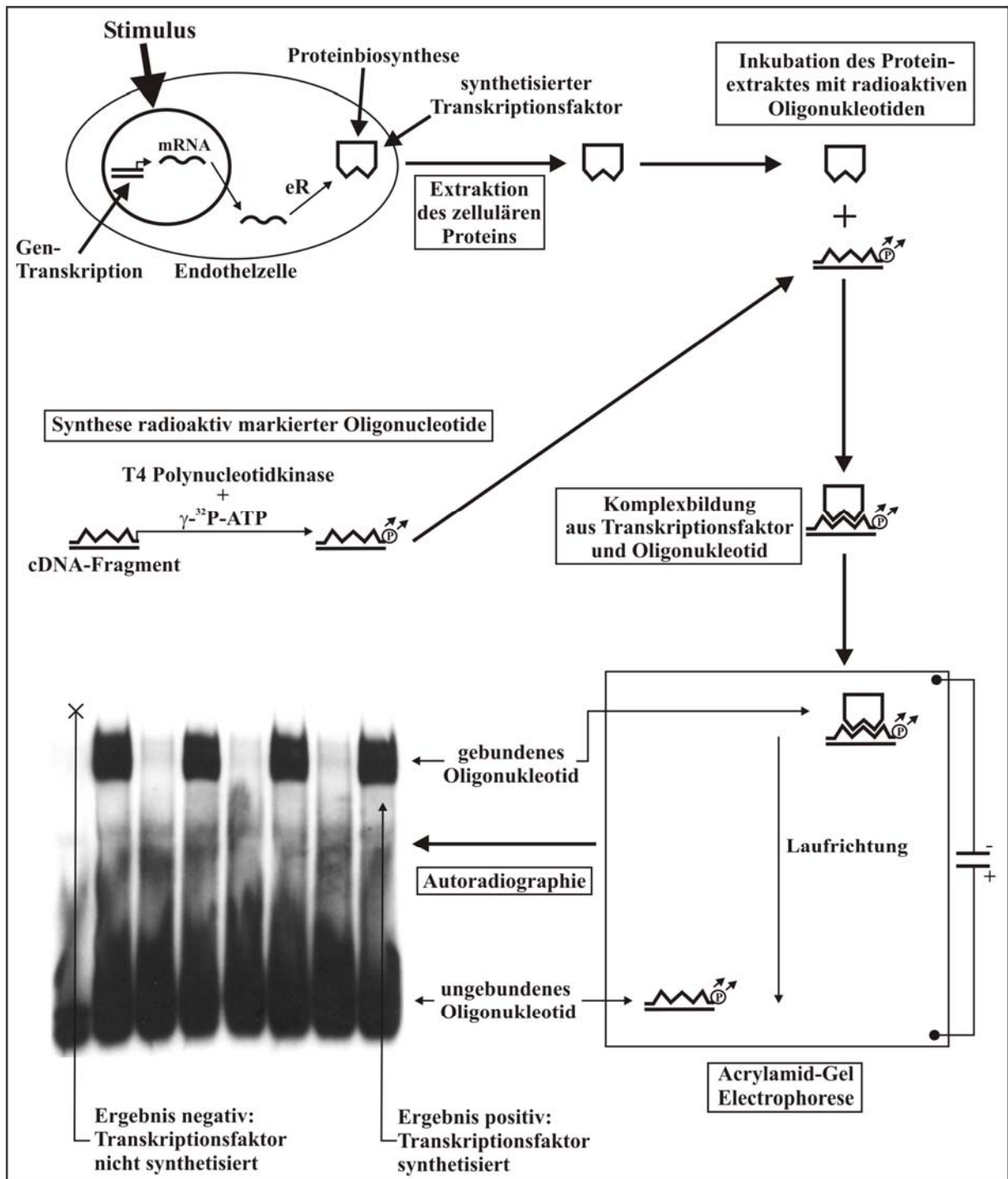


Abbildung 19: Prinzip des Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

4.5.2 Lösungen und Reagenzien für die Proteinextraktion

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Lösungen in steril autoklaviertem doppelt-distilliertem Reinstwasser angesetzt. Alle Pufferlösungen für die Proteinextraktion wurden jeweils vor der Verwendung frisch angesetzt.

Tabelle 29: Lösungen und Reagenzien für die nukleäre Proteinextraktion.

Bestandteil	Menge	Hersteller/ Nummer
Dulbecco's Phosphate-buffered saline	500ml	Invitrogen/ 14040133
Hypotoner Lyse-Puffer (Puffer 1)	100ml	
• <i>HEPES</i>	10mM	
• <i>MgCl₂</i>	1,5mM	
• <i>KCl</i>	10mM	
• <i>Aprotinin (Serin-Protease Inhibitor)</i>	1,1µg	Sigma/ A 3886
Extraktionspuffer (Puffer 2)	100ml	
• <i>HEPES</i>	20mM	
• <i>Glycerol</i>	25 Vol-%	
• <i>MgCl₂</i>	1,5mM	
• <i>NaCl</i>	0,42M	
• <i>EDTA</i>	0,2mM	
• <i>DTT (1,4-Dithio-DL-threitol)</i>	0,2mM	Fluka/ 43815
Aufbewahrungspuffer (Puffer 3)	100ml	
• <i>HEPES</i>	20mM	
• <i>Glycerol</i>	20 Vol-%	
• <i>KCl</i>	100mM	
• <i>EDTA</i>	0,05mM	
• <i>Nonidet P40</i>	1 Vol-%	Calbiochem/ 492017
• <i>PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluorid)</i>	5mM	Sigma/ P 7626

4.5.3 Herstellung des nukleären Extraktes

Nach Beendigung der Stimulationszeit wurden die Kulturschalen zunächst mit 10ml auf 37° angewärmtem PBS gewaschen und die Flüssigkeit abgesaugt. Anschließend wurde der Zellrasen nach neuerlicher Zugabe von 2ml PBS mit einem sterilen Plastischaber abgeschabt und die Suspension in sterile Reagenzgläser mit einem Volumen von 10ml überführt. Durch Zentrifugation bei 1851g für 10min wurden die gelösten Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in Puffer 1 resuspendiert. Dabei entsprach das zugegebene Volumen an Puffer 1 dem 4-fachen des geschätzten Volumens des Pellets,

durchschnittlich etwa 150µl. Der Ansatz wurde für 15min auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend in einem Ultraschallbad aufgeschlüsselt. Die erfolgreiche Lyse der Zellen wurde durch Anfertigung und Färbung eines Ausstrichs der Suspension mit Trypanblau-Lösung verifiziert. Der Ansatz wurde anschließend für 5min bei 1320g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das nun gebildete Pellet enthielt nur noch die Zellkerne.

Für die Extraktion des nukleären Proteins wurde das Pellet zunächst resuspendiert durch Zugabe des identischen Volumens an Puffer 2. Der Ansatz wurde für 5min bei 16420g zentrifugiert. Im Überstand befindet sich nun das nukleäre Extrakt. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5ml Eppendorf-Cup überführt, durch Zugabe eines identischen Volumens an Puffer 3 haltbar gemacht und anschließend bei -80° bis zur endgültigen Verwendung aufbewahrt.

Zur Bestimmung der gewonnenen Protein-Konzentration wurde ein standardisiertes photometrisches Verfahren verwendet.

4.5.4 Lösungen und Reagenzien für den Gelshift

Alle Arbeiten mit radioaktiven Isotopen wurden in einem Heißlabor durchgeführt.

Tabelle 30: Lösungen und Reagenzien für die Markierung der Oligonukleotide.

Bestandteil	Menge	Hersteller/ Nummer
TE-Puffer	100ml	
• <i>Tris-HCl</i>	40mM	
• <i>EDTA</i>	1mM	
• <i>NaCl</i>	150mM	
T4 Polynukleotidkinase		Promega/ M4101
[γ-³²P]-ATP	10mCi/ ml	Amersham/ PB10218
10 x PNK-Puffer	500µl	
• <i>Tris-HCl</i>	500mM	
• <i>MgCl₂</i>	100mM	
• <i>DTT</i>	50mM	Fluka/ 43815
• <i>EDTA</i>	1mM	
• <i>Spermidin (1,8-Diamino-4-azooctan)</i>	1mM	Sigma/ S 0266
tRNA		Calbiochem/ 69592-3
NH₄Acetat	4M	

Tabelle 31: Lösungen und Reagenzien für den Gelshift.

Bestandteil	Menge	Hersteller/ Nummer
Low-ionic-strength Puffer	4000ml	
• <i>Tris-HCl</i>	150mM	
• <i>Natriumacetat</i>	300mM	
• <i>EDTA</i>	250mM	
Polyacrylamidgel 4%	59ml	
• <i>Acrylamid</i>	2,85g	Serva/ 10677.01
• <i>Bisacrylamid</i>	40mg	Serva/ 10679.01
• <i>Tris-HCl</i>	0,7mM	
• <i>EDTA</i>	1mM	
• <i>Natriumacetat</i>	3,4mM	
• <i>Glycerol</i>	5 Vol-%	
• <i>Ammonium-Persulfat 30%</i>	0,3 Vol-%	
• <i>TEMED</i>	5mM	Sigma/ T 8133
Poly dI/ dC	1µg/ µl	Amersham/ 27-7880-01
Bovines Serum-Albumin (BSA)	10mg/ ml	Sigma/ P 6529
10 x Binding Puffer	10ml	
• <i>Tris-HCl</i>	100mM	
• <i>NaCl</i>	500mM	
• <i>EDTA</i>	10mM	
• <i>Glycerol</i>	50 Vol-%	
• <i>DTT</i>	1mM	
Farbindikatorpuffer		
• <i>10 x Bindingpuffer</i>	10 Vol-%	
• <i>Puffer 3</i>	10 Vol-%	
• <i>Bromphenolblau 10%</i>	4 Vol-%	
• <i>Xylencyanol 10%</i>	4 Vol-%	

4.5.5 Markierung der Oligonukleotide

Die Basen-Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 32 angegeben. Vor der Verwendung wurden die als Correct-Sense- und Anti-Sense-Einzelstränge vorliegenden Oligonukleotide zunächst zu einem Doppelstrang verbunden. Hierzu wurde je 1nmol der

korrespondierenden Einzelstränge in 40µl TE-Puffer gelöst, im Wasserbad bei 70-85° (je nach Länge des Nukleotidstranges) für 10min inkubiert und anschließend der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur abgekühlt. Für die Markierung wurden 20pmol der Doppelstrang-Oligonukleotide versetzt mit 12IU der T4 Polynukleotidkinase, 100µCi des radioaktiven ATP sowie 10 x PNK-Puffer. Der Ansatz wurde bei 37° für 60min inkubiert. Anschließend wurden die markierten Oligonukleotidstränge durch Präzipitation mit tRNA, NH₄-Acetat und Ethanol von überschüssigem ATP durch wiederholtes auftauen und einfrieren gereinigt. Der Ansatz wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet erneut in NH₄-Acetat und Ethanol resuspendiert. Dieser Reinigungsvorgang wurde zweimal wiederholt. Die gewonnene Aktivität wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt.

Faktor	Sense	Basenpaare	Sequenz
AP-1	CS	21	5'-CGC-TTG- <u>ATG-AGT-CAG</u> -CCG-GAA-3'
	AS	21	5'-TTC-CGG-CTG-ACT-CAT-CAA-GCG-3'
NF-κB	CS	22	5'-AGT-TGA- <u>GGG-GAC-TTT-CCC</u> -AGG-C-3'
	AS	22	5'-G-CCT-GGG-AAA-GTC-CCC-TCA-ACT-3'
CREB	CS	27	5'-AGA-GAT-TGC- <u>CTG-ACG-TCA</u> -GAG-AGC-TAG-3'
	AS	27	5'-CTA-GCT-CTC-TGA-CGT-CAG-GCA-ATC-TCT-3'

Tabelle 32: Basensequenz der verwendeten Oligonukleotide für den EMS-Assay. Die Bindungssequenz für den jeweiligen Transkriptionsfaktor auf dem Correct-Sense-Strang ist markiert.

4.5.6 Durchführung des Gelshift

Für die Aufbereitung der Proteinproben wurde je Ansatz 10µg Proteinextrakt kombiniert mit 10 x Binding-Puffer, Puffer 3, Poly dl/dC, BSA, Aprotinin, PMSF und DTT. Das Volumen des Ansatzes wurde auf 23µl eingestellt und bei Raumtemperatur für 10min vorinkubiert. Anschließend wurde das radioaktiv markierte Oligonukleotid zugegeben. Die maximal zugegebene Aktivität betrug 50.000cpm. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 15min inkubiert und anschließend in die Ladekammern des Acrylamidgels gefüllt. Für die Elektrophorese wurde eine Standard-Apparatur mit 2 Gelkammern (Protean II Xi, Bio-Rad, USA) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 120V für 3h durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für 30min in 60% Methanol gewaschen und anschließend auf 3M-Filterpapier aufgebracht. Die Trocknung erfolgte bei 70° für 1,5h. Anschließend wurde das Gel in sterile Plastikfolie eingeschweißt und bei -80° autoradiographiert, analog zu dem Vorgehen bei der Northern-Blot Analyse.

Die Auswertung der EMS-Analyse erfolgte durch optische Beurteilung der Bandenverteilung sowie Laserdensitometrie.

5 Ergebnisse

5.1 Grundlegende Eigenschaften des Verletzungsmodells

5.1.1 Wundreparatur

Für die Untersuchung der Vorgänge der Wundreparatur im verwendeten Verletzungsmodell wurden lichtmikroskopische Aufnahmen eines verletzten Endothelzellmonolayers zu definierten Zeitpunkten nach der Verletzung durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in der beschriebenen Weise kultiviert und anschließend die Verletzung durchgeführt. Die Kulturschale wurde 0, 6, 12, 24 und 36h nach der Verletzung an einer zuvor festgelegten Stelle bei 200facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop fotografiert.

Es zeigt sich, dass sich bereits 6 Stunden nach Verletzung unverletzte Zellen vom Wundrand lösen und in die freigelegte Wundfläche einwandern. Im weiteren Verlauf führen Migration und Proliferation überlebender Zellen innerhalb von 24h zu einem vollständigen Verschluss der Wundfläche und zu einer Reorganisation des verletzten Endothelzellmonolayers (Abbildung 20).

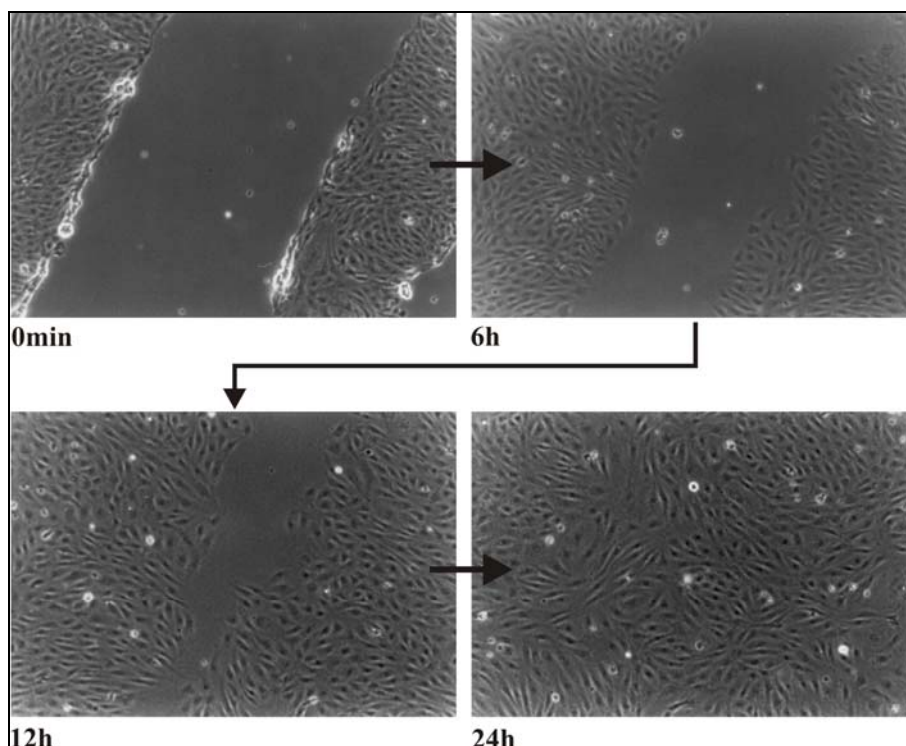


Abbildung 20: Reorganisation des Endothelzellmonolayers nach Verletzung. 6h nach Verletzung wandern erste Zellen vom Wundrand in die zellfreie Wundfläche ein. Nach 24h ist die denudierte Fläche wieder vollständig mit Zellrasen bewachsen. Lichtmikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung.

5.1.2 Zeitkurve der Early-Gen Expression im verwendeten Verletzungsmodell

Verschiedene Autoren konnten sowohl in vitro als auch in vivo eine gesteigerte Expression der Immediate Early Response Gene c-fos [123], EGR-1 [116-119] und MCP-1 [213] nachweisen. Da in der vorliegenden Arbeit intrazelluläre Signalübertragungswege untersucht werden sollen, die die Expression der genannten IEGs regulieren, sollte zunächst die Dynamik deren Expression im verwendeten Verletzungsmodell untersucht werden.

Hierzu wurden konfluente Endothelzellmonolayer (HUVEC) in der beschriebenen Art und Weise kultiviert und die Verletzung durchgeführt. Die Gewinnung der mRNA erfolgte nach 30, 60, 120 und 240min. Die mRNA wurde nach dem in Abschnitt 4.3 beschriebenen Verfahren extrahiert und Northern-Blot Analysen für die mRNA von c-fos, EGR-1, MCP-1 und GAPDH durchgeführt (Abbildung 21a).

Im verwendeten Modell induziert die Endothelzellverletzung die Expression der mRNA von EGR-1 und c-fos. Dabei liegen die Expressions-Maxima von EGR-1 und c-fos an unterschiedlichen Zeitpunkten. Während EGR-1 ein Maximum der Expression nach 60min zeigt und nach 240min nicht mehr nachweisbar ist, steigt die Expression der mRNA von c-fos schon 30min nach Verletzung auf ein Maximum an. Nach 120min ist die mRNA von c-fos nicht mehr nachweisbar. Diese Werte entsprechen einer für Immediate Early Response Gene typischen Kinetik. Im Gegensatz zu c-fos und EGR-1 führt die Endothelzellverletzung im vorliegenden Modell einer direkten mechanischen Verletzung des Endothelzellmonolayers gegenüber der Kontrolle nur zu einer leicht gesteigerten Expression von MCP-1 (im Vergleich zur Stimulation mit TNF- α fiel der Signalanstieg um 73,2% geringer aus).

TNF- α stellt einen potenten Induktor der Expression von MCP-1 dar [214]. Im vorliegenden Experiment wurde zusätzlich die Stimulierbarkeit von c-fos, EGR-1 und MCP-1 durch dieses Zytokin untersucht. Erwartungsgemäß zeigt sich nach Stimulation mit TNF- α (10 I.U./ ml) ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von MCP-1 über den gesamten Beobachtungszeitraum, während sich sowohl bei c-fos als auch bei EGR-1 kein Anstieg der mRNA-Expression nachweisen ließ.

Die Dichtewerte der Banden im Northern-Blot wurden nach dem beschriebenen Verfahren (Abschnitt 4.4.3) mittels eines Densitometers ermittelt und die Werte als Zeitkurve der mRNA-Expression nach Verletzung und Stimulation mit TNF- α grafisch dargestellt (Abbildung 21b).

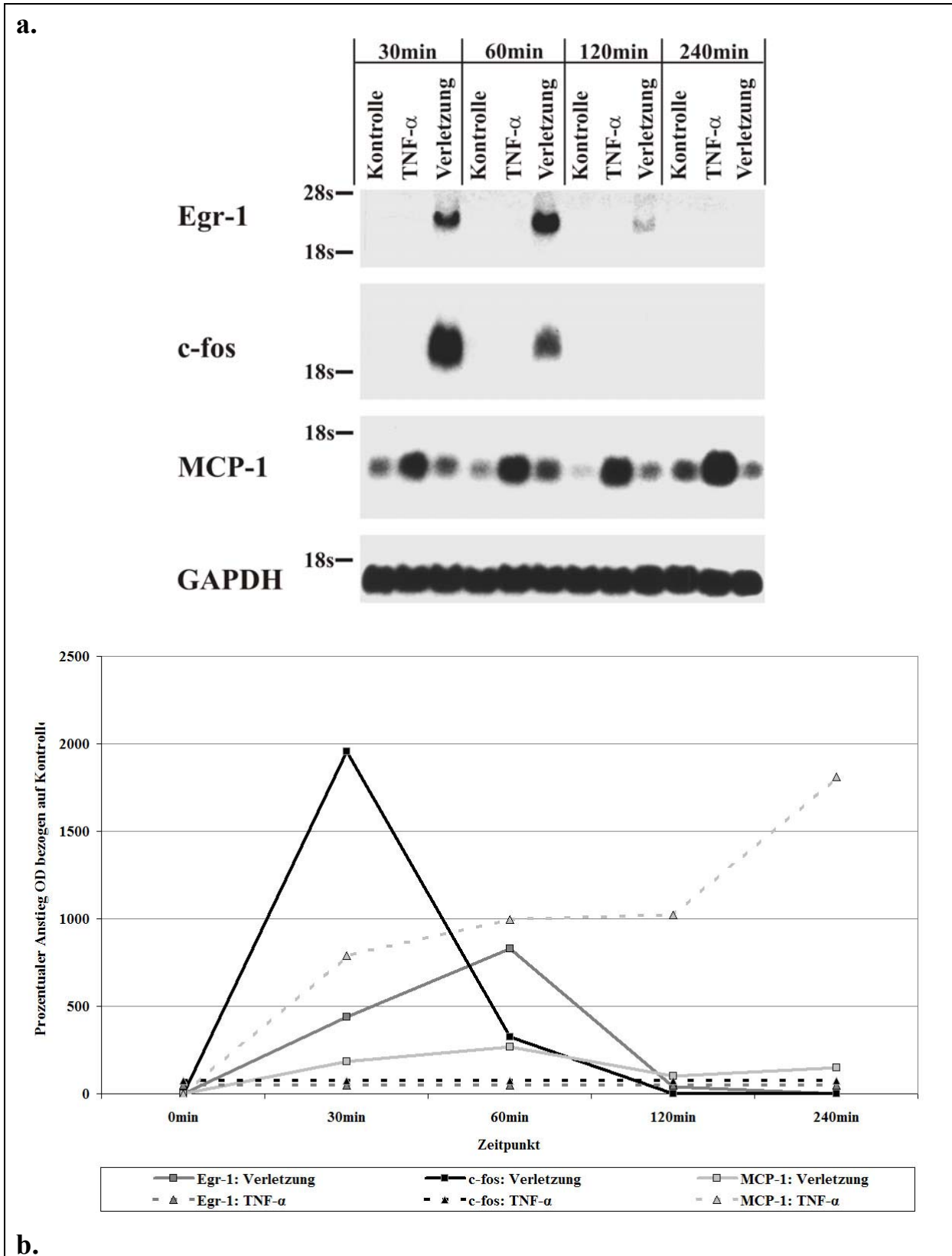


Abbildung 21: Early-Gen Expression nach Endothelzellverletzung sowie nach Stimulation mit TNF- α in vitro. A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von EGR-1, c-fos, MCP-1 und GAPDH. Die Endothelzellverletzung führt zu einer deutlichen Expression der mRNA von c-fos und Egr-1 bereits 30 bzw. 60min nach Verletzung. Im Gegensatz zu c-fos und EGR-1 ist die Expression der mRNA von MCP-1 durch Endothelzellverletzung nicht signifikant stimulierbar. Hier findet sich ein wertiger Anstieg der mRNA-Spiegel nur nach Stimulation mit TNF- α (10 I.U./ ml). B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte.

5.2 G-Proteine und Tyrosinkinase als ubiquitäre Mediatoren der inter- und intrazellulären Signalübertragung

5.2.1 Inhibition G-Protein abhängiger Signalübertragungswege

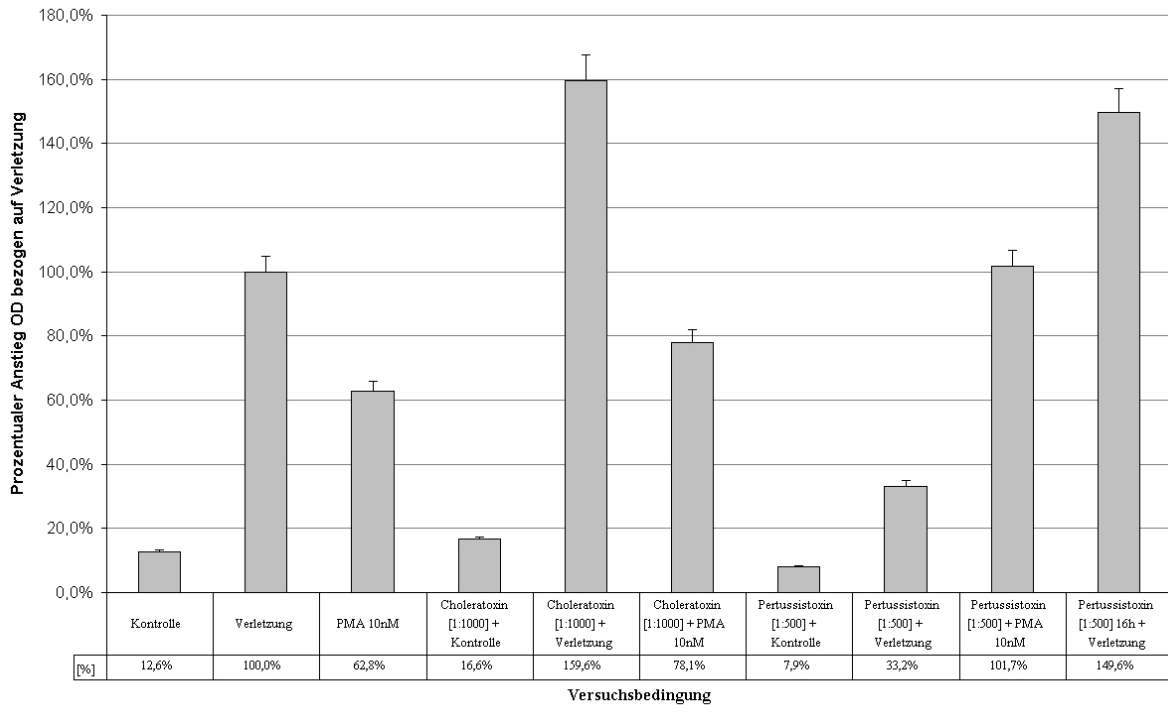
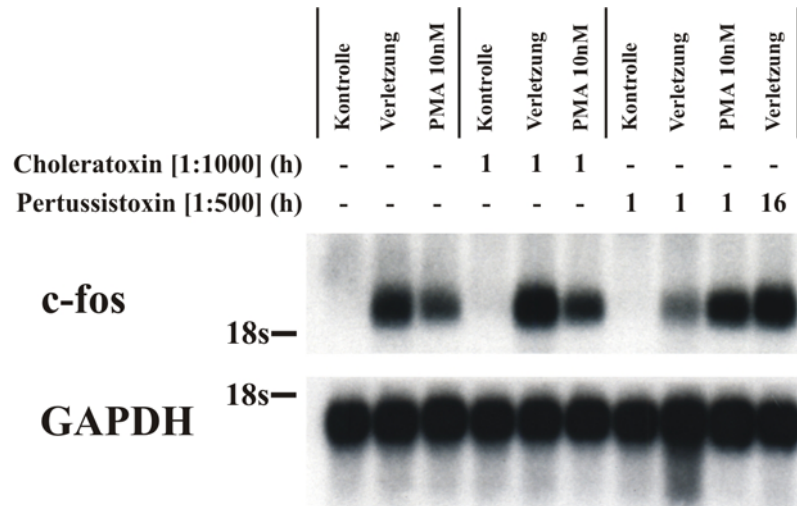
Wie in Abschnitt 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben, besitzen G-Proteine eine zentrale Stellung in der inter- und intrazellulären Signalübertragung. Gekoppelt an spezifische membranständige Rezeptoren setzen sie ein extrazelluläres Signal, z.B. die Bindung von Zytokinen wie PDGF, EGRF oder MCP-1, aber auch mechanische Stimuli, durch die Modulation intrazellulärer Proteinkinase-Kaskaden in eine zelluläre Reaktion um. Unabhängig vom externen Reiz gibt es zahlreiche Hinweise dafür, dass gerade an der verletzungsbedingten intrazellulären Signalübertragung G-Proteine entscheidend beteiligt sind [88, 89]. Deshalb sollte im folgenden Experiment die Bedeutung G-Protein abhängiger Signalübertragungswege für die verletzungsbedingte Expression von c-fos näher untersucht werden.

Hierfür wurden die Zellen mit den G-Protein spezifischen Inhibitoren Cholera-Toxin und Pertussis-Toxin in üblicher Konzentration (Tabelle 7) für 60min präinkubiert und anschließend die Verletzung durchgeführt. Nach weiteren 60min wurde die totale zelluläre mRNA extrahiert und nach Aufbereitung für die mRNA von c-fos und GAPDH hybridisiert (Abbildung 22a).

Es zeigte sich, dass die Inhibition aktivierender G-Proteine keinen Einfluss hatte auf die Expression von c-fos. Vielmehr konnte nach Vorbehandlung mit Cholera-Toxin im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen eine Steigerung der Expression der mRNA von c-fos in Höhe von 59,6% beobachtet werden (Abbildung 22b). Im Gegensatz dazu führte die Hemmung negativ regulierender G-Proteine durch Vorbehandlung mit Pertussis-Toxin für 60min zu einer signifikanten Reduktion der Expression von c-fos um 66,8%. Erst die Vorinkubation mit Pertussis-Toxin für 16h bewirkte ähnlich wie bei Cholera-Toxin einen signifikanten Anstieg der Expression von c-fos nach Verletzung um 49,6% (Abbildung 22b).

Zusätzlich zur Verletzung wurde eine Stimulation mit PMA durchgeführt. PMA ist ein potenter Induktor der Expression der mRNA von c-fos, überwiegend durch Aktivierung der Proteinkinase C [122] und diente hier und in allen folgenden Versuchen als positive Kontrolle der c-fos Expression. Wie in Abbildung 22a und b gezeigt, blieb jedoch die Vorbehandlung der Zellen mit Cholera- und Pertussis-Toxin ohne Effekt auf die PMA-induzierte Expression von c-fos.

a.



b.

Abbildung 22: Einfluss der Inhibition G-Protein abhängiger Signalübertragungswege auf die Early-Gen Expression nach Endothelzellverletzung durch Choleratoxin [c= 1:1000] und Pertussistoxin [c= 1:500]. A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die Zellen wurden für die angegebene Zeit mit Cholera- oder Pertussistoxin inkubiert und anschließend die Verletzung durchgeführt. Es zeigt sich, dass die Inhibition aktivierender G-Proteine durch Choleratoxin die Expression von c-fos zusätzlich stimulierte. Demgegenüber führte die Hemmung negativ regulierender G-Proteine durch Pertussistoxin zu einer signifikanten Reduktion der Expression von c-fos um 66,8% im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen. B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente.

5.2.2 Bedeutung von Tyrosinkinasen für die verletzungsbedingte Expression von c-fos

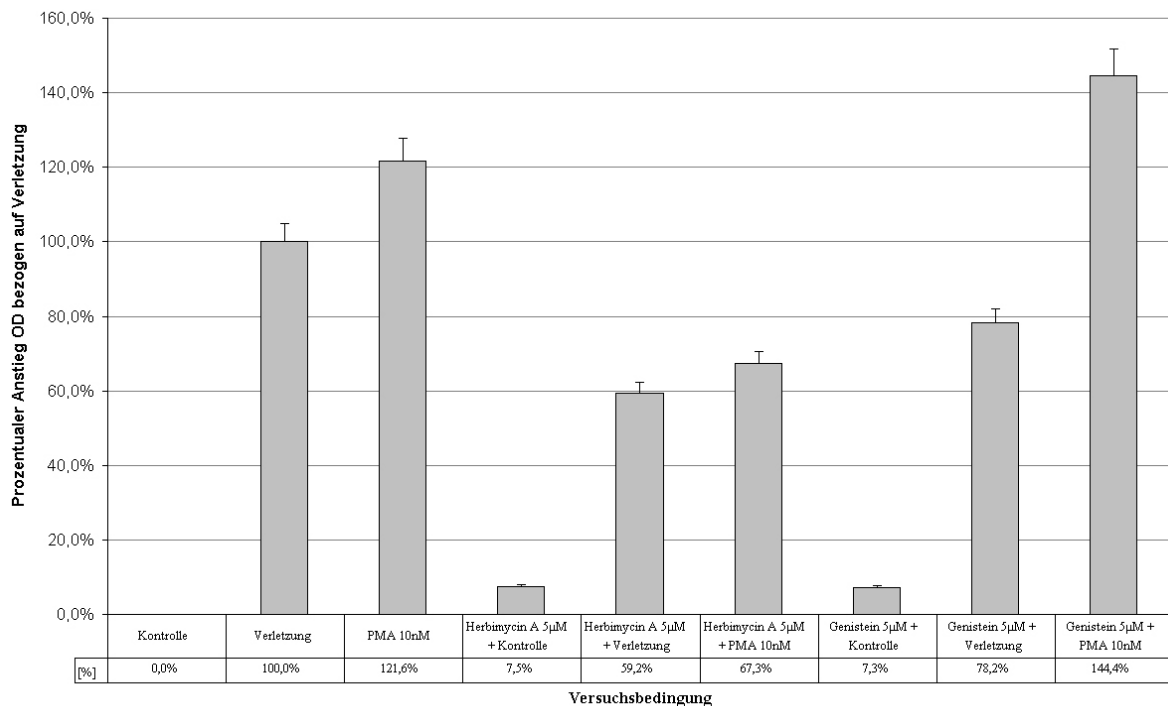
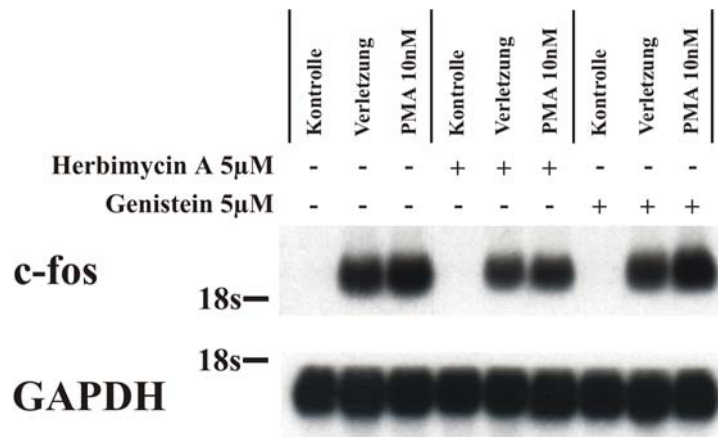
Neben den G-Proteinen stellen Tyrosinkinasen die zweite wichtige Gruppe ubiquitär vorhandener membranständiger oder intrazellulärer Signalmediatoren dar. So besitzen z.B. Rezeptoren wichtiger proatherogener Zytokine (PDGF, VEGF, etc.) Tyrosinkinaseaktivität. Andererseits existiert eine Vielzahl intrazellulärer Tyrosinkinasesysteme (z.B. JAK, STAT's, src-Kinasen), welche vor allem in der Onko- und Angiogenese eine große Rolle spielen (siehe Abschnitt 2.3.3). Die zentrale Bedeutung der Tyrosinkinasen für die intrazelluläre Signalübertragung und Regulation der Zellproliferation macht deren Beteiligung in der verletzungsbedingten Modulation des Zellstoffwechsels sehr wahrscheinlich. Dennoch existieren bislang keine Studien, die diesen Sachverhalt näher untersucht haben.

Wie bereits erwähnt, stehen bislang nur wenige selektive Inhibitoren der Tyrosinkinasen zur Verfügung. Deshalb muss man sich wenig selektiver Inhibitoren bedienen, die es zumindest erlauben, eine erste Abschätzung über eine mögliche Beteiligung von Tyrosinkinasen im untersuchten Modell zu treffen. Die wichtigsten Inhibitoren sind das Antibiotikum Herbimycin A sowie das Flavonoid Genistein, welche in diesem Experiment in einer Konzentration von 5µM eingesetzt wurden [72, 168, 244]. Die Präinkubationszeit betrug wiederum 60min.

Wie Abbildung 23a zeigt, führt die Inhibition von Tyrosinkinasen durch Herbimycin A zu einer signifikanten Reduktion der verletzungsbedingten Expression der mRNA von c-fos um 40,8% im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 23b). Dieser Effekt ließ sich in deutlich geringerer Ausprägung auch nach Vorbehandlung mit Genistein nachweisen. Hier zeigte sich eine Reduktion der Expression von c-fos um 21,8%.

Analog zu den Ergebnissen im Verletzungsversuch führte die Vorbehandlung der Zellen mit Herbimycin A zu einer signifikanten Reduktion der Expression von c-fos nach Stimulation mit PMA um 54,3%. Die Vorbehandlung mit Genistein hatte im Gegensatz dazu einen deutlichen stimulierenden Effekt.

a.



b.

Abbildung 23: Effekt der Tyrosinkinaseinhibitoren Herbimycin A und Genistein auf die verletzungsbedingte Expression von c-fos. **A:** Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Es zeigt sich, dass die Inhibition von Tyrosinkinasensystemen durch Herbimycin A zu einer signifikanten Reduktion der verletzungsbedingten Expression von c-fos um 40,8% führte. Der Effekt von Genistein war mit einer Hemmung um 21,8% deutlich geringer ausgeprägt. **B:** Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente.

5.3 Interzelluläre Signalübertragungswege

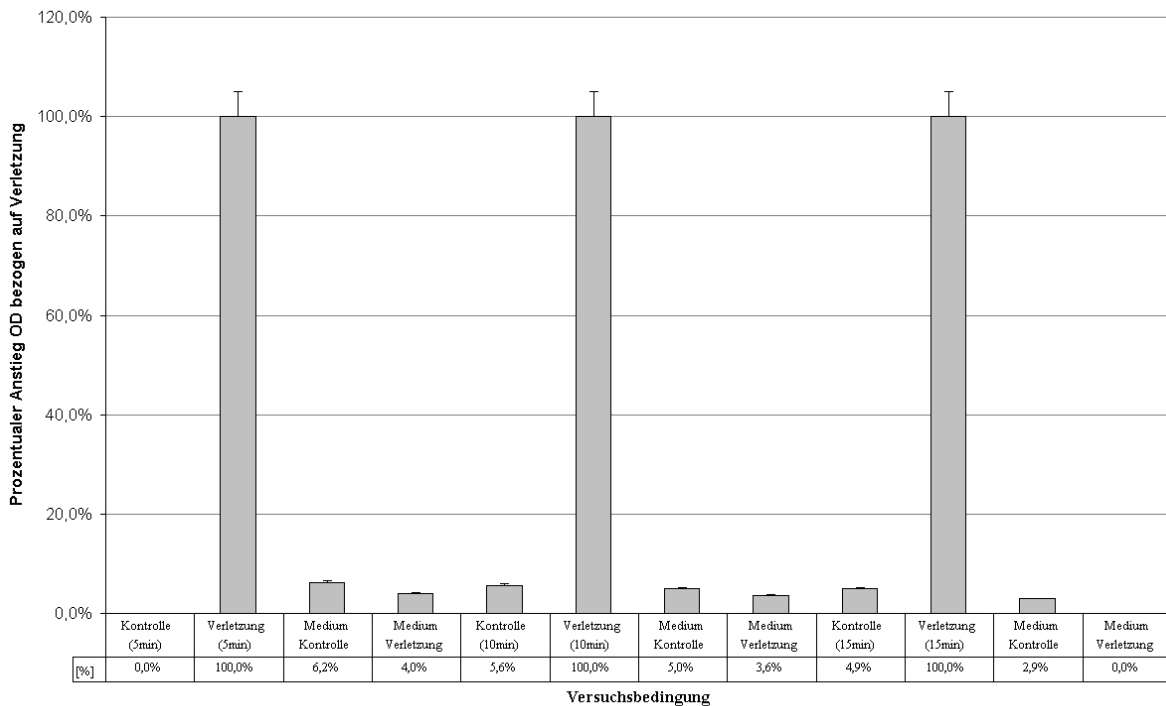
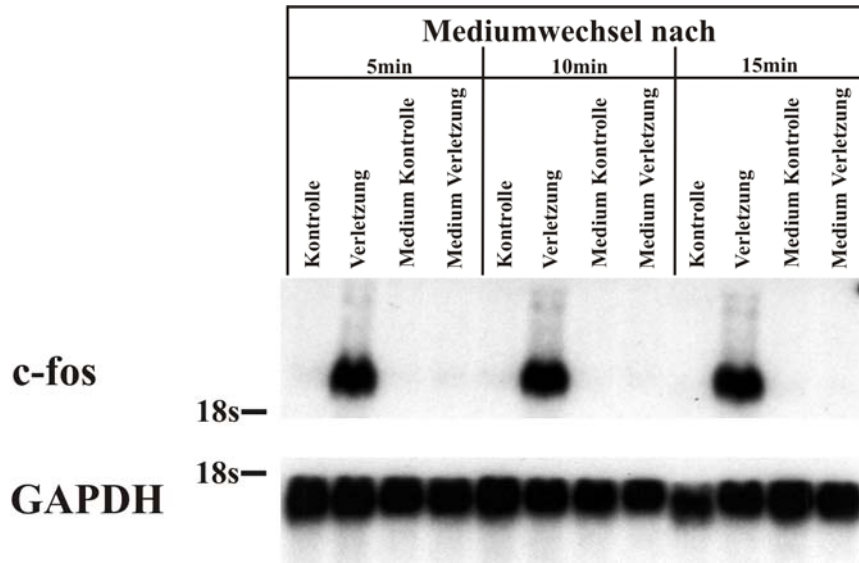
Die beschriebenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass für die Regulation der verletzungsbedingten Expression von c-fos auch Faktoren eine Rolle spielen könnten, die entweder aus verletzten oder sekundär aus überlebenden Zellen freigesetzt werden. Insbesondere die nachgewiesene Bedeutung von inhibierenden G-Proteinen und von Tyrosinkinase legt diese Vermutung nahe.

Sammak et al. [201] konnten in einem ähnlichen in-vitro Modell der Endothelzellverletzung zeigen, dass sich in den überlebenden Zellen kurzfristige Anstiege der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nachweisen lassen, welche sich wellenartig über den verbliebenen Zellrasen ausbreiten. Der Auslöser für diesen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration konnte bislang nicht identifiziert werden. Zum einen könnte es sich dabei um den Effekt membranständiger Mechano-Rezeptoren handeln. Andererseits könnten Zytokine oder andere Mediatoren, welche aus den verletzten Zellen freigesetzt werden, diese Veränderung der intrazellulären Calcium-Homöostase bedingen. Während die direkte transzelluläre Mechanotransduktion intensiv untersucht wird, gibt es bislang keine Daten über die mögliche Beteiligung löslicher Faktoren.

Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, wurden Zellen in der beschriebenen Art verletzt und nach einer definierten Inkubationszeit (5, 10 und 15min) das Kulturmedium abgenommen und auf unverletzte Kulturschalen übertragen. Die Zellen wurden anschließend weiter inkubiert, sodass die gesamte Inkubationszeit 60min betrug. Dieses Vorgehen wurde sowohl für die verletzten als auch für die unverletzten Zellen der Kontrolle durchgeführt, um stimulierende Effekte durch den Mediumwechsel ausschließen zu können.

Abbildung 24a stellt das Autoradiogramm eines entsprechenden Northern Blots für die mRNA von c-fos und GAPDH dar. Es zeigt sich, dass zu keinem Zeitpunkt die Inkubation unverletzter Zellen mit Medium verletzter Zellen zu einer Expression der mRNA von c-fos führte. Analog blieb der Mediumwechsel auch bei den unverletzten Zellen der Kontrolle ohne Effekt. Eine Expression von c-fos ließ sich lediglich in den regulär verletzten Zellen nachweisen und der Austausch des Kulturmediums führte nicht zu einer signifikanten Reduktion der Expression von c-fos (Abbildung 24b).

a.



b.

Abbildung 24: Untersuchungen über eine mögliche Beteiligung löslicher Faktoren bei der interzellulären Signalübertragung nach Endothelzellverletzung. A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Nach der Verletzung des Endothelzellmonolayers wurde das Kulturmedium für die angegebene Zeit (5-15min) auf dem Zellrasen belassen, anschließend auf eine frische, unverletzte Kulturplatte übertragen und diese für weitere 45min mit dem Medium der verletzten Zellen inkubiert. Mit den Kontrollplatten wurde analog verfahren. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte führte die Inkubation unverletzter Zellen mit dem Verletzungsmedium zu einer Expression der mRNA von c-fos. B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 2 identischer Experimente. Die Dichtewerte der Banden verletzter Zellen wurden gleich 100% gesetzt und alle anderen Werte in Bezug dazu gesetzt.

5.4 Bedeutung Calcium-abhängiger Signalübertragungswege

Die Bedeutung der intrazellulären Calcium-Homöostase für die Regulation des Zellzyklus vaskulärer Endothelzellen ist, wie in Abschnitt 2.3.4 dargelegt, mittlerweile gut untersucht. So ist bekannt, dass insbesondere eine Reihe proliferativ wirkender Wachstumsfaktoren wie PDGF und EGF einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration bewirken und dadurch regulierend auf den Zellzyklus einwirken können. Unklar ist, welche Rolle Calcium als Second Messenger im Rahmen einer verletzungsbedingten Proliferation vaskulärer Endothelzellen spielen könnte. Erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung Calcium-abhängiger Signalübertragungswege lieferte eine bereits mehrfach zitierte Arbeit von Sammak, et al. [201]. Der Gruppe gelang es, in einem sehr ähnlichen in-vitro Modell der Endothelzellverletzung einen sich wellenartig ausbreitenden Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration in den überlebenden Zellen nachzuweisen. Dennoch existieren bislang keine fundierten Daten, ob dieser Calcium-Einstrom nur ein passagerer Nebeneffekt ist oder ob dadurch wesentliche Vorgänge der Zellproliferation eingeleitet werden. Deshalb sollte auf der Grundlage dieser Erkenntnisse näher untersucht werden, welchen Einfluss dieser Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Endothelzellverletzung auf die Expression mitogener Transkriptionsfaktoren wie c-fos hat.

5.4.1 Calcium-Abhängigkeit der verletzungsbedingten Expression von c-fos

5.4.1.1 Experimentelle Anhebung der intrazellulären Calcium-Konzentration

Zunächst sollte untersucht werden, ob ein künstlich herbeigeführter Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration zu einer verstärkten Expression von c-fos führt. Hierzu wurden die Endothelzellen inkubiert mit der Calcium-Ionophore A23187, welche einen starken Einstrom von Calcium in die Zelle bewirkt (siehe Abschnitt 2.3.4.4). Das Experiment wurde sowohl in nominell Calcium-freiem (ohne Zugabe von Calcium-Chelatoren) als auch in Calcium-haltigem Inkubationspuffer durchgeführt (siehe Abbildung 25a).

Es zeigt sich, dass die Vorbehandlung der Zellen mit A23187 (und Ionomycin, welches ebenfalls eine Calcium-Ionophore darstellt) einen sehr starken Anstieg der Expression der mRNA von c-fos auslöst, welcher um den Faktor 2,8 höher liegt, als die Verletzungsbedingte Expression von c-fos (siehe Abbildung 25b). Auch in nominell Calcium-freiem Puffer zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Expression von c-fos. Dieser lag jedoch mit einem Faktor von 2,4 nur unwesentlich niedriger, als in Calcium-haltigem Puffer. Dabei ist jedoch anzumerken,

dass in dieser Serie von Experimenten dem Inkubationsmedium keine Chelatoren extrazellulären Calciums, wie z.B. EGTA, zugegeben worden sind, weshalb Calcium in Spuren im Extrazellularraum vorhanden gewesen sein könnte.

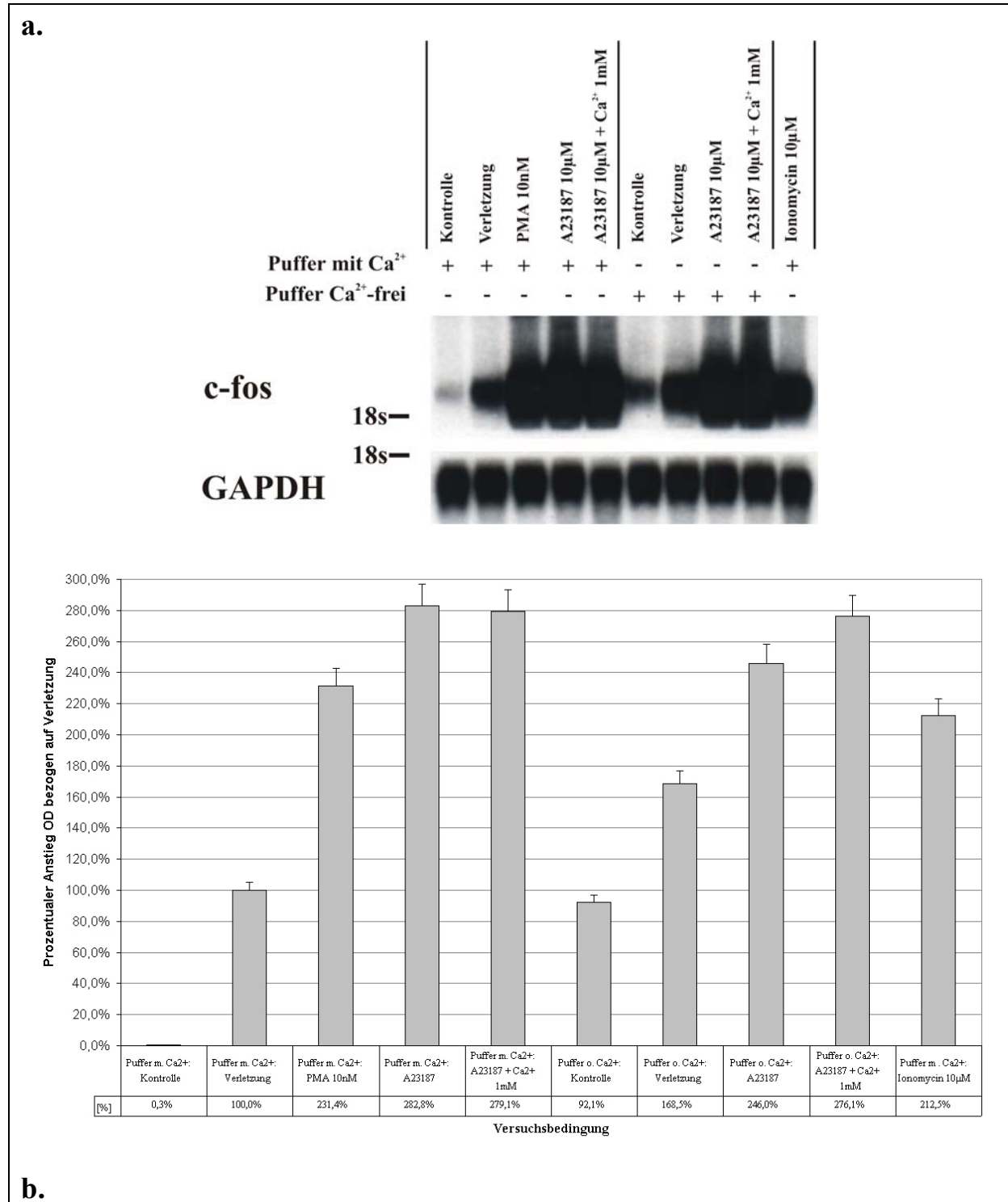


Abbildung 25: Einfluss der intrazellulären Calcium-Konzentration auf die Expression von c-fos. A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die Calcium-Ionophore A23187 und Ionomycin lösen einen starken Anstieg der Expression von c-fos aus, welcher um den Faktor 2,4 – 2,8 höher liegt als die verletzungsbedingte Expression von c-fos. **B:** Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente.

5.4.1.2 Reduktion der intrazellulären Calcium-Konzentration durch BAPTA-AM

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ein künstlich herbeigeführter Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration zu einer starken Zunahme der Expression der mRNA von c-fos führt ist dennoch unklar, inwieweit Calcium-abhängige Signalübertragungswege auch bei der verletzungsinduzierten Expression von c-fos von Bedeutung sind. Um diese Frage näher zu untersuchen, wurde die synthetische Substanz BAPTA-AM eingesetzt, welche in der Lage ist, nach intrazellulärer Hydrolyse Calcium im Verhältnis 2:1 (Calcium:BAPTA) zu binden. Die Substanz findet breite Anwendung in der Untersuchung Calcium-abhängiger Signalübertragungswege [62, 81, 227]. Die typische Endkonzentration beträgt 10 – 50µM bei einer Vorinkubationszeit von bis zu 60min. Höhere Konzentrationen $\geq 100\mu\text{M}$ hatten deutliche zytotoxische Effekte (Daten nicht abgebildet) und wurden deshalb nicht eingesetzt.

Die Ergebnisse einer Konzentrationsreihe mit BAPTA-AM im Wirkungsbereich von 10 – 50µM sind in Abbildung 26a dargestellt. Da BAPTA-AM nur in DMSO lösbar ist, wurde die Kontrollreihe analog zu der Konzentrationsreihe mit reinem DMSO behandelt. Dadurch wurde ausgeschlossen, dass Effekte einer Vorinkubation mit BAPTA-AM auf das Lösungsmittel DMSO zurückzuführen sind. Vielmehr zeigte sich, dass BAPTA-AM in ansteigender Konzentration zu einer deutlichen Reduktion der verletzungsbedingten Expression der mRNA von c-fos führte. Bei einer Konzentration von 50µM zeigte sich eine vollständige Suppression der c-fos Expression auf nur noch 5,2% der verletzungsbedingten Expression.

Um auszuschließen, dass es sich hierbei um zytotoxische Effekte von BAPTA-AM handelt, wurden Kontrollen mit Trypanblau durchgeführt. Zusätzlich erfolgten bei jedem Experiment lichtmikroskopische Kontrollen auf Ablösung von Zellen von der Inkubationsplatte. Dabei zeigte sich, dass bei keiner der verwendeten Konzentrationen von BAPTA-AM eine Ablösung oder ein Absterben von Zellen beobachtet werden konnte. Die deutliche Hemmung der Expression von c-fos durch Inkubation mit BAPTA-AM ist somit auf den rein pharmakologischen Effekt der Chelierung intrazellulären Calciums zurückzuführen.

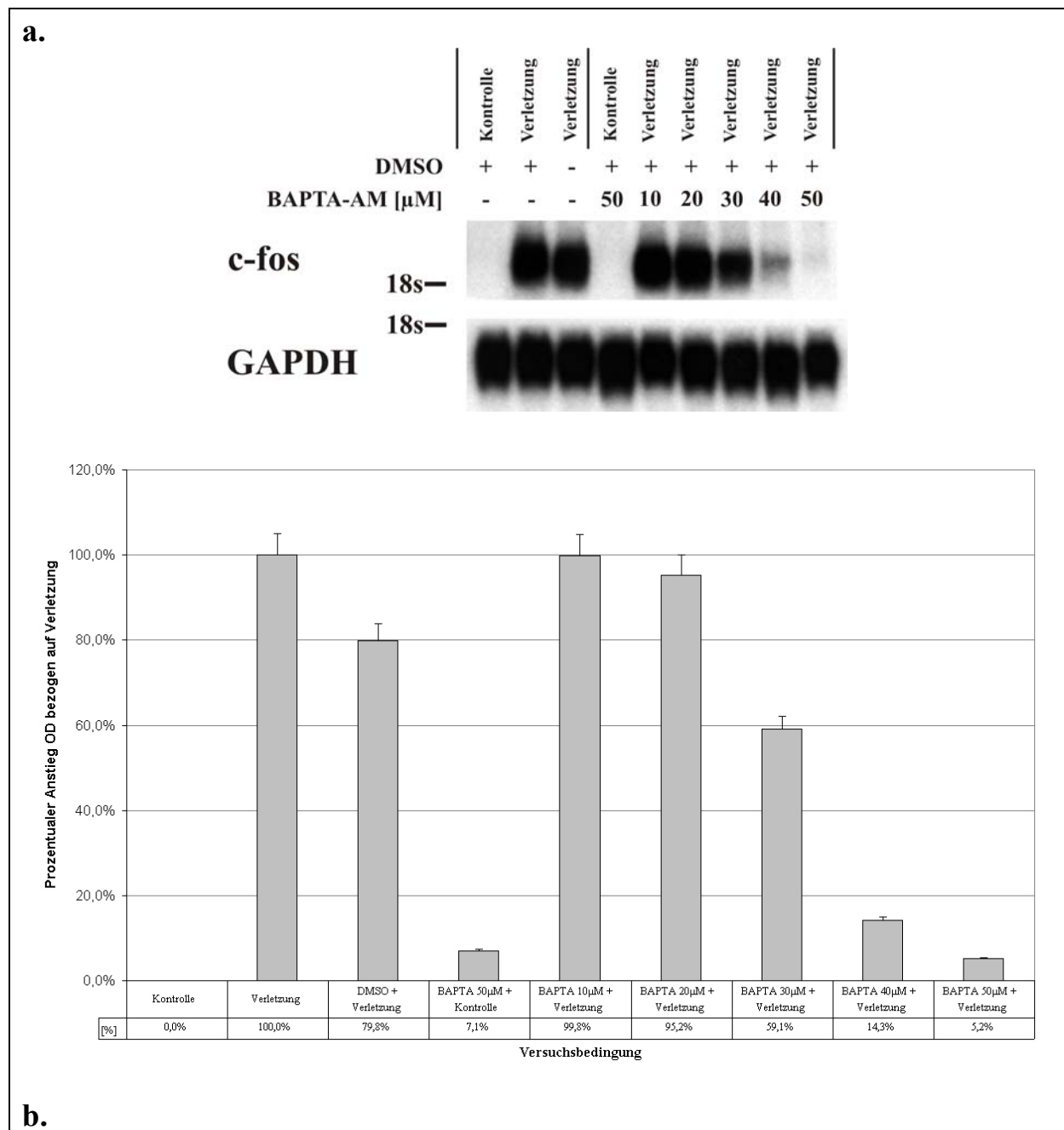


Abbildung 26: Chelierung intrazellulären freien Calciums durch BAPTA-AM. A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. BAPTA-AM führte in ansteigenden Konzentrationen von 10 – 50 μM zu einer zunehmenden Reduktion der verletzungsinduzierten Expression der mRNA von c-fos welche bei einer Endkonzentration von 50 μM beinahe vollständig unterdrückt werden konnte. Die Vorbehandlung der Zellen der Kontrollserie mit DMSO, dem Lösungsmittel von BAPTA-AM zeigte keinerlei Effekte auf die Expression von c-fos, weshalb die nachgewiesene Reduktion der Expression von c-fos ausschließlich auf die intrazelluläre Wirkung von BAPTA-AM zurückgeführt werden konnte. **B:** Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente.

5.4.2 Bedeutung intra- und extrazellulärer Calciumspeicher

Die Ergebnisse der zuvor dargestellten Experimente beweisen, dass die Signalübertragungssysteme, welche die Expression von c-fos regulieren, zumindest im untersuchten Zellsystem von der intrazellulären Calcium-Konzentration abhängig sind. Damit konnte gezeigt werden, dass Calcium eine wichtige Rolle als Second Messenger in der verletzungsinduzierten Expression von c-fos spielt. Unklar war jedoch, ob der verletzungsinduzierte Anstieg der Calcium-Konzentration bedingt ist durch einen Einstrom aus dem extrazellulären Raum oder durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Deshalb sollte im nächsten Schritt ermittelt werden, ob eine Reduktion des Calcium-Einstroms in die Zelle aus dem Interstitium oder die Hemmung seiner Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum in der Lage ist, die verletzungsbedingte Expression von c-fos weiter zu modulieren.

5.4.2.1 Chelierung extrazellulären Calciums durch EGTA

Um Calcium aus dem Extrazellularraum vollständig zu eliminieren wurde der Calcium-Chelator EGTA in einer üblichen Konzentration von 2mM eingesetzt. Wie in Abschnitt 2.3.4.4 beschrieben, bindet die Substanz Calcium im Verhältnis 2:1 (Calcium:EGTA). Durch Entzug extrazellulären Calciums wird jedoch eine Freisetzung von Calcium aus dem eR ausgelöst, was zu einem passagerem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration führt [126].

Abbildung 27a zeigt einen Northern Blot aus dieser Versuchsserie. Als Stimulatoren der c-fos Expression wurden neben der Verletzung PMA als positive Kontrolle eingesetzt. Analog zu dem Experiment aus dem vorherigen Abschnitt führte die Durchführung der Verletzung in nur nominell Calcium-freiem Inkubationsmedium zu einem deutlichen Anstieg der verletzungsinduzierten Expression von c-fos (Faktor 2,14, Abbildung 27b). Auch die basale Expression von c-fos ist deutlich erhöht.

Nach Zugabe von EGTA (2mM) ließ sich keine Hemmung der Expression von c-fos beobachten. Wie in nominell Calcium-freiem Inkubationsmedium zeigte sich auch hier eine sowohl basal als auch nach Verletzung deutlich erhöhte Expression von c-fos, welche jedoch nach Zugabe von EGTA geringer ausgeprägt war. Ein inhibierender Effekt auf die Expression von c-fos ließ sich jedoch nicht nachweisen.

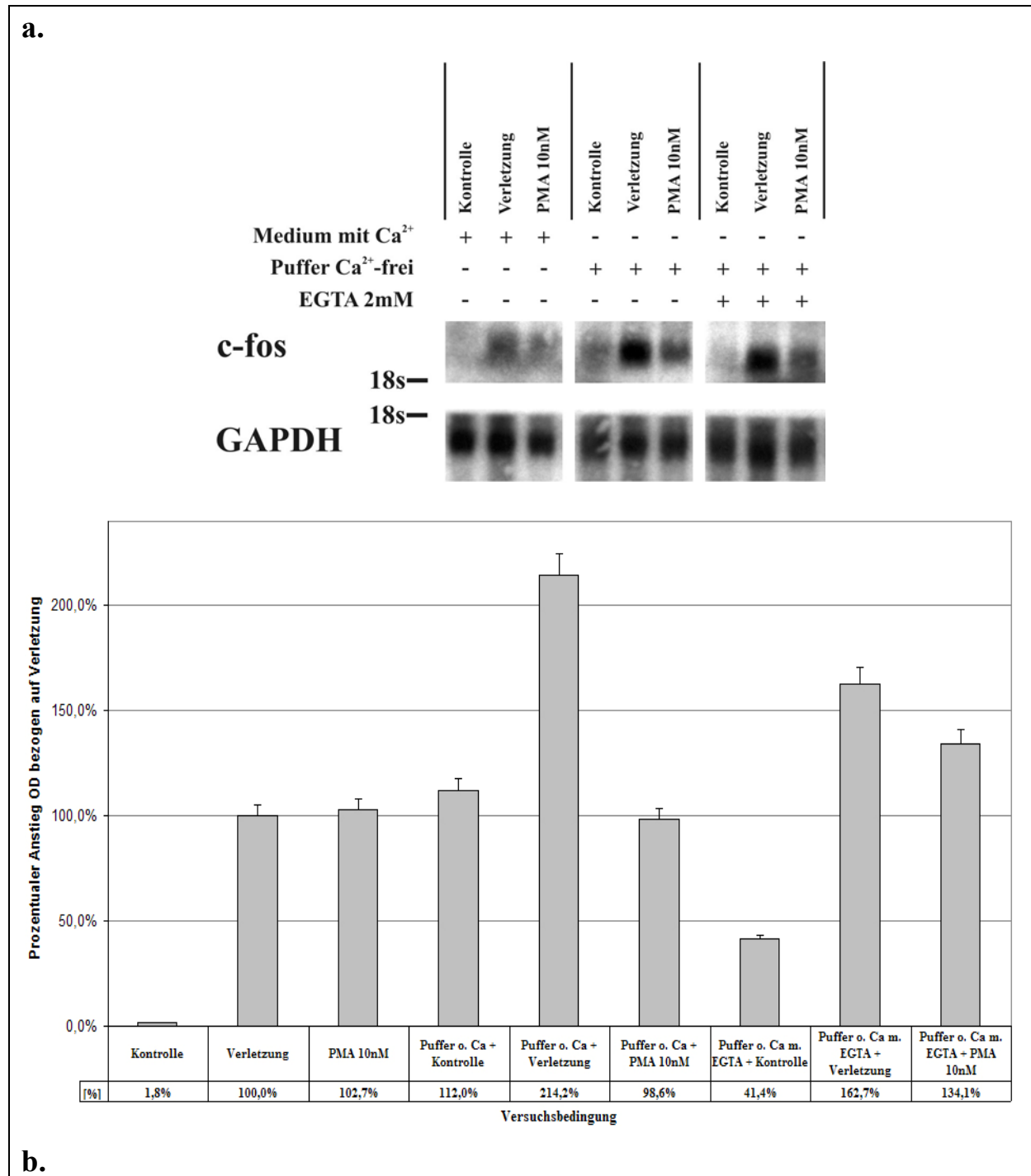


Abbildung 27: Effekt einer Reduktion der extrazellulären Calcium-Konzentration. A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Wie bereits gezeigt, fällt die verletzungsinduzierte Expression von c-fos in nominell Calcium-freien Inkubationsmedium deutlich stärker aus als in Calcium-haltigem Medium. Dieser Effekt lässt sich durch Zugabe von EGTA 2mM in das Inkubationsmedium diskret kupieren. Dennoch fällt der Anstieg der Expression von c-fos stärker aus. B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente. Die Dichtewerte der Banden verletzter Zellen wurden gleich 100% gesetzt und alle anderen Werte in Bezug dazu gesetzt.

5.4.2.2 Blockade zellmembranständiger Calcium-Transporter durch Lanthan

Die Ergebnisse einer Calcium-Depletion des Interstitiums durch EGTA lassen vermuten, dass ein verletzungsinduzierter Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration mit konsekutivem Anstieg der Expression von c-fos primär durch Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern erfolgt. Deshalb sollte untersucht werden, wie sich eine Hemmung des extrazellulären Calcium-Einstroms ohne Verschiebung des Konzentrationsgefälles auf die verletzungsbedingte Expression von c-fos auswirkt.

Hierzu wurde Lanthan, ein Element aus der Gruppe der seltenen Erden verwendet. Es besitzt ähnliche Ladungseigenschaften wie das Calcium-Kation und konkurriert deshalb mit diesem um die membranständigen Transportsysteme. Das Lanthan-Atom ist jedoch deutlich größer und schwerer als das Calcium-Atom (rel. Atommasse von Lanthan = 138,9; rel. Atommasse von Calcium = 40,078). Dadurch kann eine wirkungsvolle Blockade zellmembranständiger Calcium-Transporter erreicht werden. Da Lanthan nicht in die Zelle permeieren kann, bleiben intrazelluläre Calcium-Kanäle unbeeinflusst.

Der evaluierte wirksame Konzentrationsbereich von Lanthan liegt zwischen 10 – 50µM. Abbildung 28a zeigt das Ergebnis einer Vorinkubation von Endothelzellen mit Lanthan in 2 verschiedenen Konzentrationen, 2 bzw. 5min vor Verletzung. Der unter Vorbehandlung mit EGTA beobachtete zusätzliche Anstieg der Expression von c-fos blieb nach Vorinkubation mit Lanthan aus. Eine mögliche Begründung hierfür ist, dass die Hemmung des Calcium-Einstroms in die Zelle aus dem Interstitium im Gegensatz zur Calcium-Depletion des Interstitiums durch EGTA keine Verschiebung des Ladungsgradienten entlang der Zellmembran bewirkt und dies deshalb nicht oder nur vermindert zu einer Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führt. Vielmehr lässt sich bei einer Konzentration von 10µM und einer Inkubationszeit von 5min eine deutliche Reduktion der verletzungsbedingten Expression von c-fos um 40,2% beobachten (Abbildung 28b). Dieser Effekt war bei kürzeren Inkubationszeiten oder höheren Konzentrationen geringer ausgeprägt.

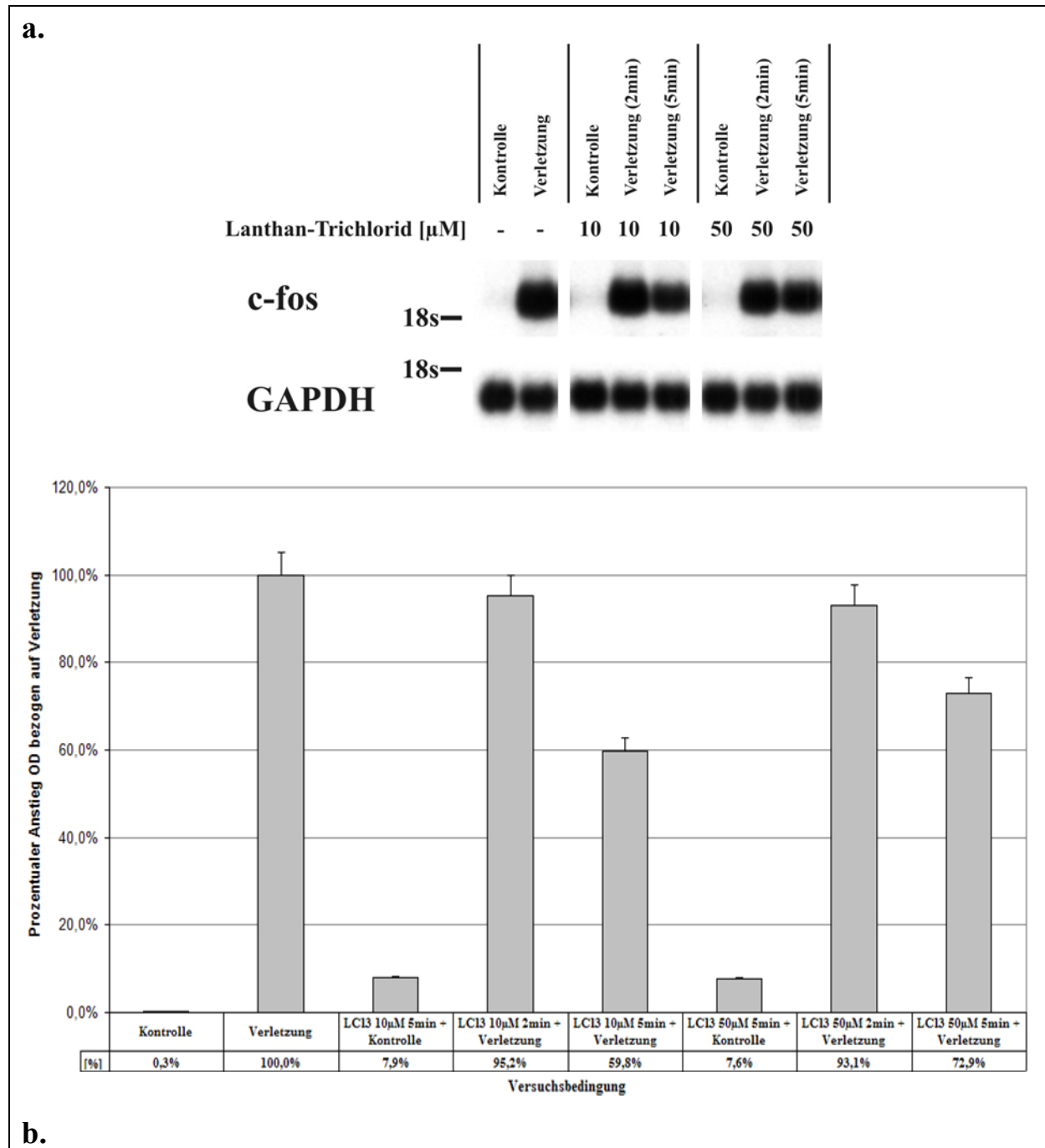


Abbildung 28: Effekt einer Hemmung von zellmembranständigen Calcium-Transportern durch Lanthan.
A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die verletzungsbedingte Expression von c-fos lässt sich durch Vorinkubation mit Lanthan in einer Konzentration von 10 μM für 5min um 40,2% reduzieren. Dieser Effekt war bei kürzeren Inkubationszeiten oder höheren Konzentrationen deutlich geringer ausgeprägt. **B:** Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente. Die Dichtewerte der Banden verletzter Zellen wurden gleich 100% gesetzt und alle anderen Werte in Bezug dazu gesetzt.

5.4.2.3 Blockade der Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern

Das endoplasmatische Retikulum sowie zelluläre Organellen wie die Mitochondrien stellen die wichtigsten zellulären Calciumspeicher dar. Die Calcium-Konzentration in diesen Speicherorganen kann bis zu 3mM betragen und es ist mittlerweile bekannt, dass sie für die Regulation der intrazellulären Calcium-Homöostase eine wesentlich größere Rolle spielen, als extrazelluläre Calcium-Depots. Dies zeigt sich nicht zuletzt in der Tatsache, dass auf der Membran des eR eine Vielzahl von Calcium-Transportsystemen existiert, z.T. rezeptorgesteuert wie im Falle des IP₃-Rezeptors, andere jedoch auch spannungsgesteuert (siehe Abschnitt 2.3.4.1). Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass auch die verletzungsbedingte Expression von c-fos durch Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern gesteuert und moduliert wird.

Im Gegensatz zu den gut zugänglichen zellmembranständigen Calcium-Transportsystemen sind die intrazellulären Kanäle des eR wesentlich schwieriger zu beeinflussen, nicht zuletzt aufgrund ihrer Vielzahl und Diversität. Bislang existieren deshalb nur wenige, meist nicht selektive Inhibitoren intrazellulärer Calcium-Kanäle. Die best untersuchten Substanzen sind Thapsigargin und TMB-8.

Der Tumorpromotor Thapsigargin bewirkt nach Permeation in das Zellinnere eine dauerhafte Blockade von Ca²⁺-ATPasen des endoplasmatischen Retikulums (siehe auch Abschnitt 2.3.4.4). Dadurch wird die Wiederaufnahme von Calcium in das eR wirkungsvoll gehemmt, was einerseits einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration und andererseits eine Entleerung der intrazellulären Calcium-Speicher bewirkt. Es wurde in einer Konzentration von 100nM mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von 5 – 60min verwendet. Die Northern-Blot Analyse (Abbildung 29a) zeigt erwartungsgemäß nach Vorinkubation mit Thapsigargin einen zeitabhängigen Anstieg der verletzungsbedingten Expression von c-fos bis auf das 2,4fache (Abbildung 29b) im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen, was wiederum auf den durch Thapsigargin ausgelösten starken Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zu Thapsigargin hemmt TMB-8 wirkungsvoll die Freisetzung von Calcium aus dem eR, wahrscheinlich durch Hemmung des IP₃-Rezeptors. Dabei fällt der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration deutlich geringer aus und ist von kürzerer Dauer als bei Thapsigargin [223]. Der verwendete Konzentrationsbereich liegt zwischen 10 – 100µM. In diesem Bereich ist nicht mit zytotoxischen Effekten zu rechnen. Wie Abbildung 30a zeigt, blieb die Vorinkubation der Endothelzellen mit TMB-8 ohne Effekt auf die verletzungsbedingte Expression von c-fos. Vielmehr zeigte sich eine Überstimulation, welche

im Vergleich zu Thapsigargin deutlich geringer ausgeprägt war (+56,4%). Dies begründet sich in der Tatsache, dass auch TMB-8 einen kurzfristigen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration auslöst, der im Vergleich zu Thapsigargin jedoch geringer ausgeprägt ist.

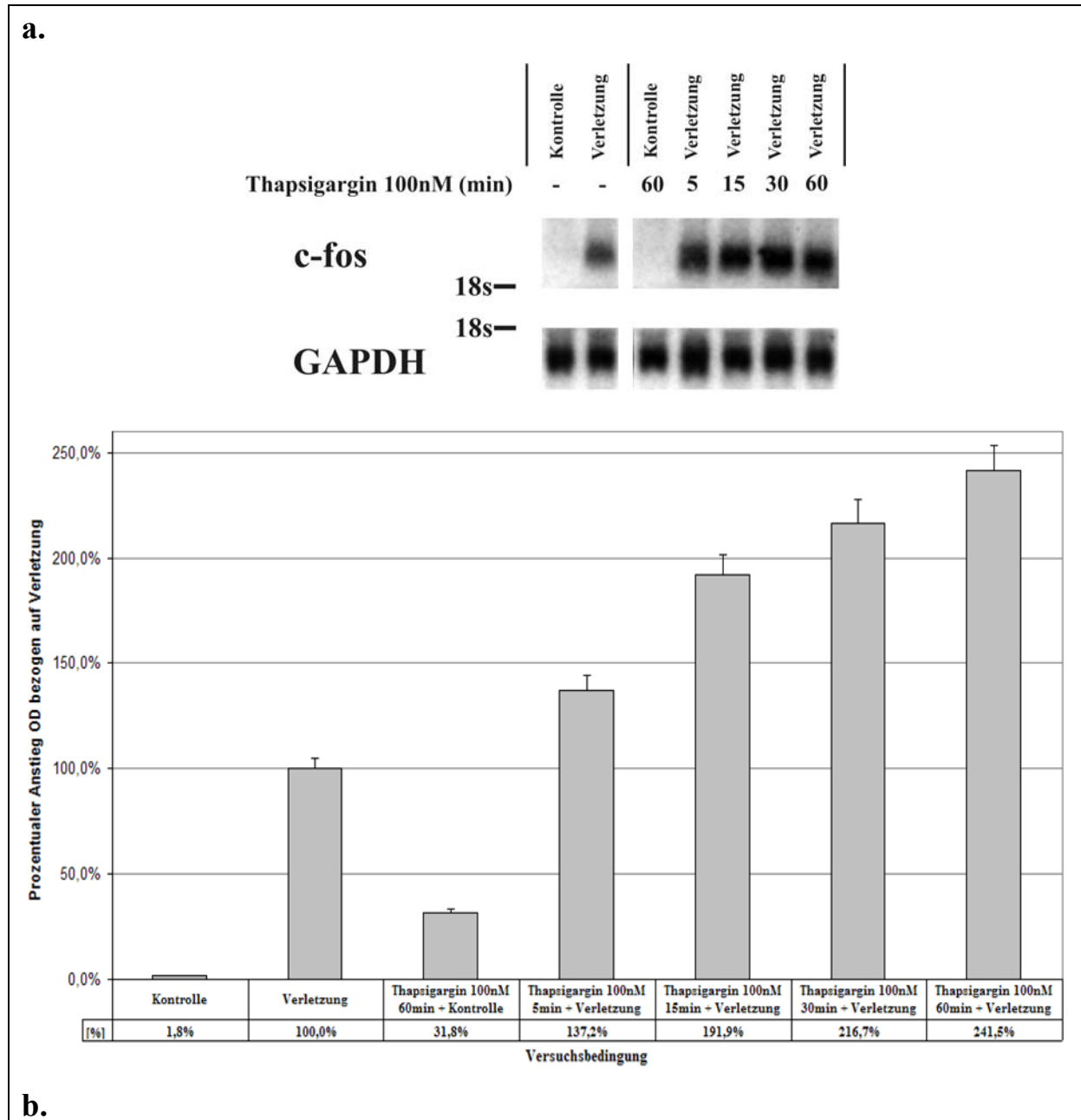


Abbildung 29: Hemmung der Wiederaufnahme von Calcium in das endoplasmatische Retikulum durch Thapsigargin. A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Thapsigargin führt zeitabhängig zu einer Überstimulation der verletzungsbedingten Expression von c-fos, was auf die Hemmung der Wiederaufnahme von Calcium in das eR und den konsekutiven starken Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration zurückzuführen ist. B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente.

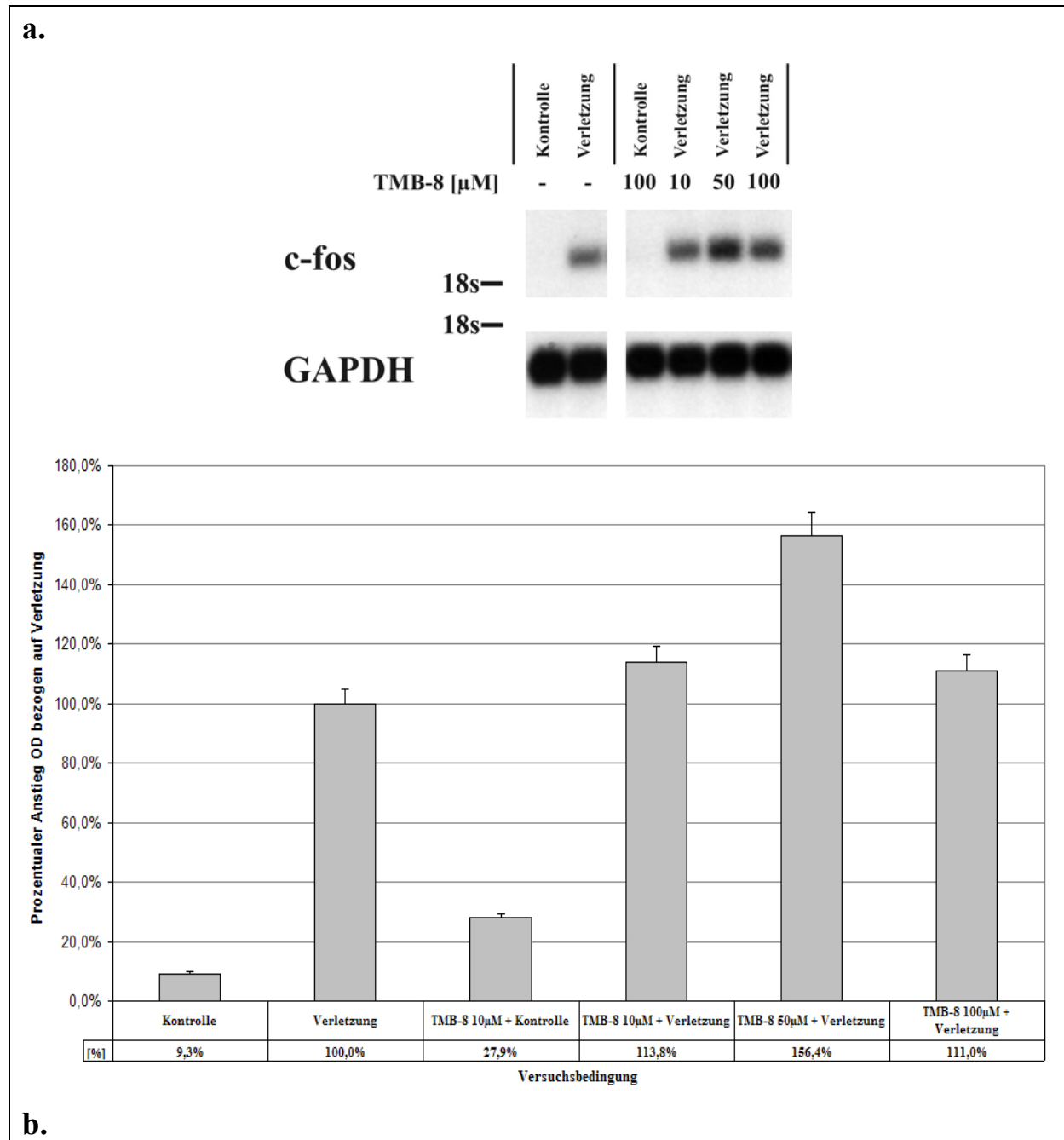


Abbildung 30: Hemmung der Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum durch TMB-8. A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die Vorinkubation der Zellen mit TMB-8 hatte keinen Effekt auf die verletzungsinduzierte Expression von c-fos. Vielmehr lässt sich auch hier eine geringer ausgeprägte Überstimulation der Zellen nachweisen. Dies begründet sich in der Tatsache, dass auch TMB-8 initial einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration bewirkt. B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente.

5.4.3 Bedeutung Calcium-abhängiger Calmodulin-Kinase-Systeme

Calcium ist einer der wichtigsten Second Messenger intrazellulärer Signalübertragungssysteme. Aufgrund seiner zentralen Stellung existiert eine Vielzahl von Kinase-Systemen, deren Aktivität nicht zuletzt auch durch die intrazelluläre Calcium-Konzentration reguliert wird. Viele der betroffenen Kinase-Systeme unterliegen neben der Regulation durch Calcium auch anderen Faktoren, wie z.B. cAMP oder IP3. Dennoch sind mittlerweile hochspezifische Kinase-Systeme bekannt, deren Regulation vornehmlich durch die Interaktion der intrazellulären Calcium-Konzentration erfolgt. Hierzu gehört die Gruppe der bislang noch nicht vollständig erforschten Calmodulin-Kinasen (siehe Abschnitt 2.3.4.2). Die Gruppe der Calmodulin-Kinasen besteht aus einer relativ heterogenen Gruppe von Enzymen, die an verschiedensten Vorgängen der intrazellulären Regulation beteiligt sind. Aufgrund dieser Heterogenität existieren bislang nur wenige selektive Inhibitoren dieser Kinase-Systeme. Die mittlerweile am besten etablierte Substanz ist KN-62.

KN-62 bewirkt in niedriger Konzentration von ca. $0,8\mu\text{M}$ eine relativ spezifische Hemmung der CaM-Kinase I. Mit zunehmender Konzentration werden jedoch auch weitere Mitglieder der CaM-Kinase Familie inhibiert. Bei ca. $3\mu\text{M}$ etwa die CaM-Kinase I und IV [99, 228]. Obgleich die Substanz damit im verwendeten Dosisbereich sehr unselektiv viele Mitglieder der CaM-Kinase Familie inhibiert, kann dennoch eine Aussage über deren Beteiligung im zu untersuchenden Signalübertragungsweg getroffen werden.

In der folgenden Versuchsreihe wurde KN-62 in einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ bei einer Inkubationszeit von 15 – 30min eingesetzt. In diesem Dosisbereich kann von einer wirkungsvollen Hemmung der CaM-Kinasen ausgegangen werden, ohne dass zytotoxische Effekte im verwendeten Zellsystem zu erwarten sind. Wie in Abbildung 31a gezeigt, blieb der Einsatz von KN-62 auch bei langen Inkubationszeiten von bis zu 30min ohne jeglichen Effekt auf die verletzungsbedingte Expression von c-fos. Es lässt sich anhand des gezeigten Experimentes jedoch keine Rückschlüsse ziehen auf eine potentielle Beteiligung anderer CaM-Kinasen, wie z.B. der CaM-Kinase III oder der Myosin-Leichtketten-Kinase.

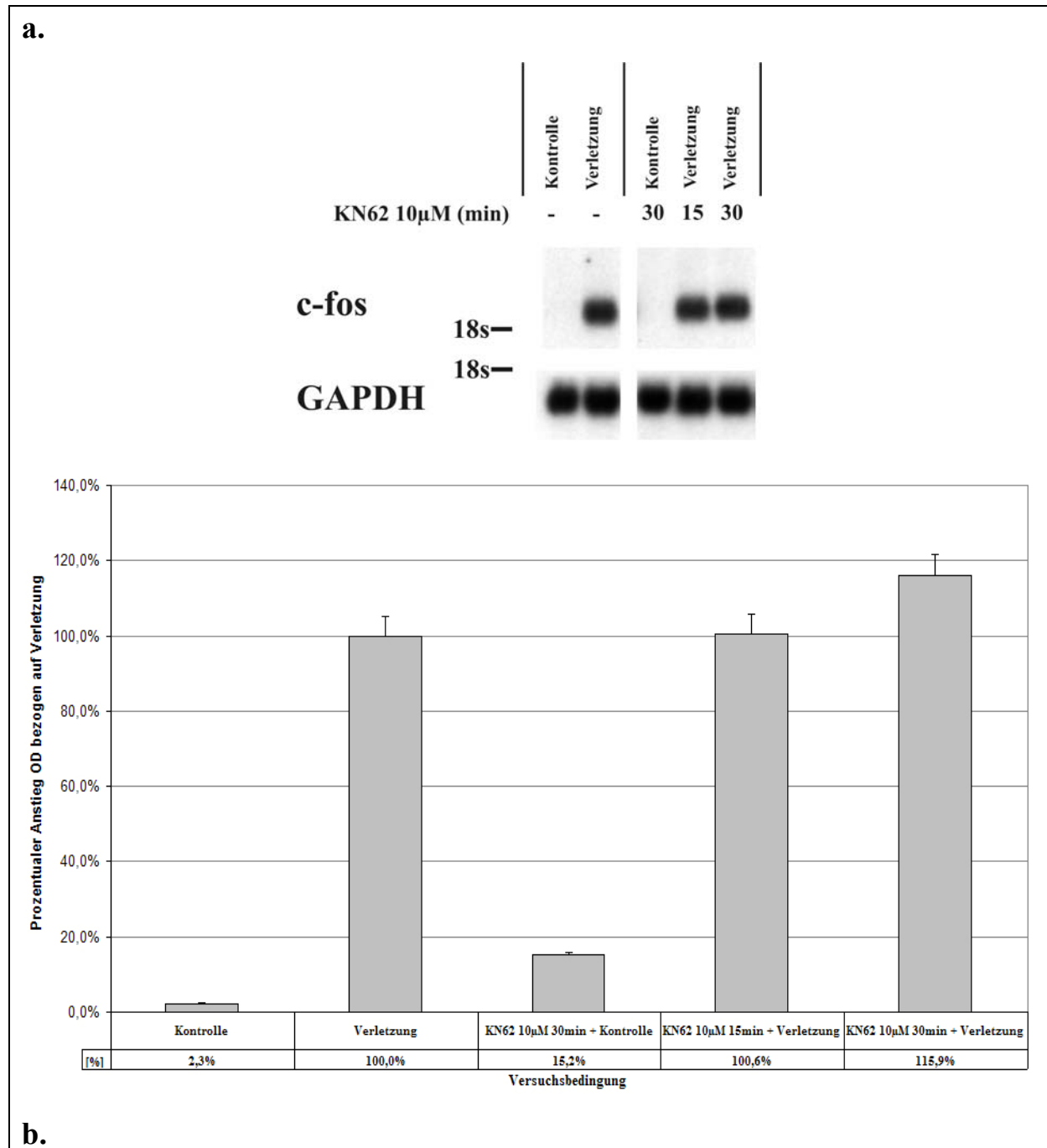


Abbildung 31: Hemmung der CaM-Kinase I, II und IV durch KN-62. A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die Vorinkubation der Endothelzellen mit KN-62 (10 μ M) für 15 oder 30min hatte keinen Einfluss auf die verletzungsbedingte Expression von c-fos. B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente.

5.5 Bedeutung der klassischen Proteinkinase-Systeme

Durch die bisher gezeigten Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass die Endothelzellverletzung in-vitro zu einer verstärkten Expression der mRNA des Transkriptionsfaktors c-fos führt und dass dies offenbar durch Calcium-abhängige Signalübertragungswege vermittelt wird. Dennoch ist unklar, welche weiteren intrazellulären Signalmediatoren an diesem Effekt beteiligt sind. Deshalb sollte in weiteren Versuchen ermittelt werden, welche Bedeutung klassische Proteinkinase-Systeme, wie z.B. die PKC, PKA, sowie die MAP-Kinasen haben.

5.5.1 Proteinkinase A

Wie in Abschnitt 2.3.5 dargestellt, ist die Bedeutung PKA-abhängiger Signalübertragungswege im Zusammenhang mit der Atherogenese, Revaskularisierung und neointimalen Proliferation bislang nur wenig untersucht. Erste Untersuchungen konnten zwar eine Beteiligung der PKA an der Regulation der Aktivität der eNOS sowie an der Expression von VEGF nachweisen. Dennoch sind die Zusammenhänge längst nicht vollständig bekannt. Um eine mögliche Beteiligung der PKA im Rahmen der verletzungsbedingten Induktion von c-fos näher zu untersuchen, wurde der selektive PKA-Inhibitor PKI 14-22 eingesetzt. Die verwendete Konzentration lag bei 500nM ($K_i = 36\text{nM}$ [80]) bei einer Inkubationszeit von 60min.

Wie in Abbildung 32a dargestellt, bewirkte die Präinkubation der Zellen mit PKI 14-22 eine diskrete, nicht signifikante Reduktion der verletzungsabhängigen Expression von c-fos. Die Wirksamkeit von PKI 14-22 als Inhibitor der PKA wurde am vorliegenden Modell der Endothelzellverletzung bereits bewiesen [1]. Deshalb muss aufgrund der hohen Selektivität von PKI 14-22 davon ausgegangen werden, dass im vorliegenden Modell die Induktion der Expression von c-fos durch Verletzung des Endothelzellmonolayers ohne Beteiligung der PKA abläuft.

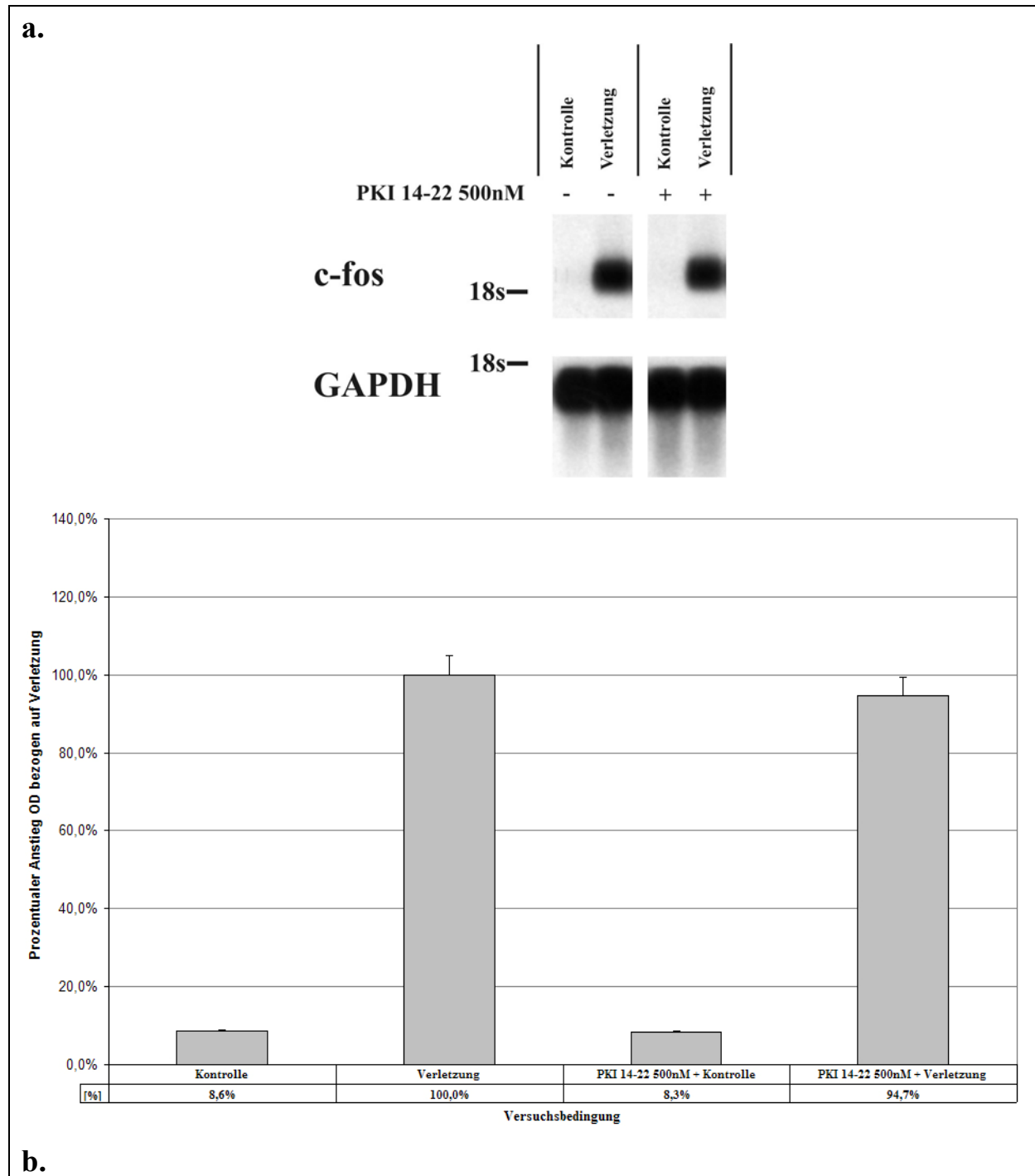


Abbildung 32: Hemmung der Proteinkinase A durch den Inhibitor PKI 14-22. A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die Vorinkubation mit PKI 14-22 (500nM) für 60min hatte keinen signifikanten Einfluss auf die verletzungsinduzierte Expression von c-fos. B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente.

5.5.2 Bedeutung der Proteinkinase C

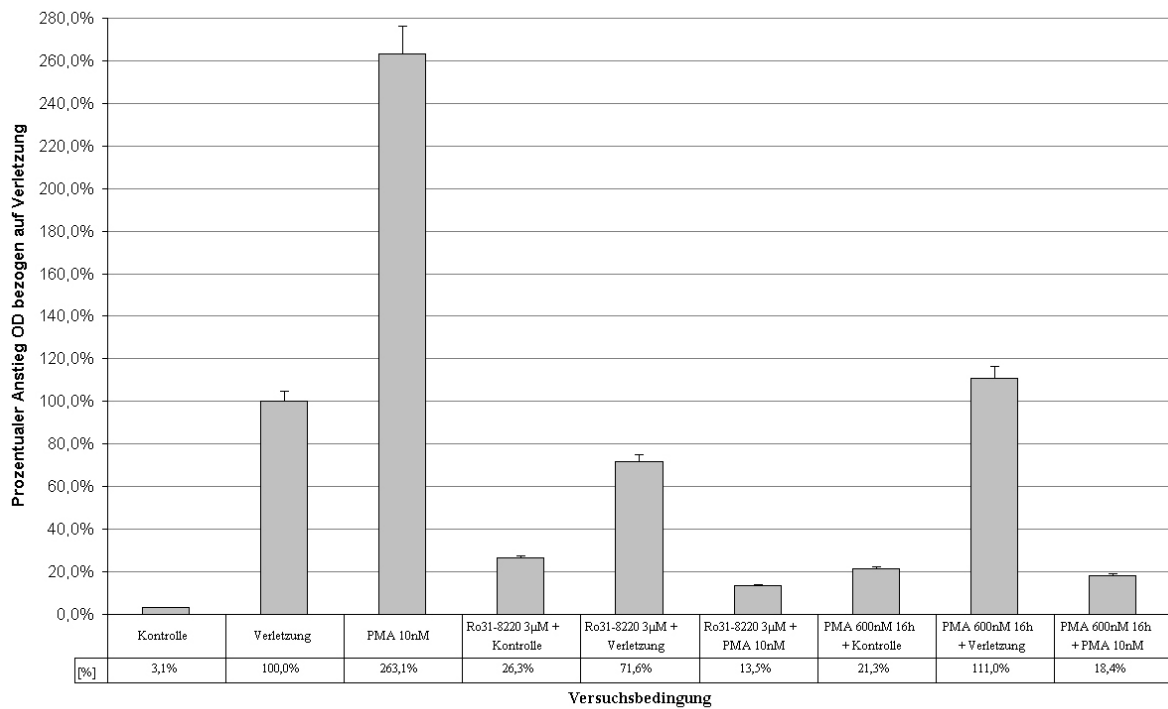
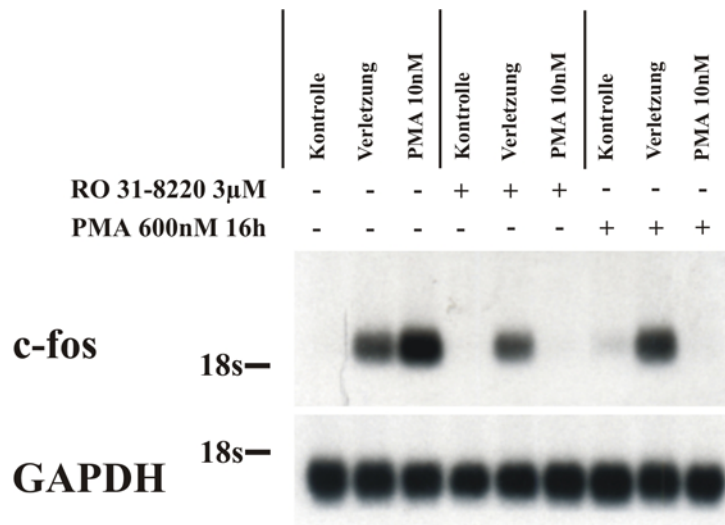
Die Proteinkinase C stellt das am längsten bekannte und am besten untersuchte Proteinkinase-System eukaryotischer Zellen dar. Wie in Abschnitt 2.3.6 bereits ausführlich dargelegt, sind mittlerweile mehr als 11 Isoformen bekannt, welche sich in 4 Gruppen untergliedern lassen. War man lange Zeit der Ansicht, dass die Proteinkinase C ausschließlich durch Calcium-abhängige Rezeptorsysteme reguliert wird, so weiß man heute, dass dies nur für die klassische PKC (cPKC) gilt und die Mitglieder der Gruppe der neuen und atypischen PKC (nPKC und aPKC) vollkommen unabhängig sind von der intrazellulären Calcium-Konzentration [161, 162]. So unterschiedlich wie ihre Wege der Aktivierung ist auch ihre Bedeutung für die Regulation zellulärer Stoffwechselprozesse. So konnte gezeigt werden, dass die cPKC- α eine wesentliche Bedeutung für die Regulation der Zellproliferation besitzt, während die nPKC- δ beteiligt ist an der Regulation apoptotischer Prozesse. Die große Bedeutung der C-Kinasen ergibt sich nicht zuletzt aber auch durch deren ubiquitäres Vorkommen in allen Gewebetypen des menschlichen Organismus.

Aufgrund der nachgewiesenen Calcium-Abhängigkeit der verletzungsinduzierten Expression der mRNA von c-fos und der enormen Bedeutung der Mitglieder der Proteinkinase C für die Regulation der Zellproliferation sollte untersucht werden, welche Rolle diesem Kinase-System im vorliegenden Modell zukommt.

Für die experimentelle Inhibition der Proteinkinase C stehen im Wesentlichen die synthetische Substanz Ro-31-8220 sowie der Phorbolster PMA zur Verfügung. Beide Substanzen sind gut etabliert und deren Wirkung auf die Isoformen der PKC wurde mehrfach evaluiert [27, 157, 209]. Während Ro-31-8220 in einer Konzentration von 3 μ M schon nach kurzer Inkubationszeit zu einer vollständigen Hemmung der PKC führt, erfolgt dies bei PMA durch eine Downregulation der PKC durch Langzeitstimulation mit PMA über einen Zeitraum von 16h. Es ist jedoch zu beachten, dass PMA im Gegensatz zu dem relativ unselektiv wirkenden Ro-31-8220 nur die Isoformen der cPKC und nPKC downreguliert und keinen Einfluss hat auf die Isoformen ξ und λ/ι der aPKC.

Wie in Abbildung 33a dargestellt, konnte durch Vorinkubation mit Ro-31-8220 eine signifikante Reduktion der verletzungsinduzierten Expression von c-fos erreicht werden. Demgegenüber hatte jedoch die Downregulation der PKC durch Langzeitinkubation mit PMA keinen inhibierenden Effekt.

a.



b.

Abbildung 33: Hemmung der PKC durch Ro-31-8220 sowie durch Downregulation mit PMA. A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die Vorinkubation der Zellen mit Ro-31-8220 bewirkte eine Reduktion der verletzungsinduzierten Expression von c-fos. Demgegenüber zeigte die Downregulation der PKC durch PMA keinen Effekt auf die Expression von c-fos nach Verletzung. **B:** Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente.

5.5.3 Die MAP-Kinase Systeme

Die große Gruppe der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) stellt ein weiteres wichtiges Kinase-System dar, das an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Stoffwechselprozesse beteiligt ist (siehe Abschnitt 2.3.7). Wie für die Isoformen der PKC gilt auch für die MAP-Kinasen, dass sie sowohl für proliferative als auch für apoptotische Prozesse von Bedeutung sein können [135, 233, 234]. Die wichtigsten Vertreter der MAP-Kinasen sind die ERK-1/-2, die JN-Kinase sowie die p38-MAPKinase. Eine experimentelle Beeinflussung dieses heterogenen Kinase-Systems wird deutlich erschwert durch eine Vielzahl von Quervernetzungen der einzelnen Kaskaden (siehe Abbildung 9). Aufgrund dieser Tatsache existieren bislang auch hier nur wenige, z.T. wenig selektive Inhibitoren einzelner Mitglieder dieser Kinasefamilie. Die am besten etablierten und untersuchten Substanzen sind PD98059 sowie SB203580.

PD98059 bewirkt in einer Konzentration von 50 – 100µM eine Inhibition der MAPK/ ERK Kinase 1 (MEK1), einer Kinase im Kaskade-System der ERK-1/ -2 [3]. Im verwendeten Dosisbereich ist nicht mit zytotoxischen Effekten zu rechnen. Wie Abbildung 34a zeigt, hatte die Vorinkubation der Endothelzellen mit PD98059 einen leichten überstimulierenden Effekt auf die verletzungsinduzierte Expression der mRNA von c-fos. Eine Inhibierung konnte nicht erreicht werden. Da PD98059 jedoch am Anfang der Kinase-Kaskade, welche zu einer Aktivierung der mitogenen ERK-1/ -2 führt, liegt, kann eine Aktivierung dieser Effektor kinase durch Seitenwege aus anderen MAP-Kinase Systemen im vorliegenden Modell nicht ausgeschlossen werden.

SB 203580 stellt einen relativ selektiven Inhibitor der p38-MAPKinase dar und setzt damit, im Gegensatz zu PD98059 direkt an einer terminalen Effektor kinase des MAP-Kinase Systems an [43]. Die IC₅₀ liegt bei 70nM, weshalb bei der verwendeten Konzentration von 10µM von einer gesicherten Inhibition der p38-MAPKinase ausgegangen werden kann. Die Ergebnisse einer Vorinkubation mit SB203580 vor Durchführung der Verletzung sind in Abbildung 35a dargestellt. Analog zu den Ergebnissen einer Vorinkubation mit PD98059 hatte auch die Vorbehandlung der Zellen mit SB203580 einen leicht stimulierenden Effekt auf den verletzungsbedingten Anstieg der Expression von c-fos. Dieser Effekt fiel mit 221,9% sogar deutlich stärker aus als bei PD98059.

Obwohl mit diesen Ergebnissen keine direkte Beteiligung von Mitgliedern der MAP-Kinase Systeme nachgewiesen werden konnte, muss einschränkend erwähnt werden, dass aufgrund der Vielzahl von Seitenwegen innerhalb dieser Kinase-Kaskade deren Bedeutung nicht abschließend beurteilt werden kann.

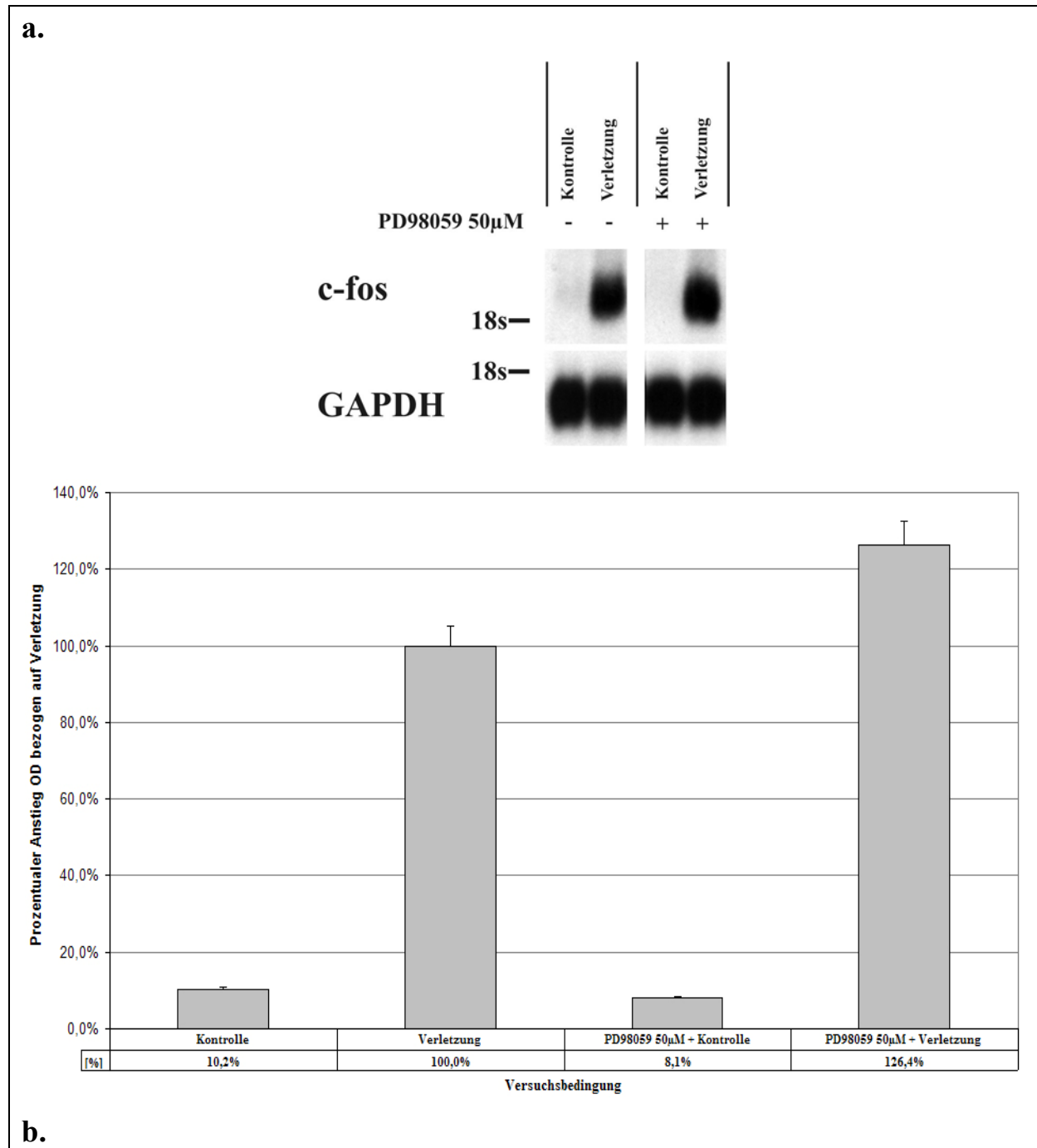


Abbildung 34: Einfluss der Hemmung der MAPK/ ERK Kinase 1 (MEK1) durch PD98059. A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Nach Vorinkubation der Zellen mit PD98059 (50µM) zeigte sich ein Anstieg der verletzungsbedingten Expression von c-fos um 26,4%. Eine Hemmwirkung von PD98059 auf die Expression von c-fos nach Endothelzellverletzung ließ sich nicht nachweisen. B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente.

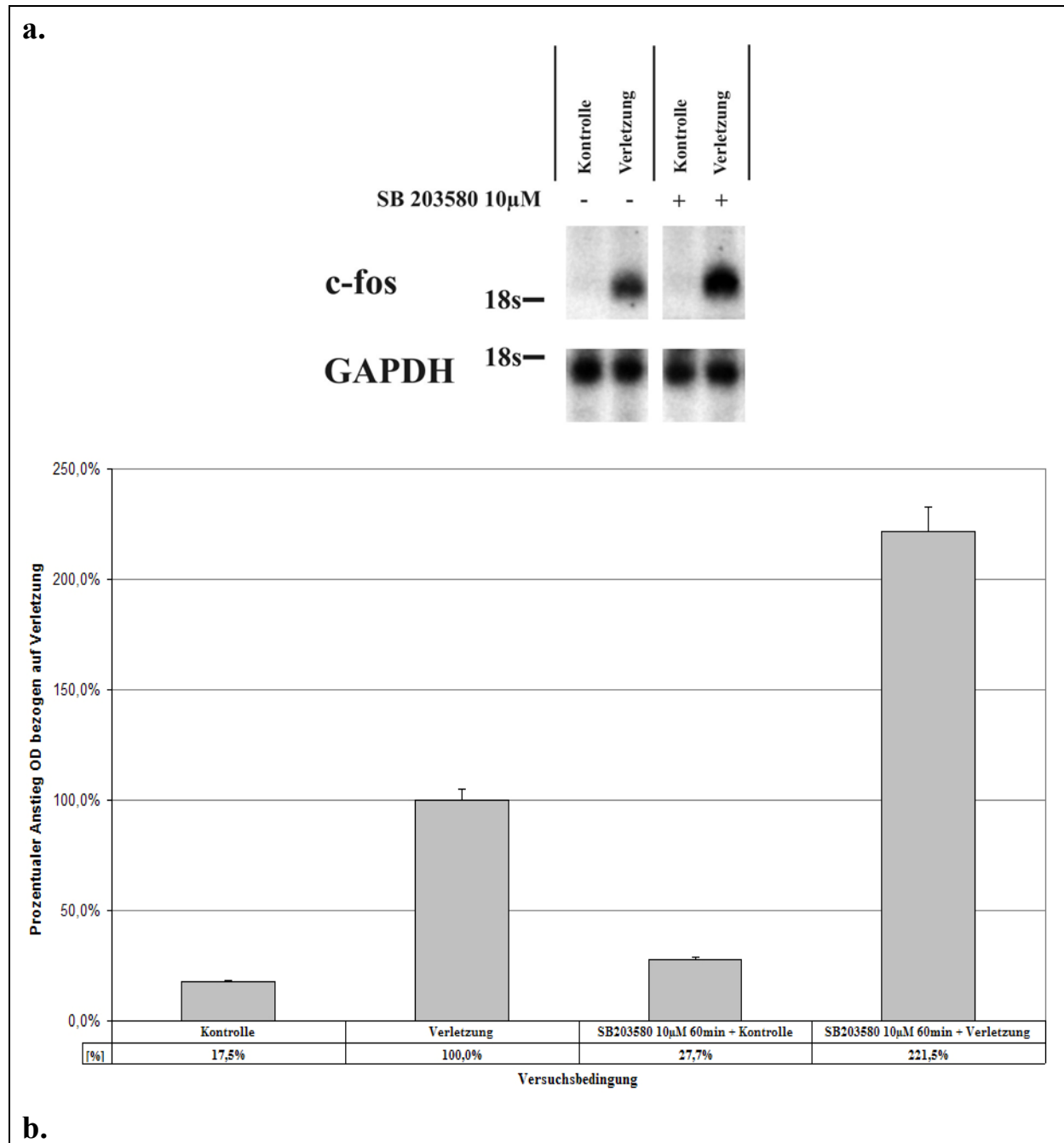


Abbildung 35: Hemmung der p38-MAPKinase durch SB203580. A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Wie PD98059 hatte auch SB203580 einen deutlichen stimulierenden Effekt auf die verletzungsinduzierte Expression von c-fos. Dieser Effekt fiel jedoch im Vergleich noch deutlich stärker aus. Wegen der Komplexität des MAP-Kinase Systems kann jedoch aufgrund dieser Ergebnisse eine Beteiligung von MAP-Kinasen am untersuchten Signalübertragungssystem nicht letztendlich ausgeschlossen werden. B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente.

5.6 Verletzungsbedingte Aktivierung klassischer Transkriptionsfaktoren

Bislang wurden die zellulären Reaktionen auf die Endothelzellverletzung nur auf Ebene der mRNA untersucht. Unklar ist jedoch, ob die verstärkte Expression der mRNA von z.B. c-fos auch von der verstärkten Aktivierung des korrespondierenden Transkriptionsfaktors AP-1 begleitet ist. Wie in Abschnitt 4.5 bereits beschrieben, wurden hierzu Electrophoretic Mobility Shift Assays eingesetzt (EMSA). Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Verzögerung der Wanderungsgeschwindigkeit eines nukleären Proteinextraktes aus stimulierten Zellen in der Gelelektrophorese durch Bindung evtl. im Extrakt vorhandener Transkriptionsfaktoren an radioaktiv markierte DNA-Fragmente mit der entsprechenden Konsensussequenz. Die Sequenzen der verwendeten DNA-Fragmente werden in Tabelle 32 dargestellt. Untersucht wurden die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B. Die Stimulationsdauer nach Verletzung betrug bei allen Experimenten 60 min.

5.6.1 Der heterodimere Transkriptionsfaktor AP-1

Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist ein Heterodimer aus den beiden Faktoren c-fos und c-jun. Da gezeigt werden konnte, dass die Endothelzellverletzung *in vitro* zu einer deutlich gesteigerten Synthese der mRNA von c-fos führt, sollte untersucht werden, ob konsekutiv auch das Protein synthetisiert wird und eine gesteigerte Aktivierung von AP-1 ausgelöst wird oder ob der Anstieg der mRNA von c-fos nur einen Nebeneffekt darstellt. In Abbildung 36 ist die EMS-Analyse für AP-1 dargestellt. Verwendung fand ein 21 Basenpaare langes DNA-Fragment der Konsensussequenz von AP-1 (siehe Tabelle 32), welches wie in Abschnitt 4.5 beschrieben radioaktiv markiert wurde. Erwartungsgemäß konnte ein Gelshift-Effekt sowohl nach Verletzung der Zellen als auch nach Stimulation mit PMA nachgewiesen werden. Dies impliziert, dass in beiden Fällen eine Aktivierung von AP-1 stattgefunden haben muss. Diese Ergebnisse decken sich mit den bereits beschriebenen Ergebnissen der Northern-Blot Analysen für die mRNA von c-fos. Analog konnte auch in der EMS-Analyse nach Stimulation mit TNF- α keine gesteigerte Aktivierung von AP-1 nachgewiesen werden.

Da gezeigt werden konnte, dass durch Vorinkubation der Zellen mit BAPTA-AM [50 μ M] die verletzungsbedingte Expression von c-fos vollständig gehemmt werden kann, wurde dies auch in der EMS-Analyse für AP-1 durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Aktivierung von AP-1 nach Vorinkubation mit BAPTA-AM vollständig blockiert werden konnte (Signalabfall um 89,2% im Vergleich zur Verletzung).

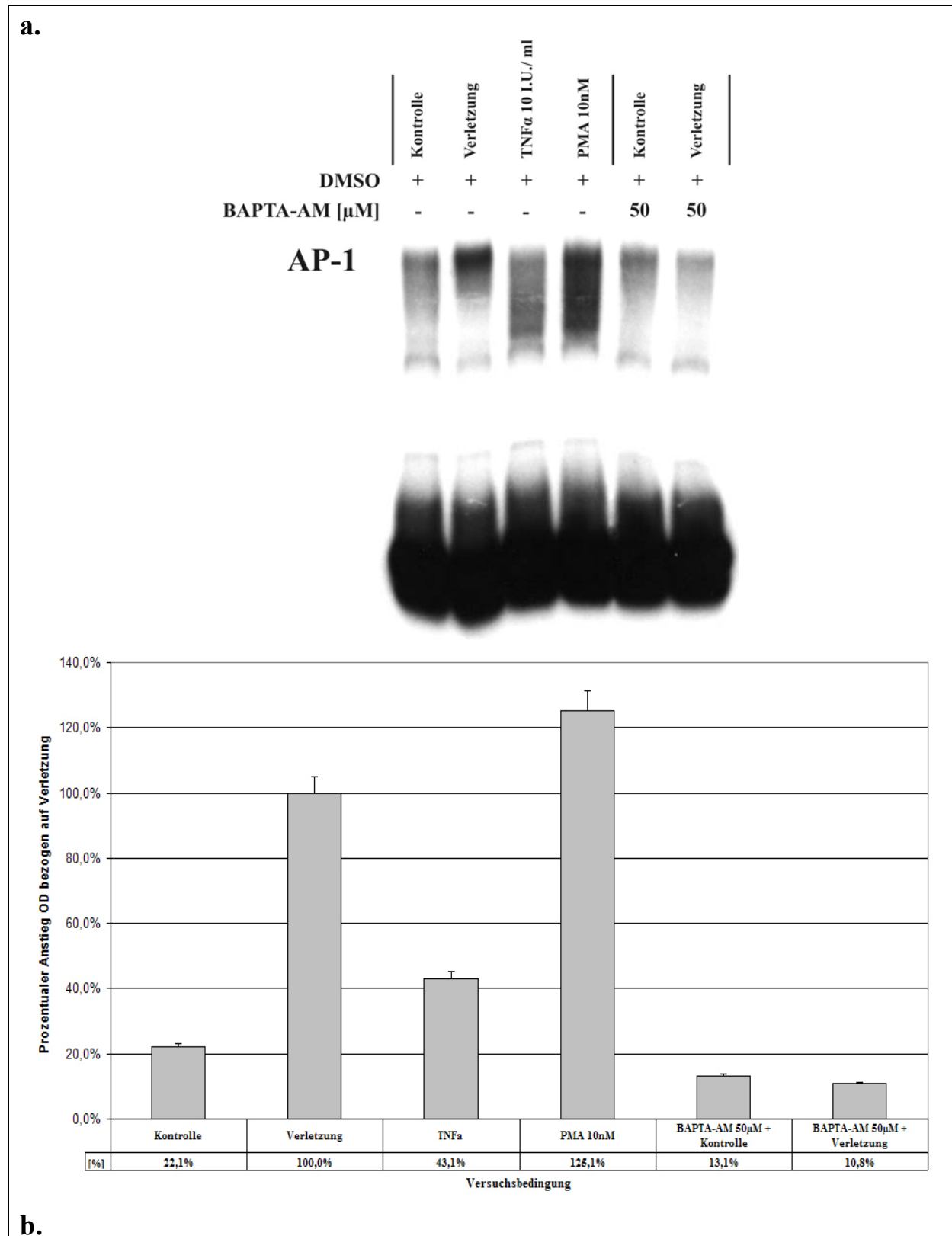


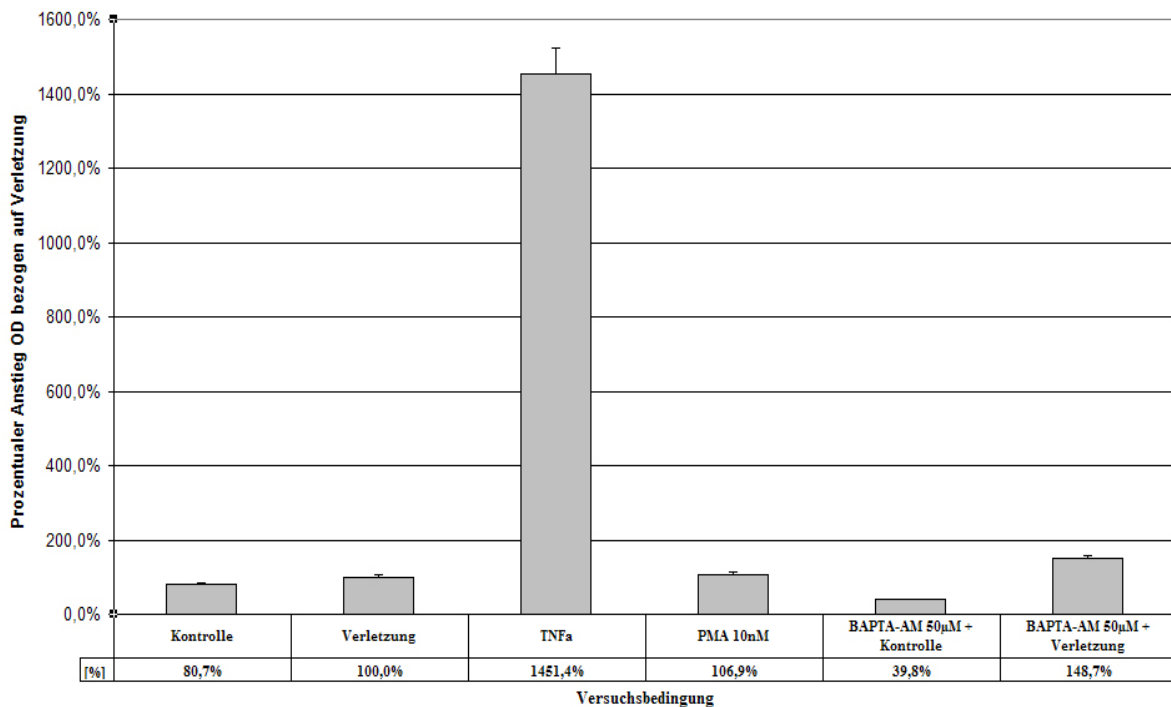
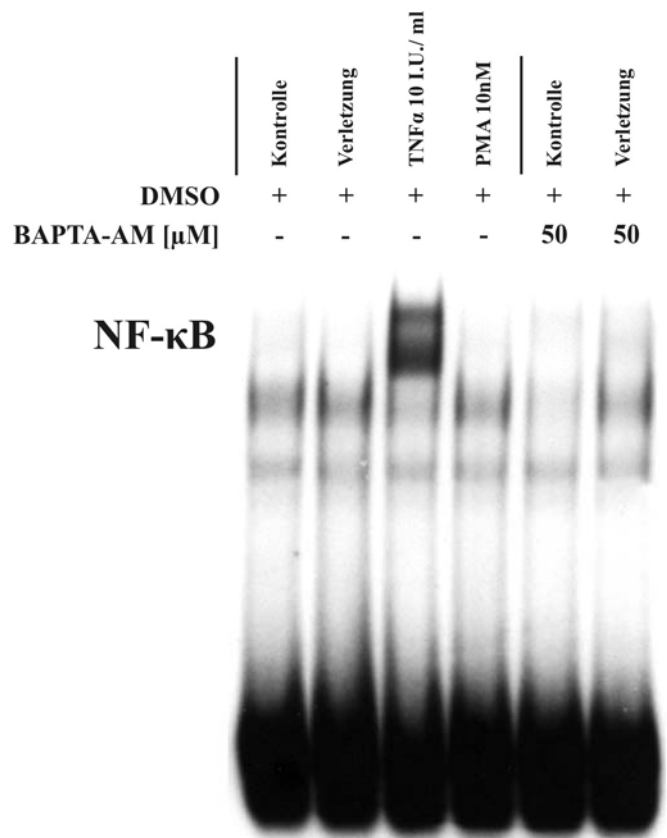
Abbildung 36: Verletzungsbedingter Anstieg der Synthese des Transkriptionsfaktors AP-1. A: Autoradiogramm einer EMS-Analyse. Sowohl die Endothelzellverletzung als auch die Stimulation mit PMA lässt sich ein Gelshift-Effekt für AP-1 auslösen. Somit resultiert die durch Stimulation gesteigerte Synthese der mRNA von c-fos auch zu einer konsekutiv vermehrten Produktion des Proteins AP-1. B: Diagramm der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente.

5.6.2 NF- κ B

Der wie AP-1 ebenfalls heterodimere Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine ubiquitäre Rolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse. Wie in Abschnitt 2.1, 2.2 und 2.3.8.4 dargestellt wurde, wird inzwischen postuliert, dass NF- κ B auch in der Atherogenese eine zentrale Rolle einnehmen könnte. Dies begründet sich in der Tatsache, dass durch NF- κ B eine Vielzahl von Zytokinen positiv reguliert werden, die wesentlich an der Regulation der Zellproliferation von glatten Muskelzellen und Endothelzellen beteiligt sind. Aufgrund dieser Annahme sollte im Folgenden ermittelt werden, ob im verwendeten in-vitro Modell der Endothelzellverletzung ebenfalls eine verstärkte Synthese oder Aktivität des nukleären Faktors κ B nachgewiesen werden kann.

Verwendung fand ein 22 Basenpaare langes DNA-Fragment mit der Konsensussequenz von NF- κ B. Als positive Kontrolle für die Expression von NF- κ B wurde eine Stimulation mit TNF- α durchgeführt, da mehrfach bewiesen werden konnte, dass TNF- α ein potenter Induktor der Aktivierung von NF- κ B ist [12, 14]. Das Ergebnis der EMS-Analysen für NF- κ B ist exemplarisch in Abbildung 37a dargestellt. Das Autoradiogramm zeigt, dass erwartungsgemäß die Stimulation mit TNF- α zu einer deutlich gesteigerten Aktivität von NF- κ B führt. Im Gegensatz hierzu konnte weder durch Verletzung der Endothelzellen noch durch Stimulation mit PMA eine Steigerung der NF- κ B Aktivität nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den bisher dargestellten Ergebnissen dieser Arbeit. So blieb auf Ebene der mRNA die Stimulation der Endothelzellen mit TNF- α ohne Einfluss auf die Expression von c-fos, führte jedoch zu einer starken Expression der mRNA des Zytokins MCP-1, dessen Expression unter anderem durch NF- κ B reguliert wird [249].

a.



b.

Abbildung 37: Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B. A: Autoradiogramm einer EMS-Analyse. Sowohl die Endothelzellverletzung als auch die Stimulation mit PMA blieb, im Gegensatz zur Stimulation mit TNF- α , ohne Effekt auf die Synthese NF- κ B. B: Diagramm der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots 3 identischer Experimente.

6 Diskussion

Sowohl die Atherogenese als auch die Proliferation vaskulärer Endothelzellen nach Verletzung eines primär intakten intimalen Monolayers durch Scherkräfte oder perkutane Angioplastieverfahren wird gesteuert durch ein komplexes Netzwerk aus Zytokinen und direkten Zell-Zell-Interaktionen. Wie in Abschnitt 2 ausführlich dargelegt, nehmen vaskuläre Endothelzellen in diesem Kreislauf eine zentrale Stellung ein, da sie als einziges beteiligtes Zellsystem den chemischen und physikalischen Noxen des Blutstromes direkt ausgesetzt sind. So steuern sie Migration und Proliferation anderer beteiligter Zellsysteme, wie glatter Muskelzellen, Fibroblasten und Makrophagen durch Freisetzung spezifischer Zytokine, wie M-CSF, IL-1 und MCP-1 [83], oder durch Expression von Oberflächenmarkern, wie E-Selectin [65], P-Selectin [64] und VCAM-1 [121]. Die chemischen Faktoren, welche die Expression der genannten Zytokine und Oberflächenmarker bedingen können, wurden mittlerweile ausführlich untersucht. Mit zunehmendem Kenntnisstand wurde jedoch deutlich, dass auch physikalische Noxen eine nicht unerhebliche Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose und ihrer Folgeerkrankungen spielen. Aus diesem Grund konzentrierte sich die Forschung in den letzten Jahren intensiv auf die Reaktionen vaskulärer Endothelzellen auf mechanische Verletzungsreize, insbesondere Shear-Stress durch nicht-laminaren Blutfluss oder auch mechanische Denudierung der Gefäß-Intima durch Angioplastieverfahren. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde deutlich, dass auch mechanische Noxen ähnliche zelluläre Reaktionen auslösen können wie die chemischen Noxen. Dennoch sind die zugrunde liegenden intrazellulären Signalübertragungsvorgänge bislang nur wenig erforscht.

Unabhängig vom auslösenden Reiz kann in den Kreislauf der Atherogenese oder neointimalen Proliferation nur therapeutisch eingegriffen werden, wenn die zugrunde liegenden intrazellulären Vorgänge, welche die Expression der genannten Zytokine und Oberflächenmarker bedingen, auf biochemischer Ebene verstanden werden. Ein wichtiger Ansatzpunkt für Untersuchungen dieser Art sind die sog. „Immediate Early Response Gene“. Dabei handelt es sich in der Regel um Gene, welche für Transkriptionsfaktoren kodieren und als solche den Endpunkt der oft komplexen intrazellulären Signalübertragungsvorgänge darstellen. Durch diese Eigenschaft regulieren sie direkt die Expression der Effektormoleküle (z.B. Zytokine) durch Aktivierung der Expression deren mRNA. Ihr typisches Merkmal ist ein sehr schneller Anstieg der Expression ihrer mRNA, meist schon wenige Minuten nach adäquater Stimulation der Zelle. Einer Untersuchung sind sie dabei mittels Northern-Blot Analysen gut zugänglich.

Im Rahmen der Erforschung intrazellulärer Signalübertragungsvorgänge in Endothelzellen nach Stimulation mit typischen chemischen proatherogenen Noxen konnten einige wenige IEG identifiziert werden, die im Rahmen der Pathogenese der Arteriosklerose und ihrer Folgeerkrankungen die eindeutig größte Rolle spielen. Dabei handelt es sich um AP-1, NF- κ B und EGR-1. Allen ist gemein, dass sie insbesondere in vaskulären Endothelzellen die Expression proatherogener Effektormoleküle wie P- und E-Selectin, VCAM-1, MCP-1 und PDGF regulieren [103, 104, 152]. Wenig untersucht ist jedoch, inwieweit sie auch nach physikalischer Verletzung der Zellen an den intrazellulären Signalübertragungsvorgängen beteiligt sind. Aufgrund der großen Bedeutung physikalischer Noxen insbesondere für die Pathogenese der Restenose nach perkutanen Angioplastieverfahren sollte deshalb in der vorliegenden Arbeit an einem in-vitro Modell der mechanischen Endothelzellverletzung, wie sie z.B. in Folge perkutaner Angioplastieverfahren auftritt, untersucht werden, ob typische IEG aktiviert werden und welche intrazellulären Signalübertragungswege an deren Expression beteiligt sind.

6.1 Expression von Early Response Genen nach Endothelzellverletzung in-vitro

Wie in Abschnitt 5.1.2 gezeigt, führt die in-vitro Verletzung humaner venöser Endothelzellmonolayer in dem verwendeten Modell zu einem starken Anstieg der Expression der mRNA der IEG c-fos und EGR-1 (siehe Abbildung 21a). Dabei unterliegt dieser Anstieg einer für IEG typischen Kinetik (siehe Abbildung 21b). Das Maximum der Expression der mRNA von c-fos konnte nach 30min, das von EGR-1 nach 60 Minuten beobachtet werden. Nach 240min ist bei beiden IEG keine mRNA mehr nachweisbar. Im Gegensatz hierzu konnte kein Anstieg der Expression der mRNA des Zytokins MCP-1 beobachtet werden, welches ebenfalls in die Gruppe der IEG einzuordnen ist. Neben der Stimulation der Zellen durch Verletzung wurde auch eine Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α durchgeführt. Wie zu erwarten, führte diese Stimulation zu einem deutlichen Anstieg der Expression der mRNA von MCP-1. Die Expression von c-fos und EGR-1 ließ sich jedoch hierdurch nicht stimulieren.

Diese Ergebnisse unterstützen die teilweise bereits belegte Vermutung, dass nach physikalischer Verletzung von Endothelzellen ähnliche intrazelluläre

Signalübertragungsvorgänge ablaufen wie nach chemischer Verletzung. Eine Arbeitsgruppe um Tran et al. belegte an bovinen pulmonal-arteriellen Endothelzellen ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Expression der mRNA von c-fos nach mechanischer Verletzung konfluenter Monolayer [231]. Dabei unterscheidet sich das dort verwendete Verletzungsmodell hinsichtlich der Größe des Verletzungswerkzeuges und es wurden nicht vaskuläre sondern bovine pulmonale Endothelzellen verwendet. Darüber hinaus konnte diese Arbeitsgruppe durch Injektion von antisense Oligonukleotide für c-fos belegen, dass die damit ausgelöste Hemmung der transkriptionellen Aktivität von c-fos die Zellmotilität nach Verletzung und damit die Wundreparatur hemmte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die verletzungsinduzierte Expression von c-fos offenbar eine zentrale Stellung in der Regulation der Zellproliferation und Migration nach mechanischer Verletzung besitzt.

Aber auch die verletzungsinduzierte Expression von EGR-1 konnte von anderen Arbeitsgruppen belegt werden. So zeigten Khachigian et al. in einem ähnlichen Modell der physikalischen Endothelzellverletzung an bovinen Zellen, dass die Verletzung zu einer verstärkten Expression des Zytokins PDGF führt und dass dies durch den Transkriptionsfaktor EGR-1 [116-119] vermittelt wird. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass Shear-Stress, vermittelt durch c-fos, zu einer gesteigerten Expression von MCP-1 führt [212, 213]. Die Arbeitsgruppe belegte, dass dieser Effekt durch eine vermehrte Bildung des Second Messengers Stickstoffmonoxyd und konsekutiver Aktivierung von AP-1 bedingt ist.

Die Ergebnisse von Shyy et al. stehen jedoch zumindest teilweise im Widerspruch zu den vorgestellten Daten dieser Arbeit, da keine gesteigerte Expression von MCP-1 nach Endothelzellverletzung nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in den Unterschieden der verwendeten Verletzungsmodelle liegen. Während in der vorliegenden Arbeit ein Modell der direkten Zerstörung des Monolayers durch ein Verletzungswerkzeug verwendet wurde, wählten Shyy et al. ein Strömungsmodell, in dem die Endothelzellen einer konstanten Belastung durch turbulente Strömungen ausgesetzt waren. Somit wurden in der vorliegenden Arbeit Bedingungen simuliert, wie sie bei der perkutanen Angioplastie anzutreffen sind, wohingegen das Modell von Shyy et al. Verhältnisse nachahmt, wie sie im arteriosklerotisch stenosierten Gefäß vorzufinden sind. In Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich somit Hinweise darauf, dass auch die Art der physikalischen Belastung erheblichen Einfluss auf die Reaktion des Zellsystems besitzt. Zwar bedingt die Stimulation der Zellen sowohl mit akuten als auch mit chronischen mechanischen Noxen in beiden Fällen eine identische Sofortreaktion mit Anstieg der mRNA-Spiegel von EGR-1 und c-fos, jedoch trennen sich offenbar in der Folge die

intrazellulären Signalübertragungswege, je nach Art des auslösenden Stimulus. Um diese Vorgänge besser verstehen zu können, ist es essentiell, die zugrunde liegenden intrazellulären Signalübertragungswege aufzuschlüsseln.

Da die Expression des IEG EGR-1 nach mechanischer Endothelzellverletzung bereits gut untersucht worden ist [116-119] und andererseits Tran et al. die Bedeutung von c-fos für die Regulation der Zellmotilität nach Verletzung belegen konnten, wurde der Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Untersuchung der verletzungsinduzierten Expression von c-fos gelegt.

6.2 Interzelluläre Kommunikation nach mechanischer Endothelzellverletzung

Wie auch in dieser Arbeit dargelegt, führt die Verletzung des Endothelzellmonolayers zu einer Migration und Proliferation überlebender Zellen mit konsekutiver Reorganisation und Verschluss der Wundfläche (siehe Abbildung 20). Wie gezeigt werden konnte, ist in unbehandelten Zellen der Vorgang des Wundverschlusses nach 24h vollständig abgeschlossen. Will man die biochemischen Vorgänge, welche zur Stimulation der überlebenden Zellen führen, aufschlüsseln, so stellt sich zunächst die Frage, auf welche Art und Weise zum einen die überlebenden Zellen den Proliferationsreiz übermittelt bekommen und andererseits, wie diese Zellen untereinander kommunizieren.

Prinzipiell stehen zwei mögliche theoretische Erklärungsansätze zur Verfügung. Zum einen könnte die Stimulation der überlebenden Zellen ausgelöst werden durch Faktoren, die aus den zerstörten Zellen freigesetzt wurden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass durch Zug- und Scherkräfte interzelluläre Verbindungen (z.B. Gap-Junctions, Ionenkanäle) aktiviert werden, wodurch intrazelluläre Signalübertragungskaskaden in Gang gesetzt werden, welche in der gesteigerten Expression von z.B. c-fos münden. Erste Untersuchungen hierzu wurden von Sammak et al. angestellt [201]. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass nach mechanischer Endothelzellverletzung in den überlebenden Zellen ein sich wellenartig über den verbliebenen Monolayer ausbreitender Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nachweisbar ist. Unklar bleibt jedoch auch bei den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe, wodurch dieser Anstieg der Calcium-Konzentration ausgelöst wird.

6.2.1 Bedeutung löslicher Faktoren für die interzelluläre Kommunikation nach Verletzung

Um zunächst zu untersuchen, ob lösliche Faktoren, welche aus verletzten Zellen freigesetzt werden, die Antwort überlebender Zellen auf die Verwundung des Monolayers bedingen, wurden Experimente mit Zugabe des Mediums kurz zuvor verletzter Zellen durchgeführt (siehe Abschnitt 5.3). Die Zellen wurden wie beschrieben verletzt und nach unterschiedlich langer Inkubationszeit (5, 10 und 15min) das Medium der verletzten Zellen auf frische, unverletzte Zellen übertragen.

Wie in Abbildung 25 dargestellt, konnte durch Übertragung des Kulturmediums verletzter Zellen kein Anstieg der Expression der mRNA von c-fos ausgelöst werden. Vielmehr zeigten ausschließlich die verletzten Zellen diesen erwarteten Anstieg. Diese Ergebnisse belegen, dass weniger die Freisetzung zellulärer Bestandteile oder löslicher Mediatoren, als vielmehr eine direkte interzelluläre Kommunikation für die Signalübermittlung verantwortlich ist. Hierbei gibt es gerade für die Beteiligung mechanisch aktivierter Ionenkanäle und interzellulärer Kontaktstellen in der Literatur viele Belege. So zeigt Olesen, dass durch Shear-Stress Kalium-Kanäle aktiviert werden, wodurch das transmembranäre Ruhepotential verändert wird [170]. Andere Autoren zeigten, dass durch Shear-Stress Veränderungen des Zytoskeletts [107], eine Aktivierung membranständiger G-Proteine [88, 89, 109] sowie eine gesteigerte Aktivität von Protein-Tyrosinkinasen [108, 109, 178] ausgelöst wird. Die beschriebenen Ergebnisse waren unabhängig von einem externen Stimulus, weshalb in Zusammenschau mit den Daten der vorliegenden Arbeit die Annahme, dass direkte interzelluläre Kommunikationsvorgänge das Signal für eine verstärkte Proliferation überlebender Zellen auslösen, als die wahrscheinlichste angenommen werden kann.

6.2.2 Bedeutung membranständiger Effektormoleküle

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, konnte insbesondere für G-Proteine und Protein-Tyrosinkinasen eine Beteiligung an der Mechanotransduktion nach Endothelzellverletzung nachgewiesen werden. Die Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen an Strömungsmodellen, weshalb untersucht werden sollte, ob diese Effektorsysteme auch nach mechanischer Verletzung aktiviert werden. Hierzu wurden Versuche mit spezifischen Inhibitoren von G-Proteinen (Choleratoxin, Pertussistoxin) und Protein-Tyrosinkinasen (Herbimycin A, Genistein) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 und Abbildung 24 dargestellt.

Interessanterweise hatte die Hemmung klassischer, überwiegend aktivierender G-Proteine durch Cholera toxin keinen hemmenden Effekt auf die Expression der mRNA von c-fos nach Verletzung. Vielmehr konnte ein signifikanter Anstieg der mRNA-Spiegel von c-fos verzeichnet werden. Im Gegensatz hierzu konnte durch Pertussis toxin, welches überwiegend inhibitorisch wirkende G-Proteine hemmt, eine Reduktion der verletzungsbedingten Expression von c-fos um 66,8% im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen erreicht werden. Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen von Gudi und Ishida, welche in einem Strömungsmodell der Endothelzellverletzung ebenfalls durch Einsatz von Pertussis toxin eine signifikante Blockade konsekutiver intrazellulärer Signalübertragungsvorgänge erreichten [88, 89, 108, 109]. So konnten Gudi et al. mit Pertussis toxin die durch Shear-Stress ausgelöste Produktion von PGE₂ wirkungsvoll hemmen. Unklar bleibt, aufgrund welcher intrazellulären Mechanismen Cholera toxin und Pertussis toxin unterschiedlichen Einfluss auf die verletzungsinduzierte Expression von c-fos haben. Auch die aktuelle Literatur bietet hierfür derzeit keinen Erklärungsansatz.

Dennoch belegen die vorgestellten Daten in Zusammenschau mit den Ergebnissen der zitierten Arbeiten, dass die mechanische Endothelzellverletzung bis zu diesem Punkt der Signalübertragung, unabhängig von der Qualität der mechanischen Verletzung, noch einem gemeinsamen Signalübertragungsweg folgt. Diese Annahme begründet sich in der Tatsache, dass die Ergebnisse von Gudi und Ishida aus einem Modell der strömungsbedingten Endothelzellverletzung stammen.

Neben den G-Proteinen stellen Protein-Tyrosinkinasen ein weiteres wichtiges, überwiegend membranständiges Effektorsystem dar. Sie finden sich prinzipiell ubiquitär verteilt in allen Zellkompartimenten. Dennoch spielen sie insbesondere gebunden an spezifische Rezeptoren der Zellmembran eine wichtige Rolle in der transmembranären Signalübertragung. Für die Untersuchung einer potentiellen Beteiligung von PTK's an der verletzungsinduzierten Expression von c-fos wurden die für PTK's spezifischen Inhibitoren Herbimycin A und Genistein eingesetzt. Diese Inhibitoren wirken zwar relativ selektiv auf PTK's, unterscheiden dabei jedoch nicht zwischen membranständigen und damit rezeptorgebundenen und frei gelösten PTK's.

Wie in Abbildung 24 dargestellt, konnte durch Vorinkubation der Zellen mit Herbimycin A und Genistein eine Reduktion der verletzungsinduzierten Expression von c-fos erreicht werden. Dieser Effekt war bei Herbimycin A mit 40,8% ausgeprägter als bei Genistein, dennoch aber bei beiden Inhibitoren nachweisbar. Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung von PTK's, wohl membranständiger PTK's im untersuchten Signalübertragungsweg hin.

Gestützt wird diese These durch die Ergebnisse von Ishida et al. [108, 109] sowie von Papadaki [178, 179], welche in einem Strömungsmodell der Endothelzellverletzung ebenfalls eine Beteiligung von PTK's an der verletzungsbedingten intrazellulären Signalübertragung nachweisen konnten. Da es mit Hilfe der verwendeten Inhibitoren jedoch nicht möglich ist, selektiv PTK's einzelner Zellkompartimente zu blockieren, ist eine weitere Differenzierung der beteiligten PTK's hinsichtlich ihrer Art und Lokalisation nicht möglich.

6.3 Calcium als Second Messenger der mechanischen Endothelzellverletzung

Calcium ist einer der wichtigsten Second Messenger der intrazellulären Signalübertragung. Seine Bedeutung und die wichtigsten durch Calcium regulierten Proteinkinase-Systeme wurden in Abschnitt 2.3.4 ausführlich dargestellt. Aufgrund seiner zentralen Stellung liegt die Vermutung nahe, dass auch die verletzungsinduzierte Expression von c-fos durch Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration vermittelt wird. Belege hierfür wurden von Sammak et al. bereits mehrfach publiziert [201]. Wie beschrieben, konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass nach Zerstörung eines Endothelzellmonolayers ein sich wellenartig ausbreitender Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nachweisbar ist. Es bleibt aber unklar, aus welcher Quelle dieser Anstieg der Calcium-Konzentration gespeist wird. Deshalb sollte die Bedeutung von Calcium als Second Messenger auch im vorliegenden Modell der mechanischen Endothelzellverletzung untersucht werden.

6.3.1 Einfluss der intrazellulären Calcium-Konzentration auf die Expression von c-fos

Um die Calcium-Abhängigkeit der Expression der mRNA von c-fos zu belegen, wurde zunächst untersucht, ob ein künstlich herbeigeführter Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration zu einer gesteigerten Expression der mRNA von c-fos führt. Hierfür wurden die Zellen inkubiert mit der Calcium-Ionophore A23187 und Ionomycin, welche einen starken Einstrom von Calcium aus dem Interstitium auslösen. Wie in Abbildung 27 gezeigt, führte die Behandlung der Endothelzellen mit den genannten Substanzen zu einem im Vergleich zur Verletzung um den Faktor 2,8 gesteigerten Anstieg der Expression von c-fos. Durch dieses

Ergebnis konnte zunächst nur belegt werden, dass die Regulation der Expression von c-fos prinzipiell auch durch Calcium-abhängige Signalübertragungswege erfolgen kann. Um die Beteiligung von Calcium als Second Messenger der verletzungsinduzierten Early Gen Expression zu beweisen, wurde deshalb der etablierte, ausschließlich intrazellulär wirksame Calcium-Chelator BAPTA-AM verwendet.

Die Substanz wurde in ansteigenden Konzentrationen von 10 – 50µM eingesetzt. Es zeigte sich, dass durch die Chelierung intrazellulären Calciums eine konzentrationsabhängige Reduktion der verletzungsinduzierten Expression von c-fos erreicht werden konnte (Abbildung 26). Ab einer BAPTA-Konzentration von 50µM wurde die Expression von c-fos beinahe vollständig unterdrückt, wodurch bewiesen werden konnte, dass Calcium das zentrale Second Messenger System der Signalübertragung nach Endothelzellverletzung darstellt. Die Substanz ist mittlerweile gut etabliert und im verwendeten Dosisbereich ist nicht mit zytotoxischen Reaktionen zu rechnen. Eigene lichtmikroskopische Beobachtungen zeigten, dass BAPTA-AM bei Inkubationszeiten bis zu 12 Stunden keine zytotoxischen Eigenschaften aufwies. Nach ca. 14 Stunden konnte bei höheren Konzentrationen ab 30µM jedoch beobachtet werden, dass sich einzelne Zellen von der Kulturschale ablösten. Bei den kurzen Inkubationszeiten der RNA-Versuche (bis 60min) konnte dieser Effekt keinen Einfluss auf das Versuchsergebnis haben.

Die gewonnenen Daten unterstreichen die These von Sammak et al., dass Calcium eine zentrale Rolle in der inter- und intrazellulären Signalübertragung nach direkter mechanischer Endothelzellverletzung spielt.

6.3.2 Differenzierte Betrachtung der intra- und extrazellulären Calcium-Kompartimente

Nachdem belegt werden konnte, dass Calcium eine zentrale Rolle in der verletzungsbedingten Expression von c-fos spielt, sollte im Folgenden näher untersucht werden, aus welcher extra- oder intrazellulären Quelle der verletzungsbedingte Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration gespeist wird. Dies ist insbesondere interessant, da auf der Zellmembran und dem endoplasmatischen Retikulum unterschiedliche Calcium-Transporter existieren und somit deren pharmakologische Hemmung auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen müsste.

Um einen Einstrom von Calcium aus dem Interstitium wirkungsvoll zu blockieren, wurden 2 verschiedene Strategien besprochen. Zum einen wurden Verletzungsversuche in vollständig Calcium-freiem Inkubationsmedium durchgeführt. Hierzu wurde dem Medium der extrazellulär wirkende Calcium-Chelator EGTA (2mM) zugesetzt. EGTA hat wie BAPTA-AM keine direkten zytotoxischen Effekte, bewirkt jedoch ebenfalls bei sehr langen Inkubationszeiten eine Ablösung von Zellen aus dem Zellverbund. Die zweite Strategie war eine Blockade des extrazellulären Einstroms von Calcium in die Zelle durch unselektive Blockade membranständiger Calcium-Kanäle. Dies wurde durch Einsatz der seltenen Erde Lanthan erreicht, welche ähnliche Ladungseigenschaften wie Calcium besitzt und deshalb um die Calcium-Transporter konkurriert. Es führt jedoch zu einer Verstopfung dieser Transporter, da es eine wesentlich größere atomare Masse besitzt.

Es zeigte sich, dass die Chelierung extrazellulären Calciums zu einer Überexpression von c-fos in den verletzten Zellen führte, welche sich auch in unverletzten Zellen nachweisen ließ. Dies kann durch die Verschiebung des Konzentrationsgradienten von Calcium und des Ladungsgradienten entlang der Zellmembran erklärt werden. Unter physiologischen Bedingungen ist die extrazelluläre Calcium-Konzentration um den Faktor 30.000 höher als die intrazelluläre. Durch die vollständige Entfernung freien Calciums aus dem Extrazellularraum verschiebt sich dieser Gradient und Calcium beginnt in den Extrazellularraum überzutreten. Um diesen Verlust an intrazellulärem freiem Calcium auszugleichen, kommt es zu einer Freisetzung von Calcium aus dem eR mit konsekutiver Stimulation der Expression von c-fos.

Anders verhält sich dies bei der Blockade des Calcium-Einstromes durch Lanthan. Die beobachtete, konzentrationsabhängige Hemmung der Verletzungsinduzierten Expression von c-fos (- 40,2%) deutet darauf hin, dass die Endothelzellverletzung einen Einstrom von Calcium aus dem Extrazellularraum auslöst. Da durch Einsatz von Lanthan im erprobten Dosisbereich [54, 95] jedoch keine vollständige Hemmung der Verletzungsbedingten Expression von c-fos erreicht werden konnte, kann dies als Indiz gewertet, dass der Einstrom von Calcium nach Endothelzellverletzung im wesentlichen aus intrazellulären Speichern, vorwiegend dem eR, gespeist wird.

Die Ergebnisse lassen jedoch noch keine endgültige Beurteilung der Frage zu, aus welchem Kompartiment die Verletzungsbedingte Freisetzung von Calcium erfolgt. Um deshalb die Rolle des eR, welches der größte intrazelluläre Calcium-Speicher ist, weiter zu untersuchen, wurden die selektiven Inhibitoren endoplasmatischer Calcium-Kanäle Thapsigargin und TMB-8 eingesetzt. Während Thapsigargin durch Blockade aktiver Calcium-Pumpen des eR

eine Hemmung der Wiederaufnahme von Calcium in das eR bewirkt, agiert TMB-8 als Hemmstoff des IP₃-Rezeptors. Dadurch wird primär die Freisetzung von Calcium aus dem eR gehemmt und TMB-8 deshalb sehr häufig als Suppressor einer Freisetzung von Calcium aus dem eR eingesetzt.

Dennoch haben beide Substanzen unerwünschte Nebeneffekte. So bewirkt Thapsigargin initial eine Freisetzung von Calcium aus dem eR. Es hemmt lediglich dessen Wiederaufnahme, weshalb dies in der Folge zu einer Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher führt. Dieser Effekt lässt sich im vorgestellten Experiment deutlich verifizieren. So führt der Einsatz von Thapsigargin mit zunehmender Inkubationszeit (5 – 60min) zu einem deutlichen Anstieg der verletzungsinduzierten Expression von c-fos, welcher ähnlich stark ausfiel wie nach Inkubation der Zellen mit der Calcium-Ionophore A23187. Dies muss als Ausdruck der Freisetzung von Calcium aus dem eR durch Thapsigargin angesehen werden.

Im Gegensatz hierzu war man lange Zeit der Überzeugung, dass TMB-8 keine negativen Effekte im Sinne einer überschießenden initialen Calcium-Freisetzung besitzt. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten aber, dass auch die Vorbehandlung mit TMB-8 zu einer deutliche, wenn auch im Vergleich zu Thapsigargin geringer ausgeprägte Überstimulation der c-fos Expression nach Verletzung führte. Ähnliche Effekte wurden auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet [66, 144]. Dabei hat sich gezeigt, dass TMB-8 zwar primär die Freisetzung von Calcium aus dem eR blockiert. Dies ist aber nur von kurzer Dauer (ca. 20min) und wird abgelöst von einer überschießenden Freisetzung von Calcium, ähnlich wie für Thapsigargin [66].

Die beschriebenen Ergebnisse liefern bezüglich der Klärung der Frage, aus welchem Kompartiment verletzungsbedingt Calcium rekrutiert wird, nur Indizien. Dies begründet sich vor allem in den negativen Eigenschaften der verfügbaren Inhibitoren der Calcium-Freisetzung. Dennoch kann aus den Daten der Versuche mit EGTA, A23187, Thapsigargin und in Zusammenschau mit der Literatur angenommen werden, dass der intrazelluläre Calcium-Peak nach Endothelzellverletzung primär durch eine massive Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum bedingt ist [200, 201]. Gestützt wird diese Vermutung durch neueste Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen an Strömungsmodellen mit aortalen Endothelzellen von Ratten [128].

6.3.3 Bedeutung Calcium-abhängiger Proteinkinase-Systeme

Nachdem die Bedeutung von Calcium im Rahmen der verletzungsbedingten Expression von IEG wie z.B. c-fos umfangreich untersucht worden war, blieb die Frage offen, welche Kinase-Systeme downstream von Calcium an der Regulation der Expression von c-fos beteiligt sind. Dabei standen zunächst die klassischen Calcium-abhängigen Kinase-Systeme, allen voran die CaM-Kinasen sowie die Proteinkinase C, im Mittelpunkt der Untersuchungen.

Die Hemmung der CaM-Kinasen I, II und IV durch KN-62 (siehe Abschnitt 5.4.3) hatte keinen Effekt auf die verletzungsinduzierte Expression von c-fos. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Berichten der Arbeitsgruppe um Sammak, welche an bovinen pulmonal-arteriellen Zellen ähnliche Verletzungsversuche durchgeführt hatten. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in bovinen Endothelzellen die verletzungsinduzierte Expression von c-fos einer deutlichen Abhängigkeit von CaM-Kinasen unterworfen war [231]. Unklar bleibt, ob die negativen Ergebnisse mit dem CaMK-Inhibitor KN-62 in der vorliegenden Arbeit allein durch artspezifische Unterschiede der intrazellulären Signalübertragung erklärbar sind. Systematische Fehler in den eigenen Versuchreihen konnten durch Verwendung unterschiedlicher Inkubationszeiten, Konzentrationen und Chargen von KN-62 weitestgehend ausgeschlossen werden. Die Annahme artspezifischer Unterschiede konnte hingegen zusätzlich durch die Durchführung entsprechender Versuche mit arteriellen Endothelzellen aus Nabelschnurarterien (Daten nicht gezeigt) untermauert werden. Auch in diesem Zellsystem blieb der Versuch der Hemmung der CaM-Kinasen durch KN-62 nach Endothelzellverletzung ohne Effekt auf die Expression von c-fos.

Bezüglich der Bedeutung der PKC decken sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Daten von Sammak insofern, als dass durch Vorinkubation der Zellen mit Ro-31-8220 eine deutliche Hemmung der Expression von c-fos erreicht werden konnte. Der Versuch der Downregulation der PKC durch Langzeitinkubation (16 Stunden) der Zellen mit PMA blieb hingegen ohne Effekt auf die Expression von c-fos nach Verletzung. Da der Phorbolster PMA nicht alle Isoformen der PKC stimuliert, kann dies als Hinweis gewertet werden, dass im vorliegenden Modell der Endothelzellverletzung vor allem Mitglieder der α PKC an der Regulation der Expression von c-fos beteiligt sind. Jedoch steht dieser Theorie entgegen, dass die derzeit bekannten Mitglieder der α PKC nicht einer Regulation durch Calcium unterliegen. Somit kommen verschiedene Theorien in Betracht, um das Ergebnis zu erklären. Einerseits wäre es denkbar, dass Mitglieder der α PKC an der verletzungsbedingten Expression von c-fos beteiligt sind und Calcium als Second Messenger wesentlich früher in die Signalübertragungskette eingeschaltet ist, nicht jedoch als Aktivator der Proteinkinase C.

Andererseits ist derzeit nicht klar, ob sowohl PMA als auch Ro-31-8220 weitere, bislang unbekannte Effekte auf die intrazelluläre Signalübertragung haben, welche eine artefizielle Expression oder Hemmung der Expression von c-fos bewirkt haben könnte. Bei Durchsicht der aktuellen Literatur konnte eine Beteiligung der PKC an der Signalübertragung nach Endothelzellverletzung in verschiedenen Ausprägungen nachgewiesen werden, weshalb man deshalb annehmen muss, dass die Hemmung der Expression von c-fos durch Ro-31-8220 keinen artefiziellen Charakter hat und die Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung atypischer Isoformen der Proteinkinase C sehr hoch ist. Hierfür finden sich in der aktuellen Literatur erste Berichte [234].

Zusammengefasst kann aufgrund dieser Ergebnisse und in Zusammenschau mit den publizierten Daten von Sammak et al. eine Beteiligung der PKC an der verletzungsinduzierten Expression von c-fos nachgewiesen werden. Unklar bleibt, ob die nachgewiesene Calcium-Abhängigkeit auf Ebene der PKC oder aber an anderer Stelle der Signalübertragungskette zum Tragen kommt. Interessant ist, dass offenbar die individuellen Signalübertragungswege in humanen und bovinen Zellsystemen nach Endothelzellverletzung unterschiedlich ablaufen. Während in bovinen Zellen eine Aktivierung der CaM-Kinasen erfolgt, werden in humanen Endothelzellen andere Kinase-Systeme aktiviert, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert werden konnten. Nicht berücksichtigt wird bei dieser These allerdings die Möglichkeit, dass die Selektivität von KN-62 in humanen und bovinen endothelialen Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt sein könnte aufgrund genetischer Polymorphismen.

6.4 Einfluss anderer klassischer Kinase-Systeme

6.4.1 Die Proteinkinase A

Neben der PKC ist die PKA das am besten untersuchte Kinase-System in eukaryoten Zelllinien. Ihre mögliche Bedeutung für die verletzungsbedingte Expression von c-fos begründet sich in dem Vorkommen CREB-sensitiver Elemente in der Promotorregion der Gensequenz von c-fos (siehe Abbildung 11) sowie in der Tatsache, dass Shear-Stress zu einer PKA-vermittelten Aktivierung der NO-Synthase [21] und Synthese von VEGF führt [4]. Ungeachtet dieser Hinweise zeigten die eigenen Experimente mit dem selektiven PKA-Inhibitor PKI 14-22 keinen Effekt auf die Expression der mRNA von c-fos (siehe Abschnitt

5.5.1) nach Endothelzellverletzung. Dies muss erneut als Indiz dafür gewertet werden, dass die direkte und indirekte mechanische Verletzung vaskulärer Endothelzellen zu einer differenzierten Aktivierung intrazellulärer Signalübertragungssysteme führt. Auch in der publizierten Literatur fanden sich keine Berichte über eine mögliche Beteiligung der PKA in der Regulation der Genexpression nach mechanischer Endothelzellverletzung.

6.4.2 Die MAP-Kinasen

Gerade für die Regulation der Zellproliferation spielt das komplexe System der MAP-Kinasen eine große Rolle, weshalb es in den letzten Jahren verstärkt untersucht worden ist. Inzwischen sind drei Hauptwege der MAP-Kinasen, die ERK-Kinasen, die p38-MAPKinase sowie die c-Jun N-terminal Proteinkinase JNK, bekannt. Ihre experimentelle Beeinflussung wird jedoch erschwert aufgrund einer komplexen Verschaltung der einzelnen Subfamilien durch Querverbindungen sowie durch das Fehlen superselektiver Inhibitoren für die wichtigsten Mitglieder der Familie.

Wie bei der PKA ergeben sich Indizien für eine mögliche Beteiligung der MAP-Kinasen an der verletzungsinduzierten Expression von c-fos aus den Ergebnissen von Untersuchungen mittels Shear-Stress. So konnte gezeigt werden, dass die strömungsbedingte Endothelzellverletzung in bovinen Endothelzellen zu einer starken Aktivierung der MAP-Kinasen führt [236], die jedoch unabhängig von einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration und unter Beteiligung der nPKC- ϵ erfolgt und durch kleine GTP-bindende Proteine vermittelt wird [234]. Dennoch sollte durch Einsatz der selektiven Inhibitoren PD98059 und SB203580, welche Kinasen des ERK-Signalweges und p38-Signalweges inhibieren, der mögliche Einfluss der MAP-Kinasen im verwendeten Verletzungsmodell untersucht werden.

Wie Abbildung 35 (PD98059) und Abbildung 36 (SB203580) zeigen, hatten beide Inhibitoren keinen hemmenden sondern einen stimulierenden Effekt auf die Expression der mRNA von c-fos nach Endothelzellverletzung. Diese Ergebnisse decken sich mit publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen [211], welche ebenfalls zeigen konnten, dass die verletzungsinduzierte Expression von c-fos in humanen Endothelzellen reguliert wird durch Calcium und G-Proteine, jedoch ohne Beteiligung von Enzymen des MAP-Kinasesystems.

6.5 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren nach Endothelzellverletzung

Durch die Methode der Northern-Blot Analyse lässt sich sehr einfach nachweisen, ob eine Stimulation von Zellen durch einen spezifischen Reiz zu einer verstärkten Expression der mRNA eines Effektorproteins führt. In einem weiteren Schritt sollte geklärt werden, ob die Endothelzellverletzung auch zur Aktivierung des korrespondierenden Transkriptionsfaktors führt.

Wie bereits dargestellt, wurde die Aktivierung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren mittels electrophoretic mobility shift assays untersucht. Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen kodierten für die Konsensussequenz der Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B und CREB (siehe Tabelle 32). Die Wahl der untersuchten Transkriptionsfaktoren begründet sich zum einen in der Tatsache, dass das heterodimere Protein AP-1 die transkriptionell aktive Form von c-fos darstellt und zum anderen in der Tatsache, dass andere Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass die durch Shear-Stress aktivierte Genexpression unter anderem durch die genannten Transkriptionsfaktoren reguliert wird. So führt z.B. Shear-Stress in murinen Endothelzellen zu einer durch AP-1 regulierten gesteigerten Expression von VCAM-1 [123]. Andere Arbeitsgruppen konnten eine durch NF- κ B gesteuerte vermehrte Expression von TF und PDGF-B in vaskulären Endothelzellen nachweisen [138, 139, 188, 189].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Endothelzellverletzung zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führt, welcher ein Heterodimer aus den Proteinen FOS und JUN darstellt (siehe Abbildung 37). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass analog zu den Ergebnissen der RNA-Versuche die Vorinkubation der Zellen mit BAPTA-AM nicht nur die Transkription der mRNA von c-fos sondern auch die Aktivierung von AP-1 signifikant hemmte. Die gesteigerte Expression der mRNA von c-fos muss demnach in unmittelbarem Zusammenhang stehen mit der veränderten Genexpression in überlebenden Zellen nach Verletzung des Monolayers. Wenngleich die vorliegende Arbeit den direkten Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Synthese von AP-1 und einer gesteigerten Zellproliferation und Migration nach Verletzung aus den beschriebenen Gründen nicht herstellen konnte, so gelang dies dennoch der Arbeitsgruppe um Tran et al. [231] durch Mikroinjektion von sense und antisense cDNA von c-fos. Die Gruppe konnte zeigen, dass die Injektion von antisense cDNA von c-fos zu einer deutlichen Hemmung, die Injektion von sense cDNA hingegen zu einer deutlichen Steigerung der Zellmotilität und -proliferation nach Verletzung führte.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse konnten immer wieder belegen, dass die Reaktionen der Zellen auf direkte und indirekte mechanische Stimulation sehr unterschiedlich ausfallen. Dies konnte in EMS-Analysen für NF- κ B erneut bestätigt werden. Obwohl viele Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass NF- κ B der zentrale Effektor einer Shear-Stress induzierten Genexpression ist, scheint dies bei direkter mechanischer Stimulation nicht der Fall zu sein. Konkret zeigten die EMS-Analysen (Abbildung 37) keine Aktivierung von NF- κ B durch Endothelzellverletzung. Lediglich durch Stimulation mit TNF- α war erwartungsgemäß eine deutliche Aktivierung von NF- κ B nachzuweisen. Auch in der publizierten Literatur zu dem Thema waren keine anders lautenden Berichte zu finden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Aktivierung der Proliferation und Migration überlebender Zellen nach direkter mechanischer Verletzung ohne Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B abläuft.

7 Zusammenfassung

Die Arteriosklerose und ihre Folgeerkrankungen stellen die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar. Mehr als 40% der über 65-jährigen versterben an einer Erkrankung aus diesem Formenkreis. Neben der Prävention und Pharmakotherapie spielen interventionelle Verfahren, insbesondere die perkutane transluminale Angioplastie mit Implantation von Stents, die wichtigste Therapieoption dar. Obwohl die interventionellen Verfahren initial hohe Erfolgsraten garantieren, erleiden bis zu 30% der Patienten 6 Monate nach PTA eine Restenose des betroffenen Gefäßabschnitts. Verantwortlich hierfür ist eine überschießende Proliferation der Gefäß-Intima, bestehend aus vaskulären Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Will man die Gefahr der Restenose durch Bildung einer hyperproliferativen Neointima reduzieren, so sind detaillierte Kenntnisse über die zugrunde liegenden pathobiochemischen Vorgänge erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde an nativen, genetisch nicht veränderten humanen vaskulären Endothelzellen die Veränderungen der Genexpression sowie beteiligte intrazelluläre Signalübertragungswege nach direkter mechanischer Verletzung konfluenter Endothelzellmonolayer *in vitro* untersucht. Es zeigte sich eine zeitabhängige Stimulation der mRNA von c-fos, Egr-1 sowie sehr gering auch von MCP-1. Schwerpunktmäßig wurde im Weiteren die verletzungsinduzierte Expression des mitogenen Transkriptionsfaktors c-fos und der beteiligten inter- und intrazellulären Signalübertragungsvorgänge untersucht (siehe Abbildung 38).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *in vitro* die mechanische Verletzung konfluenter Monolayer humaner vaskulärer Endothelzellen zu einer gesteigerten Migration und Proliferation überlebender Zellen mit nachfolgendem Verschluss der Wunde innerhalb von 24 Stunden führt. Dabei konnte in den überlebenden Zellen eine deutlich gesteigerte Transkription der mRNA von c-fos und konsekutiv auch eine gesteigerte Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, der eigentlichen transkriptionell aktiven Form von c-fos, nachgewiesen werden. Dieser Vorgang wird initiiert durch eine starke Freisetzung von Calcium, überwiegend aus intrazellulären Speicherkompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum. Es konnte gezeigt werden, dass Calcium der wichtigste Second Messenger der verletzungsinduzierten Transkription von c-fos darstellt und unter Beteiligung von Tyrosinkinase, G-Proteinen und der Proteinkinase C die vermehrte Synthese der mRNA von c-fos auslöst. Eine wichtige Erkenntnis aus den Ergebnissen dieser Arbeit ist,

dass sich das Muster der Genexpression nach direkter und indirekter Verletzung von Endothelzellen deutlich unterscheidet. Die Auswirkungen einer chronisch andauernden Belastung von Endothelzellen z.B. durch Shear-Stress wurden in den letzten Jahren international sehr genau untersucht und die zugrunde liegenden Signalübertragungsvorgänge in weiten Teilen entschlüsselt. Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen in Zusammenschau mit Daten aus der publizierten Literatur, dass die Auswirkungen direkter und indirekter mechanischer Verletzung auf die Endothelzelle diametral unterschiedlich und nicht vergleichbar sind, weshalb aus den Ergebnissen von Strömungsversuchen nicht auf das Verhalten der Zellen nach PTA geschlossen werden darf. Dies zeigte sich unter anderem darin, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher eine zentrale Rolle in der durch Shear-Stress modulierten Änderung der Genexpression spielt, für die mechanische Verletzung keinerlei Bedeutung hat.

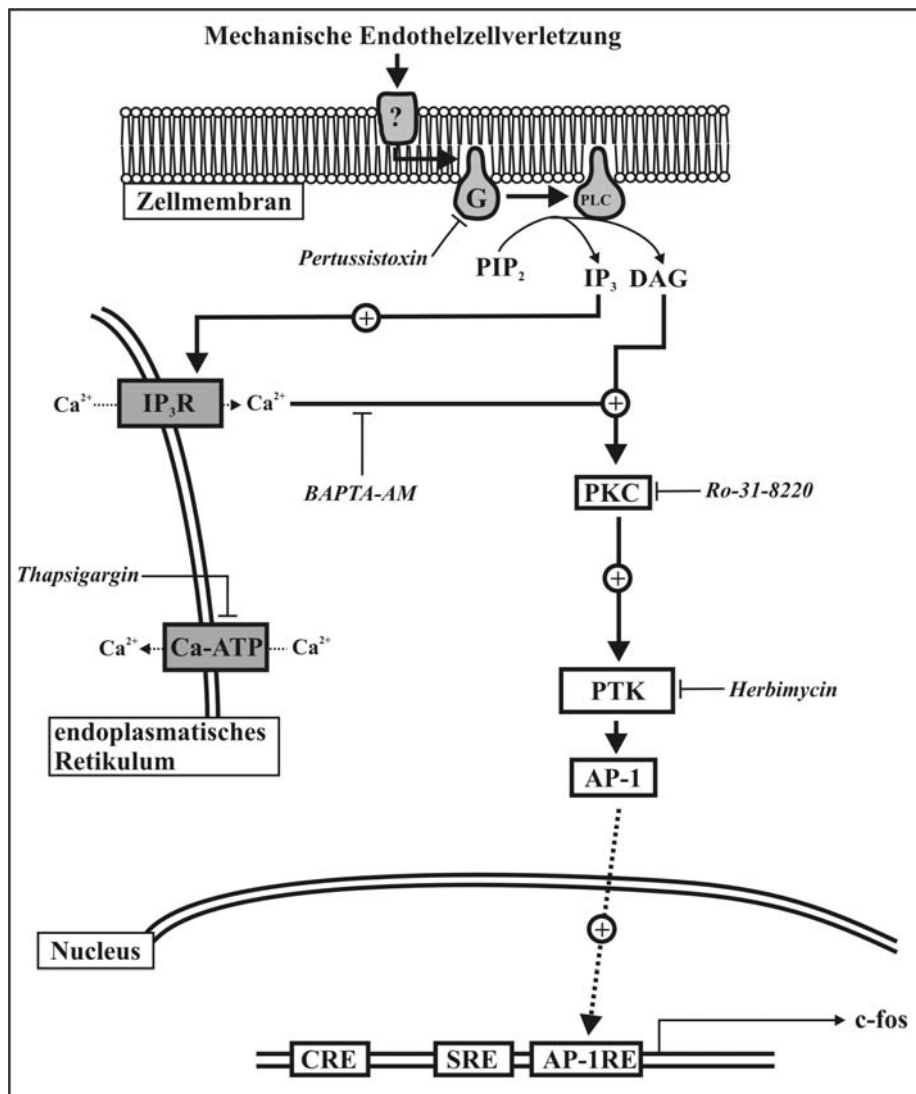


Abbildung 38: Intrazelluläre Signalübertragungswege nach mechanischer Endothelzellverletzung in vitro, soweit sie in der vorliegenden Arbeit entschlüsselt werden konnten.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit in Zusammenschau mit der publizierten Literatur gezeigt werden, dass die Migration und Proliferation überlebender Zellen nach Verletzung eines vaskulären Endothelzellmonolayers abhängig ist von einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1. Diese Ergebnisse liefern Ansatzpunkte für die weiterführende Erforschung der zugrunde liegenden Signalübertragungswege, auf deren Grundlage zukünftige Therapiemöglichkeiten zur Prävention der Restenose durch intimale Hyperplasie aufbauen können.

8 Literaturverzeichnis

1. Aepfelbacher M., Essler M., Huber E., Motoyuki S., *et al.*:
Bacterial toxins block endothelial wound repair.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17: 1623-1629, 1997
2. Ahmad M., Theofanidis P., Medford R.:
Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1
gene expression by tumor necrosis factor-alpha.
J. Biol. Chem. 273: 4616-4621, 1998
3. Alessi D., Cuenda A., Cohen P., Dudley D., *et al.*:
PD98059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase
kinase in vitro and in vivo.
J. Biol. Chem. 270(46): 27489-27494, 1995
4. Amano H., Haysahi I., Yoshida S., Yoshimura H., *et al.*:
Cyclooxygenase-2 and adenylate cyclase/protein kinase A signaling pathway enhances
angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge
implants.
Hum. Cell. 15(1): 13-24, 2002
5. Ando J., Komatsuda T., Kamiya A.:
Cytoplasmatic calcium response to fluid shear stress in cultured vascular endothelial
cells.
In Vitro Cell Dev. Biol. 24: 871-877, 1988
6. Asaoka Y., Nakamura S., Yoshida K.:
Protein kinase C, calcium and phospholipids degradation.
Trends. Biochem. Sci. 17(10): 414-417, 1992
7. Austin G., Ratliff N., Hollman J., Tabei S., *et al.*:
Intimal proliferation of smooth muscle cells as an explanation for recurrent coronary
artery stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty.
J. Am. Coll. Cardiol. 6: 369-375, 1985
8. Autieri M., Yue T., Ferstein G., Ohlstein E.:
Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kB inhibit human vascular
smooth muscle cell adherence and proliferation and prevent neointima formation in rat
carotid arteries.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 213(3): 827-836, 1995
9. Azzi A., Boscoboinik D., Hensey C.:
The protein kinase C family.
Eur. J. Biochem. 208: 547-557, 1992

10. Bao X., Clark C., Frangos J.:
Temporal gradient in shear-induced signaling pathway: involvement of MAP kinase, c-fos and connexin43.
Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 278: 598-605, 2000
11. Bao X., Lu C., Frangos J.:
Temporal gradient in shear but not steady shear stress induces PDGF-A and MCP-1 expression in endothelial cells: role of NO, NF kappa B and Egr-1.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19(4): 996-1003, 1999
12. Barath P., Fishbein M., Lao J., Bernson J., *et al.*:
Tumor necrosis factor gene expression in human vascular smooth muscle cells detected by in vitro hybridization.
Am. J. Pathol. 137: 503-509, 1990
13. Barnes P., Adcock I.:
NF-kB: a pivotal role in asthma and a new target for therapy.
Trends Pharmacol. Sci. 18: 46-50, 1997
14. Bäuerle P., Henkel T.:
Function and activation of NF-kB in the immune system.
Annu. Rev. Immunol. 12: 141-179, 1994
15. Beebe S. J., Corbin J. D.:
Cyclic nucleotide-dependent protein kinases.
The Enzymes 17: 43-111, 1986
16. Beltman J., McCormick F., Cook S.:
The selective protein kinase C inhibitor Ro-31-8220, inhibits mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression, induces c-Jun expression, and activates Jun N-terminal kinase.
J. Biol. Chem. 271(43): 27018-27024, 1996
17. Bennett M., O'Sullivan M.:
Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy.
Pharm. Therap. 91: 149-166, 2001
18. Berliner J., Leitinger N., Watson A.:
Oxidized lipids in atherogenesis: formation, destruction and action.
Thromb. Haemost. 78: 195-199, 1997
19. Birch-Machin M., Dawson A.:
Effects of chelating agents on the Ca²⁺-stimulated ATPase of rat liver plasma membranes.
Biochim. Biophys. Acta. 944(2): 308-314, 1988
20. Block P.:
Restenosis after percutaneous transluminale coronary angioplasty - anatomic and pathophysiological strategies for prevention.
Circulation 81: IV2-IV4, 1990

21. Boo Y. C., Hwang J., Sykes M., Michell B. J., *et al.*:
Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism.
Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 283(5): H1819-1828, 2002
22. Borsch-Haubold A., Pasquet S., Watson S.:
Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitors SB 203580 and PD 98059. SB 203580 also inhibits thromboxane synthase.
J. Biol. Chem. 273(44): 28766-28772, 1998
23. Bossu J., Elhamdani A., Feltz A.:
Voltage-dependent Ca²⁺ entry in confluent bovine capillary endothelial cells.
FEBS Lett. 299: 239-242, 1992
24. Boulton T., Nye S., Robbins D., Ip N., *et al.*:
ERK's: a family of protein serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF.
Cell 65: 663-675, 1991
25. Bours V., Burd P., Brown K., Villalobos J., *et al.*:
A novel mitogen-inducible gene product related to p50/p105-NF-kappa B participates in transactivation through a kappa B site.
Mol. Cell Biol. 12: 685-695, 1992
26. Boyd N. L., Park H., Yi H., Boo Y. C., *et al.*:
Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells.
Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 285(3): H1113 - 1122, 2003
27. Bradshaw D., Hill C., Nixon J., Wilkinson S.:
Therapeutic potential of protein kinase C inhibitors.
Agents. Actions. 38(1-2): 135-147, 1993
28. Brakemeier S., Kersten A., Eichler I., Grgic I., *et al.*:
Shear stress-induced up-regulation of the intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in human endothelium.
Cardiovasc. Res. 60(3): 488 - 496, 2003
29. Brand K., Page S., Rogler G., Bartsch A., *et al.*:
Activated transcription factor Nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion.
J. Clin. Invest. 97: 1715-1722, 1996
30. Brauneis U., Gatmaitan Z., Arias I.:
Serotonin stimulates a Ca²⁺ permeant nonspecific cation channel in hepatic endothelial cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 186: 1560-1566, 1992

31. Breuss J., Cejna M., Bergmeister H., Kadl A., *et al.*:
Activation of nuclear factor-kappa B significantly contributes to lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model.
Circulation 105(5): 633-638, 2002
32. Buffon A., Liuzzo G., Biasucci L., Pasqualetti P., *et al.*:
Preprocedural serum levels of C-reactive protein predict early complications and late restenosis after coronary angioplasty.
J. Am. Coll. Cardiol. 34: 1512-1521, 1999
33. Chai A., Abrams J.:
Homocysteine: a new cardiac risk factor?
Clin. Cardiol. 24(1): 80-84, 2001
34. Chen F., Castranova V., Shi X., Demers L.:
New insights into the role of nuclear factor-kB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of disease.
Clin. Chem. 45: 7-17, 1999
35. Chen F., Huang D., Chen Y., Ghosh G.:
Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappa B bound to DNA.
Nature 391: 410-413, 1998
36. Chen J., Hoshi H., McKeehan W.:
Transforming growth factor type beta specifically stimulates synthesis of proteoglycan in human adult arterial smooth muscle cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5287-5291, 1987
37. Chen N., Han X.:
Dual function of troglitazone in ICAM-1 gene expression in human vascular endothelium.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 282: 717-722, 2001
38. Chesebro J., Lam J., Badimon L., Fuster V.:
Restenosis after arterial angioplasty: a hemorrheologic response to injury.
Am. J. Cardiol. 60: 10B-16B, 1987
39. Chien S., Li J., Shyy J.:
Effects of mechanical forces in signal transduction and gene expression in endothelial cells.
Hypertension 31[part2]: 162-169, 1998
40. Chin D., Means A.:
Calmodulin: a prototypical calcium sensor.
Trends. Cell Biol. 10: 322-328, 2000
41. Chun T., Itoh H., Ogawa Y., Tamura N., *et al.*:
Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin.
Hypertension 29: 1296-1302, 1997

42. Cipollone F., Marini M., Fazio M., Pini B., *et al.*:
Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21(3): 327-334, 2001
43. Clerk A., Sugden P.:
The p38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases (SAPKs/JNKs).
FEBS Lett. 426(1): 93-96, 1998
44. Clinton S., Underwood R., Haynes L., Sherman M., *et al.*:
Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human Atherosclerosis.
Am. J. Pathol. 140: 301-316, 1992
45. Colden-Stanfield M., Schilling W., Ritchie A.:
Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells.
Circ. Res. 61: 632-640, 1987
46. Collins T.:
Endothelial nuclear factor-kB and the initiation of the atherosclerotic lesion.
Lab. Invest. 68: 499-508, 1993
47. Colotta F., Lampugnani M., Polentarutti N., Dejana E., *et al.*:
Interleukin-1 induces c-fos protooncogene expression in cultured human endothelial cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 152(3): 1104-1110, 1988
48. Conklin B., Zhong D., Zhao W., Lin P., *et al.*:
Shear stress regulates occluding and VEGF expression in porcine arterial endothelial cells.
J. Surg. Res. 102(1): 13-21, 2002
49. Coomber B., Gotlieb A.:
In vitro endothelial wound repair. Interaction of cell migration and proliferation.
Arteriosclerosis 10(2): 215-222, 1990
50. Costa M., Shen Y., Maurer F., Medcalf R.:
Transcriptional regulation of the tissue-type plasminogen-activator gene in human endothelial cells: identification of nuclear factors that recognise functional elements in the tissue-type plasminogen-activator gene promoter.
Eur. J. Biochem. 258(1): 123-131, 1998
51. Couet J., Li S., Okamoto T., Ikezu T., *et al.*:
Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins.
J. Biol. Chem. 272: 6525-6533, 1997

52. Cross T., Scheel-Toellner D., Henriquez N., Deacon E.:
Serine/ Threonine protein kinases and apoptosis.
Exp. Cell Res. 256: 34-41, 2000
53. Cui M., Parry G., Oeth P., Larson K., *et al.*:
Transcriptional regulation of the tissue factor gene in human epithelial cells is mediated by Sp1 and Egr-1.
J. Biol. Chem. 271: 2731-2739, 1996
54. Das T., Sharma A., Talukder G.:
Effects of lanthanum in cellular systems. A review.
Biol. Trace. Elem. Res. 18: 201-228, 1988
55. Davies P.:
Flow-mediated endothelial mechanotransduction.
Physiol. Rev. 75: 519-560, 1995
56. Davies P., Polacek D., Handen J.:
A spatial approach to transcriptional profiling: mechanotransduction and the focal origin of Atherosclerosis.
Trends. Biotechnol. 17: 347-351, 1999
57. De Smet B., Pasterkamp G., van der Helm Y., Borst C., *et al.*:
The relation between de novo atherosclerotic remodelling and angioplasty-induced remodelling in an atherosclerotic yucatan micropig model.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18: 702-707, 1998
58. Deber C., Pfeiffer D.:
Ionophore A23187. Solution conformations of the calcium complex and free acid deduced from proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance studies.
Biochem. 15: 132-141, 1976
59. Deitch J., Williams J., Adams M., Fly C., *et al.*:
Effects of beta3-integrin blockade (c7E3) on the response to angioplasty and intra-arterial stenting in atherosclerotic nonhuman primates.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18: 1730-1737, 1998
60. Denhardt D.:
Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/ Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling.
Biochem. J. 318: 729-747, 1996
61. Diamond S., Sachs F., Sigurdson W.:
Mechanically induced calcium mobilization in cultured endothelial cells is dependent on actin and phospholipase.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 14: 2000-2006, 1994
62. Dieter P., Fitzke E., Duyster J.:
BAPTA induces a decrease of intracellular free calcium and a translocation and inactivation of protein kinase C in macrophages.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374: 171-174, 1993

63. Dobrzanski P., Ryseck R., Bravo R.:
Differential interactions of Rel-NF-kappa B complexes with I kappa B alpha determine pools of constitutive and inducible NF-kappa B activity.
EMBO J. 13: 4608-4616, 1994
64. Dong Z., Brown A., Wagner D.:
Prominent role of P-Selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice.
Circulation 101: 2290-2295, 2000
65. Dong Z., Chapman S., Brown A., Frenette P., *et al.*:
The combined role of P- and E-selectins in Atherosclerosis.
J. Clin. Invest. 102: 145-152, 1998
66. Doutheil J., Paschen W.:
Effect of 3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-diethylamino-octyl ester (TMB-8) on neuronal calcium homeostasis, protein synthesis, and energy metabolism.
Pharmacol. Toxicol. 85(2): 85-91, 1999
67. Emanuelsson H., Serruys P., van der Giessen W., Dawkins K., *et al.*:
Clinical and angiographic results with the multi-links coronary stent system; The West European Stent Trial (WEST).
J. Invasive Cardiol. 9: 561-568, 1997
68. Falk E., Shah P., Fuster V.:
Coronary plaque disruption.
Circulation 92: 657-671, 1995
69. Farb A., Burke A., Tang A.:
Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core: a frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death.
Circulation 93: 1354-1363, 1996
70. Fischman D., Leon M., Baim D., Schatz R., *et al.*:
A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators.
N. Engl. J. Med. 331: 496-501, 1994
71. Force T., Pombo C., Avruch J., Bonventre J., *et al.*:
Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease.
Circ. Res. 78: 947-953, 1996
72. Fotsis T., Pepper M., Adlercreutz H., Hase T., *et al.*:
Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis.
J. Nutr. 125 (3 Suppl.): 790S-797S, 1995
73. Franklin R., McCubrey J.:
Kinases: positive and negative regulators of apoptosis.
Leukemia 14: 2019-2034, 2000

74. Funk M., Poensgen B., Graulich W., Jerome V., *et al.*:
A novel, transformation-relevant activation domain in fos proteins.
Mol. Cell Biol. 17(2): 537-544, 1997
75. Furukawa Y., Matsumori A., Ohashi N., Shioi T., *et al.*:
Anti-monocyte chemoattractant protein-1/ monocyte chemotactic and activating factor
antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries.
Circ. Res. 84(3): 306-314, 1999
76. Galea E., Feinstein D.:
Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by
cyclic AMP.
FASEB J. 13(15): 2125-2137, 1999
77. Ghosh S., May M., Kopp E.:
NF- κ B and REL proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses.
Annu. Rev. Immunol. 16: 225-260, 1998
78. Gill D. M., Meren R.:
ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the
activation of adenylate cyclase.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 3050-3054, 1978
79. Gimbrone M. j., Topper J., Nagel T., Anderson K., *et al.*:
Endothelial dysfunction, hemodynamic forces and atherogenesis.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 902: 230-239, 2000
80. Glass D. B., Cheng H. C., Mende-Mueller L., Reed J., *et al.*:
Primary structural determinants essential for potent inhibition of cAMP-dependent
protein kinase by inhibitory peptides corresponding to the active portion of the heat-
stable inhibitor protein.
J. Biol. Chem. 264(15): 8802-8810, 1989
81. Glikli G., Abu-Ghazaleh R., Jezequel S., Wheeler-Jones C., *et al.*:
Vascular endothelial growth factor-induced prostacyclin production is mediated by a
protein kinase C (PKC)-dependent activation of extracellular signal-regulated protein
kinases 1 and 2 involving PKC-delta and by mobilization of intracellular Ca²⁺.
Biochem. J. 353(Pt 3): 503-512, 2001
82. Gonzalez G., Montminy M.:
Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB
at serine 133.
Cell 59: 675-680, 1989
83. Gosling J., Slaymaker S., Gu L., Tseng S., *et al.*:
MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress
human apolipoprotein B.
J. Clin. Invest. 103: 773-778, 1999

84. Gouy H., Cefai D., Christensen S., Debre P., *et al.*:
Ca²⁺ influx in human T lymphocytes is induced independently of inositol phosphate production by mobilization of intracellular Ca²⁺ stores. A study with the Ca²⁺ endoplasmic reticulum-ATPase inhibitor thapsigargin.
Eur. J. Immunol. 20(10): 2269-2275, 1990
85. Greenberg M., Ziff E.:
Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene.
Nature 311: 433-438, 1984
86. Grewe P., Deneke T., Machraoui A., Barmeyer J., *et al.*:
Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen.
J. Am. Coll. Cardiol. 35: 157-163, 2000
87. Gu L., Okada Y., Clinton S., Gerard C., *et al.*:
Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice.
Mol. Cell 2: 275-281, 1998
88. Gudi S., Clark C., Frangos J.:
Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells: involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction.
Circ. Res. 79: 834-839, 1996
89. Gudi S., Huver I., Taliana A., Boss G., *et al.*:
Fluid flow-induced ras activation is mediated by Gαq in human vascular endothelial cells.
FASEB J. 11: A223. Abstract., 1997
90. Gudi S. R., Huvar I., White C. R., McKnight N. L., *et al.*:
Rapid Activation of Ras by fluid is mediated by Gα and Gβγ subunits of heterotrimeric G proteins in human endothelial cells.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23(6): 994 - 1000, 2003
91. Haimovitz-Friedman A., Balaban N., McLoughlin M., Ehliter D.:
Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis.
Cancer Res. 54: 2591-2597, 1994
92. Han J., Richter B., Li Z., Kravchenko V., *et al.*:
Molecular cloning of human p38 MAP kinase.
Biochim. Biophys. Acta 1265 (2-3): 224-227, 1995
93. Haude M., Erbel R., Issa H., Meyer J.:
Quantitative analysis of elastic recoil after balloon angioplasty and after intracoronary implantation of balloon-expandable Palmaz-Schatz stents.
J. Am. Coll. Cardiol. 21: 26-34, 1993

94. Hay D. C., Beers C., Cameron V., Thomson L., *et al.*:
Activation of NF-kappaB nuclear transcription factor by flow in human endothelial cells.
Biochim. Biophys. Acta 1642(1-2): 33 - 44, 2003
95. Henry P. D.:
Atherogenesis, calcium and calcium antagonists.
Am. J. Cardiol. 66(21): 3I-6I, 1990
96. Himmel H., Ravens U.:
TMB-8 as a pharmacological tool in guinea pig myocardial tissues. Effects of TMB-8 on force of contraction and on action potential parameters in atrial and papillary muscles.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 255: 293-299, 1990
97. Hojo Y., Ikeda U., Katsuki T., Mizuno O., *et al.*:
Chemokine expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a prognostic factor for restenosis.
Atherosclerosis 156(1): 165-170, 2001
98. Hollman J., Gruentzig A., Douglas J., King S., *et al.*:
Acute occlusion after percutaneous transluminal coronary angioplasty - new approach.
Circulation 68: 725-732, 1983
99. Hook S., Means A.:
Ca²⁺/CaM-dependent kinases: from activation to function.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 41: 471-505, 2001
100. Horvath C., Welt F., Nedelman M., Rao P., *et al.*:
Targeting CCR2 or CD18 inhibits experimental in-stent restenosis in primates: inhibitory potential depends on type of injury and leukocytes targeted.
Circ. Res. 90(4): 488-494, 2002
101. Hsieh H., Li N., Frangos J.:
Pulsatile and steady flow induces c-fos expression in human endothelial cells.
J. Cell Physiol. 154: 143-151, 1993
102. Hu R., Levin E.:
Astrocyte growth factor is regulated by neuropeptides through Tis 8 and basic fibroblast growth factor.
J. Clin. Invest. 93: 1820-1827, 1994
103. Hu Y., Cheng L., Hochleitner B., Xu Q.:
Activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/JNK) and AP-1 transcription factor in rat carotid arteries after balloon injury.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17(11): 2808-2816, 1997
104. Hu Y., Kiely J., Szente B., Rosenzweig A., *et al.*:
E-Selectin-dependent signalling via the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular endothelial cells.
J. Immunol. 165(4): 2142-2148, 2000

105. Hughes P., Dragunow M.:
Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system.
Pharmacological Reviews. 47: 133-178, 1995
106. Iademarco M., McQuillan J., Rosen G., Dean D.:
Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 promoter (VCAM-1).
J. Biol. Chem. 267: 16323-16329, 1992
107. Ingber D., Dike L., Hansen L.:
Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration and tissue pattern during morphogenesis.
Int. Rev. Cytol. 150: 173-224, 1994
108. Ishida T., Peterson T., Kovach N., Berk B.:
MAP kinase activation by flow in endothelial cells: role of beta 1 integrins and tyrosine kinases.
Circ. Res. 79: 310-316, 1996
109. Ishida T., Takahashi M., Corson M., Berk B.:
Fluid shear stress-mediated signal transduction: How do endothelial cells transduce mechanical force into biological responses?
Ann. New York Acad. Sci. USA 811: 12-23, 1997
110. Izumi H., Ono M., Ushiro S., Kohno K., *et al.*:
Cross talk of tumor necrosis factor-alpha and epidermal growth factor in human microvascular endothelial cells.
Exp. Cell Res. 214(2): 654-662, 1994
111. Jackson T., Patterson S., Thastrup O., Hanley M.:
A novel tumor promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca²⁺ without generation of inositol phosphates in NG115-401L neuronal cells.
Biochem. J. 253(1): 81-86, 1988
112. Jaken S., Kiley S.:
Protein kinase C: interactions and consequences.
Trends. Cell Biol. 4: 223-227, 1994
113. Jo H., Sipos K., Go Y.-M., Law R., *et al.*:
Differential effect of shear stress on Extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase in endothelial cells.
J. Biol. Chem. 272: 1395-1401, 1997
114. Karas S., Gravanis M., Santoian E., Robinson K., *et al.*:
Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: an animal model of restenosis.
J. Am. Coll. Cardiol. 20: 467-474, 1992

115. Kaslow H. R.:
Structure-activity analysis of the activation of pertussis toxin.
Biochemistry 26: 123, 1987
116. Khachigian L., Anderson K., Halnon N., Gimbrone M., *et al.*:
Shear induced endothelial platelet-derived growth factor-A chain gene expression involves Egr-1.
FASEB J. 10: A1002 Abstract., 1996
117. Khachigian L., Anderson K., Halnon N., Gimbrone M., *et al.*:
Egr-1 is activated in endothelial cells exposed to fluid shear stress and interacts with a novel shear-stress-response element in the PDGF A-chain promoter.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17: 2280-2286, 1997
118. Khachigian L., Collins T.:
Early growth response factor 1: a pleiotropic mediator of inducible gene expression.
J. Mol. Med. 76: 613-616, 1998
119. Khachigian L., Resnick N., Gimbrone M. J., Collins T.:
Nuclear factor-kB interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress.
J. Clin. Invest. 96: 1169-1175, 1995
120. King S., Lembo J., Weintraub W., Kosinski A., *et al.*:
A randomized trial comparing coronary angioplasty with coronary bypass surgery.
N. Engl. J. Med. 331: 1044-1050, 1994
121. Kling D., Fingerle J., Harlan J., Lobb R., *et al.*:
Mononuclear leukocytes invade rabbit arterial intima during thickening formation via CD18- and VLA-4-dependent mechanisms and stimulate smooth muscle migration.
Circ. Res. 77: 1121-1128, 1995
122. Kooistra T., Bosma P., Toet K., Cohen L., *et al.*:
Role of protein kinase C and cyclic adenosine monophosphate in the regulation of tissue-type plasminogen activator. Plasminogen activator inhibitor-1 and platelet-derived growth factor mRNA levels in human endothelial cells. Possible involvement of proto-oncogenes c-jun and c-fos.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 11: 1042-1052, 1991
123. Korenaga R., Ando J., Kosaki K., Isshiki M., *et al.*:
Negative transcriptional regulation of the VCAM-1 gene by fluid shear stress in murine endothelial cells.
Am. J. Physiol. 273: C1506-C1515, 1997
124. Kovacs K.:
C-fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map.
Neurochem. Int. 33: 287-297, 1998

125. Krieger M., Acton S., Ashkenas J., Person A., *et al.*:
Molecular flypaper, host defense and Atherosclerosis Structure, binding properties and functions of macrophage scavenger receptors.
J. Biol. Chem. 268: 4569-4572, 1993
126. Krieglstein C., Granger D.:
Adhesion molecules and their role in vascular disease.
Am. J. Hypertens. 14: 44S-54S, 2001
127. Kuchan M., Frangos J.:
Shear stress regulates Endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells.
Am. J. Physiol. 264: H150-H156, 1993
128. Kwan H. Y., Leung P. C., Huang Y., Yao X.:
Depletion of intracellular Ca²⁺ stores sensitizes the flow-induced Ca²⁺ influx in rat endothelial cells.
Circ.Res. 92(3): 286-292, 2003
129. Kyriakis J., Woodgett J.:
The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases.
Nature 369: 156-160, 1994
130. Lakshminarayanan V., Drab-Weiss E., Roebuck K.:
H₂O₂ and tumor necrosis factor- α induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF- κ B to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells.
J. Biol. Chem. 273: 32670-32678, 1998
131. Lampugnani M., Colotta F., Polentarutti N., Pedenovi M., *et al.*:
Thrombin induces c-fos expression in cultured human endothelial cells by a Ca²⁺(+)-dependent mechanism.
Blood 76: 1173-1180, 1990
132. Lan Q., Mercurius K., Davies P.:
Stimulation of transcription factors NF κ B and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 201: 950-956, 1994
133. Lee M., Dhady M., Temizer D., Clifford J., *et al.*:
Regulation of endothelin-1 gene expression by fos and jun.
J. Biol. Chem. 266: 19034-19039, 1991
134. Li C., Xu Q.:
Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells.
Cell Signal. 12: 435-445, 2000
135. Li Y., Shyy J., Li S., Lee J., *et al.*:
The Ras-JNK pathway is involved in shear-induced gene expression.
Mol. Cell Biol. 16: 5947-5954, 1996

136. Libby P.:
Changing concepts of atherogenesis.
J. Intern. Med. 247: 349-358, 2000
137. Libby P., Ridker P., Maseri A.:
Inflammation and Atherosclerosis.
Circulation 105: 1135-1143, 2002
138. Lin M.-C., Almus F., Shyy Y.-J., Chien S.:
Fluid shear stress induces TF gene expression in vascular endothelium.
FASEB J. 9: A412, 1995
139. Lin M.-C., Almus-Jacobs F., Chen H.-H.:
Shear stress induction of the tissue factor gene.
J. Clin. Invest. 99: 737-744, 1997
140. Liu C., Adamson E., Mercola D.:
Transcription factor Egr-1 suppresses the growth and transformation of human HT-1080 fibrosarcoma cells by induction of transforming growth factor beta 1.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11831-11836, 1996
141. Liu F., Thompson M., Wagner S.:
Activating transcription factor-1 can mediate Ca²⁺ and cAMP-inducible transcriptional activation.
J. Biol. Chem. 268: 6714-6720, 1993
142. Lord J., Pongracz J.:
Protein kinase C: a family of isoenzymes with distinct roles in pathogenesis.
J. Clin. Pathol. Mol. Pathol. 48: M57-M64, 1995
143. Mackman N., Brand K., Edgington T.:
Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kB binding sites.
J. Exp. Med. 174: 1517-1526, 1991
144. Malcolm C. S., Ritchie L., Grieve A., Griffiths R.:
A prototypic intracellular calcium antagonist, TMB-8, protects cultured cerebellar granule cells against the delayed, calcium-dependent component of glutamate neurotoxicity.
J. Neurochem. 66(6): 2350-2360, 1996
145. Malek A., Gibbons G., Dzau V., Izumo S.:
Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium.
J. Clin. Invest. 92: 2013-2021, 1993

146. Maltzman J., Carman J., Monroe J.:
Transcriptional regulation of the ICAM-1 gene in antigen receptor- and phorbol ester-stimulated B lymphocytes: role for transcription factor Egr-1.
J. Exp. Med. 183: 1747-1759, 1996
147. Matthews R., Guthrie C., Wailes L.:
Calcium/ calmodulin-dependent protein kinases types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression.
Mol. Cell Biol. 14: 6107-6116, 1994
148. McKee P., Castelli W., McNamara P., Kannel W.:
The natural history of congestive heart failure: the Framingham study.
N. Engl. J. Med. 285: 1441-1446, 1971
149. Means A.:
Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases.
Mol. Endocrinol. 14: 4-13, 2000
150. Mintz G., Popma J., Richard A., Kent K., *et al.*:
Arterial remodelling after coronary angioplasty. A serial intravascular ultrasound study.
Circulation 94: 35-43, 1996
151. Misra R., Bonni A., Miranti C.:
L-type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway.
J. Biol. Chem. 269: 25483-25493, 1994
152. Montgomery K., Osborn L., Hession C., Tizard R., *et al.*:
Activation of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6523-6527, 1991
153. Morimoto M., Kume N., Miyamoto S., Ueno Y., *et al.*:
Lysophosphatidylcholine induces early growth response factor-1 expression and activates the core promoter of PDGF A chain in vascular endothelial cells.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21(5): 771-776, 2001
154. Muhlestein J., Hammond E., Carlquist J., Radicke E., *et al.*:
Increased incidence of Chlamydia species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerosis versus other forms of cardiovascular disease.
J. Am. Coll. Cardiol. 27: 1555-1561, 1996
155. Muller J., Chilian W., Davies M.:
Integrin signalling transduces shear stress-dependent vasodilation of coronary arterioles.
Circ. Res. 80: 320-326, 1996

156. Nagel T., Resnick N., Atkinson W., Dewey C., *et al.*:
Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells.
J. Clin. Invest. 94: 885-891, 1994
157. Newton A. C.:
Protein kinase C: structure, function, and regulation.
J. Biol. Chem. 270(48): 28495-28498, 1995
158. Nicholson A., Hajjar D.:
Herpesviruses in atherosclerosis and thrombosis: etiologic agents of ubiquitous bystanders?
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18: 339-348, 1998
159. Nieto F., Adam E., Sorlie P., Farzadegan H., *et al.*:
Cohort study of cytomegalievirus infection as a risk factor for carotid intimal-medial thickening, a measure of subclinical Atherosclerosis.
Circulation 94: 922-927, 1996
160. Nilius B., Droogmans G., Wondergem R.:
Transient receptor potential channels in endothelium: solving the calcium entry puzzle?
Endothelium. 10(1): 5 - 15, 2003
161. Nishizuka Y.:
The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation.
Nature 334: 661-665, 1988
162. Nishizuka Y.:
Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses.
FASEB J. 9: 484-496, 1995
163. Nollert M., Eskin S., McIntire L.:
Shear stress increases inositol triphosphate levels in human endothelial cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 170: 281-287, 1990
164. Noris M., Morigi M., Donadell I.:
Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow condition.
Circ. Res. 76: 536-543, 1995
165. Ohno M., Cooke J., Dzau V., Gibbons G.:
Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production: modulation by potassium channel blockade.
J. Clin. Invest. 95: 1363-1369, 1995
166. Ohno M., Gibbons G., Dzau V., Cooke J.:
Shear stress elevates endothelial cGMP: role of a potassium channel and G protein coupling.
Circulation 88: 193-197, 1993

167. Ohtsuka A., Ando J., Korenaga R., Kamiya A., *et al.*:
The effect of flow on the expression of vascular adhesion molecule-1 by cultured mouse endothelial cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 193: 303-310, 1993
168. Okabe M., Uehara M.:
New insight into oncoprotein-targeted antitumor effect: herbimycin A as an antagonist of protein tyrosine kinase against Ph1-positive leukemia cells.
Leuk. Lymphoma. 12(1-2): 41-49, 1993
169. Okahara K., Kambayashi J., Ohnishi T., Fujiwara Y., *et al.*:
Shear stress induces expression of CNP gene in human endothelial cells.
FEBS Lett. 373: 108-110, 1995
170. Olesen S., Clapham D., Davies P.:
Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells.
Nature 331: 168-170, 1988
171. Olson E., Burgess R., Staudinger J.:
Protein kinase C as a transducer of nuclear signals.
Cell Growth. Differ. 4: 699-705, 1993
172. Omura S., Iwai Y., Takahashi Y., Sadakane N., *et al.*:
Herbimycin, a new antibiotic produced by a strain of *Streptomyces*.
J. Antibiot. 32(4): 255-261, 1979
173. Orford J., Andrew P., Selwyn A., Ganz P., *et al.*:
The comparative pathobiology of atherosclerosis and restenosis.
Am. J. Cardiol. 86(suppl.): 6H-11H, 2000
174. Osler W.:
Diseases of the arteries.
Philadelphia: Lea and Febiger, 1908
175. Ozaki Y., Violaris A., de Feyter P., Roelandt J.:
Role of underlying vascular remodelling mode in the mechanism of acute luminal gain and late restenosis after balloon angioplasty (BA) and directional coronary atherectomy (DCA).
Circulation 94 Suppl.: 1-134, 1996
176. Pan J., Xia L., Yao L., McEver R.:
Tumor necrosis factor-alpha- or lipopolysaccharide-induced expression of the murine P-selectin gene in endothelial cells involves novel kappaB sites and a variant activating transcription factor/ cAMP response element.
J. Biol. Chem. 273(16): 10068 - 10077, 1998
177. Pang L., Sawada T., Decker S., Saltiel A.:
Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor.
J. Biol. Chem. 270(23): 13585-13588, 1995

178. Papadaki M., Eskin S.:
Effects of fluid shear stress on gene regulation of vascular cells.
Biotechnol. Prog. 13: 209-221, 1997
179. Papadaki M., Eskin S., Ruef J., Runge M., *et al.*:
Fluid shear stress as a regulator of gene expression in vascular cells: possible correlations with diabetic abnormalities.
Diabetes. Res. Clin. Pract. 45(2-3): 89-99, 1999
180. Pasterkamp G., de Kleijn D., Borst C.:
Arterial remodelling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications.
Cardiovasc. Res. 45: 843-852, 2000
181. Pessah I., Waterhouse A., Casida J.:
The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 128: 449-456, 1985
182. Pfeiffer D., Lardy H.:
Ionophore A23187. The effect of H⁺ concentration on complex formation with divalent and monovalent cations and the demonstration of K⁺ transport in mitochondria mediated by A23187.
Biochem. 15: 935-943, 1976
183. Poston R., Haskard D., Coucher J., Gall N., *et al.*:
Expression of intracellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques.
Am. J. Pathol. 140: 665-673, 1992
184. Ranjan V., Diamond S.:
Fluid shear stress induces synthesis and nuclear localization of c-fos in cultured human endothelial cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 79-84, 1993
185. Ranjan V., Xiao Z., Diamond S.:
Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress.
Am. J. Physiol. 269: H550-H555, 1995
186. Reich K., Gay C., Frangos J.:
Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production.
J. Cell Physiol. 143: 100-104, 1990
187. Rensing B., Hermans W., Strauss B., Serruys P.:
Regional differences in elastic recoil after percutaneous transluminale coronary angioplasty: a quantitative angiographic study.
J. Am. Coll. Cardiol. 17: 34B-38B, 1991

188. Resnick N., Collins T., Atkinson W., Bonthron D., *et al.*:
Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7908, 1993
189. Resnick N., Yahav H., Schubert S., Wolfowitz E., *et al.*:
Signalling pathways in vascular endothelium activated by shear stress: relevance to Atherosclerosis.
Curr. Opin. Lipidol. 11(2): 167-177, 2000
190. Riley W., Pfeiffer D.:
Rapid and extensive release of Ca²⁺ from energized mitochondria induced by EGTA.
J. Biol. Chem. 261: 28, 1986
191. Rimon G., Rubin M.:
Regulation of a common, low-affinity binding site for primary prostanoids on bovine aortic endothelial cells.
Biochim. Biophys. Acta 1380(2): 289-296, 1998
192. Ross R.:
George Lyman Duff Memorial Lecture: Atherosclerosis - a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components.
Atherosclerosis 1: 293-311, 1981
193. Ross R.:
The pathogenesis of atherosclerosis - an update.
N. Engl. J. Med. 314: 488-500, 1986
194. Ross R.:
The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.
Nature 362: 801-809, 1993
195. Ross R., Glomset J.:
Atherosclerosis and the arterial smooth muscle Cell.
Science 180: 1332-1339, 1973
196. Ross R., Glomset J.:
The pathogenesis of Atherosclerosis.
N. Engl. J. Med. 295: 369-377, 420-425, 1976
197. Rozek D., Pfeifer G.:
In-vivo protein-DNA interactions at the c-jun promoter in quiescent and serum-stimulated fibroblasts.
J. Cell Biochem. 57: 479-487, 1995
198. Ruben S., Dillon P., Schreck R., Henkel T., *et al.*:
Isolation of a rel-related human cDNA that potentially encodes the 65-kD subunit of NF-kappa B.
Science 251: 1490-1493, 1991

199. Saikku P., Leinonen M., Mattila K., Ekman M., *et al.*:
Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction.
Lancet 2: 983-986, 1988
200. Sambrook J.:
The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmatic reticulum.
Cell 61: 197-199, 1990
201. Sammak P., Hinman L., Tran P., Sjaastad M., *et al.*:
How do injured cells communicate with the surviving cell monolayer?
J. Cell Science 110: 465-475, 1997
202. Santiago F., Lowe H., Kavurma M., Chesterman C., *et al.*:
New DNA enzyme targeting Egr-1 mRNA inhibits vascular smooth muscle proliferation and regrowth factor injury.
Nature Med. 11: 1264-1269, 1999
203. Schmidt A., Yan S., Wautier J.:
Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and Atherosclerosis.
Circ. Res. 84: 489-497, 1999
204. Schwartz M., Schaller M., Ginsberg M.:
Integrins: emerging paradigms of signal transduction.
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11: 549-599, 1995
205. Sen R., Baltimore D.:
Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences.
Cell 46: 705-716, 1986
206. Shaw P., Hörkkö S., Chang M., Curtiss L., *et al.*:
Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance and protective immunity.
J. Clin. Invest. 105: 1731-1740, 2000
207. Sheng M., Greenberg M.:
The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system.
Neuron 4: 477-485, 1990
208. Sheng M., McFadden G., Greenberg M.:
Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB.
Neuron 4: 571-582, 1990
209. Shenolikar S., Karbon E., Enna S.:
Phorbol esters down-regulate protein kinase C in rat brain cerebral cortical slices.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 139(1): 251-258, 1986

210. Sheppard K., Rose D., Haque Z., Kurokawa R., *et al.*:
Transcriptional activation by NF-kappa B requires multiple coactivators.
Mol. Cell Biol. 19: 6367-6378, 1999
211. Shiu Y.T., Li S., Yuan S., Wang Y., *et al.*:
Shear stress-induced c-fos activation is mediated by Rho in a calcium-dependent manner.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 303(2): 548 - 555, 2003
212. Shyy J.-J., Lin M.-C., Han J., Lu Y., *et al.*:
The cis-acting phorbol ester '12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate'-responsive element is involved in shear-stress-induced monocyte chemotactic protein 1 gene expression.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8069-8073, 1995
213. Shyy Y., Hsieh H., Usami S., Chien S.:
Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4678-4682, 1994
214. Sica A., Wang J., Colotta F., Dejana E., *et al.*:
Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor.
J. Immunol. 144(8): 3034-3038, 1990
215. Skålhegg B. S., Taskén K.:
Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation and subcellular localization of subunits of PKA.
Frontiers in Bioscience 2: 331-342, 1997
216. Smith S. j.:
Risk-reduction therapy: the challenge to change.
Circulation 93: 2205-2211, 1996
217. Stula M., Orzechowski H., Gschwend S., Vetter R., *et al.*:
Influence of sustained mechanical stress on Egr-1 mRNA expression in cultured human endothelial cells.
Mol. Cell Biochem. 210(1-2): 101-108, 2000
218. Su B., Karin M.:
Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression.
Curr. Opinion. Immunol. 8: 402-411, 1996
219. Sukhatme V., Cao X., Chang L., Tsai-Morris C.:
A zinc-finger encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation and after depolarization.
Cell 53: 37-43, 1988

220. Sun P., Lou L., Maurer R.:
Regulation of activating transcription factor-1 and the cAMP response element-binding protein by Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinases Type I, II and IV.
J. Biol. Chem. 271(6): 3066-3073, 1996
221. Suzuki Y., Lorenzi M., Shi S., Day R., *et al.*:
Homocysteine exerts cell type-specific inhibition of AP-1 transcription factor.
Free. Radic. Biol. Med. 28(1): 39-45, 2000
222. Takahashi M., Berk B.:
Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) activation by shear stress and adhesion in endothelial cells: Essential role for a herbimycin-sensitive kinase.
J. Clin. Invest. 98: 2623-2631, 1996
223. Takahashi S., Adachi M., Tanaka H.:
Effects of 8-(N-N-diethylamino)octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride (TMB-8) on skinned myocardial fibres of the rat: reversible inhibition of calcium release from the sarcoplasmic reticulum.
Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol. 354: 650-655, 1996
224. Tazelaar H., Karch S., Stephens B., Billingham M.:
Cocaine and the heart.
Hum. Pathol. 18: 195-199, 1987
225. Thastrup O., Cullen P., Drobak B., Hanley M., *et al.*:
Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(7): 2466-2470, 1990
226. Thomson S., Mahadevan L., Clayton A.:
MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction.
Sem. Cell Dev. Biol. 10: 205-214, 1999
227. Tokuda H., Kozawa O., Uematsu T.:
Basic fibroblast growth factor stimulates vascular endothelial growth factor release in osteoblasts: divergent regulation by p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase.
J. Bone. Miner. Res. 15(12): 2371-2379, 2000
228. Tokumitsu H., Chijiwa T., Hagiwara M., Mizutani A., *et al.*:
KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II.
J. Biol. Chem. 265(8): 4315-4320, 1990
229. Topper J., Cai J., Falb D., Gimbrone M.:
Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: Cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10417-10422, 1996

230. Topper J., DiChiara M., Brown J., Williams A.:
CREB binding protein is a required coactivator for Smad-dependent, transforming growth factor beta transcriptional responses in endothelial cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(16): 9506-9511, 1998
231. Tran P. O., Hinman L. E., Unger G. M., Sammak P. J.:
A wound-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase and its transcriptional activation of immediate early genes is important in the regulation of motility.
Exp. Cell. Res. 246(2): 319-326, 1999
232. Tran Q., Ohashi K., Watanabe H.:
Calcium signalling in endothelial cells.
Cardiovasc. Res. 48: 13-22, 2000
233. Traub O., Berk B.:
Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18: 677-685, 1998
234. Traub O., Monia B., Dean N., Berk B.:
PKC- ϵ is required for mechanosensitive activation of ERK1/2 in endothelial cells.
J. Biol. Chem. 272: 31251-31257, 1997
235. Treisman R.:
Regulation of transcription by MAP kinase cascades.
Curr. Opin. Cell Biol. 8: 205-215, 1996
236. Tseng H., Peterson T., Berk B.:
Fluid shear stress stimulates mitogen-activated protein kinase in bovine aortic endothelial cells.
Circ. Res. 77: 869-878, 1995
237. Tsuboi H., Ando J., Korenaga R., Takada Y., *et al.*:
Flow stimulates ICAM-1 expression time and shear stress dependently in cultured human endothelial cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 206: 988-996, 1995
238. Uematsu M., Ohara Y., Navas J., Nishida K., *et al.*:
Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress.
Am. J. Physiol. 269: C1371-C1378, 1995
239. Valen G., Yan Z. Q., Hansson G. K.:
Nuclear factor kappa-B and the heart.
J. Am. Coll. Cardiol. 38(2): 307-314, 2001
240. Walpola P., Gotlieb A., Cybulsky M., Langille B.:
Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15: 2-10, 1995

241. Walsh D. A., Perkins J. P., Krebs E. G.:
An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle.
J. Biol. Chem. 243: 2867-2873, 1968
242. Wang N., Verna L., Hardy S., Forsayeth J., *et al.*:
Adenovirus-mediated overexpression of c-jun and c-fos induces intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19: 2078-2084, 1999
243. Watanabe H., Takahashi R., Tran Q. e. a.:
Increased cytosolic Ca²⁺ concentration in endothelial cells by calmodulin antagonists.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 265(3): 697-702, 1999
244. Weber C.:
Involvement of tyrosine phosphorylation in endothelial adhesion molecule induction.
Immunol. Res. 15(1): 30-37, 1996
245. WHO:
Classification of atherosclerotic lesions.
WHO Tech. Rep. Serv. 143: 1-20, 1985
246. Williams K., Tabas I.:
The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced.
Curr. Opin. Lipidol. 9: 471-474, 1998
247. Xu Q.:
Biomechanical-stress-induced signalling and gene expression in the development of Arteriosclerosis.
Trends Cardiovasc. Med. 10: 35-41, 2000
248. Yang S., Yates P., Whitmarsh A., Davies R., *et al.*:
The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif.
Mol. Cell Biol. 18: 710-720, 1998
249. Ylä-Herttuala S., Lipton B., Rosenfeld M., Särkioja T., *et al.*:
Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5252-5256, 1991
250. Young P., McLaughlin M., Kumar S., Kassis S., *et al.*:
Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site.
J. Biol. Chem. 272(18): 12116-12121, 1997

Genehmigte Vorpublikationen

Sellmayer A., Treitl M., Essler M.

Differentielle Expression von „Early Response“ Genen nach Endothelzellverletzung in vitro.
26. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Angiologie, München 1997

Treitl M., Essler M., Sellmayer A.

Mechanismen der Expression von c-fos und EGR-1 nach Endothelzellverletzung in vitro.
Research Festival der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern 1997

Treitl M., Essler M., Aepfelbacher M., Sellmayer A.

Mechanical endothelial cell injury induces Growth-related Early Gene expression by a calcium-sensitive mechanism.

70th annual meeting of the European Atherosclerosis Society, Genf 1998

Treitl M., Essler M., Aepfelbacher M., Sellmayer A.

Expression von Early Response Genen durch die mechanische Endothelzellverletzung.
104. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden 1998

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. P.C. Weber für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Labors und der Arbeitsmittel sowie die vielseitigen Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten meinen besonderen Dank ausdrücken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Priv.-Doz. Dr. med. A. Sellmayer für die ausgezeichnete Betreuung sowie die ständige Unterstützung und Anregung im Rahmen der Arbeit aber auch in allen medizinischen und beruflichen Fragen.

Herrn Prof. Dr. med. M. Äpfelbacher sowie Herrn Dr. med. M. Essler danke ich herzlich für die freundlichen Bereitstellung des Verletzungsmodells.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. rer.nat. T. Singer für die hervorragende Unterstützung bei der Optimierung der Methoden sowie für zahlreiche Diskussionen der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau M. Morbitzer sowie Frau B. Böhlig für die Einführung und Unterstützung bei den technischen Arbeiten im Labor.

Allen Mitarbeitern des Instituts, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Promotionsarbeit stets hilfreich unterstützt haben, möchte ich ebenfalls danken.

Lebenslauf

Am 13. Juli 1971 wurde ich als Sohn des Diplom-Bauingenieurs Ernst Treitl und seiner Frau Uta Treitl, geborene Höllein, in München geboren.

Nach der Einschulung in die Grundschule an der Rotbuchenstrasse in München 1978 trat ich 1982 in das Albert-Einstein-Gymnasium München ein und erlangte im Juli 1991 die Allgemeine Hochschulreife.

Von September 1991 bis September 1992 leistete ich meinen Grundwehrdienst in der Sanitätsstaffel der Luftwaffe, zuletzt am Standort Fürstenfeldbruck, ab.

Im Wintersemester 1992 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Ohne den Studienort zu wechseln, schloss ich dort im November 1999 mein Medizinstudium mit dem 3. Teil des Staatsexamens ab.

Im Dezember 1999 begann ich meine Zeit als Arzt im Praktikum am Stiftsklinikum Augustinum in München im Fachgebiet Innere Medizin. Im Februar 2000 wechselte ich an das Institut für Klinische Radiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt, wo ich im Juni 2001 die Zeit als Arzt im Praktikum abschloss und als Arzt approbiert wurde.

Derzeit arbeite ich als Assistenzarzt am Institut für Klinische Radiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt.