

Aus dem Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie,
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Markus Sperandio



Phänotypischer Switch der vaskulären glatten Muskelzellen: Die Rolle von ARNO in resistinvermittelter Migration

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

vorgelegt von
Pascal Gräff

.....
aus
Bad Kreuznach

.....

Jahr
2022

.....

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erster Gutachter: PD Dr. Hanna Mannell

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Andreas Schober

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Christian Schulz

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2022

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|---|-------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Vaskuläre glatte Muskelzellen (VGMZ) | 1 |
| 1.1.1 Funktion der VGMZ | 1 |
| 1.1.2 Phänotypischer „Switch“ der VGMZ | 4 |
| 1.1.2.1 Migration und Proliferation der VGMZ | 6 |
| 1.1.2.2 Signalkaskaden des phänotypischen Switches | 8 |
| 1.1.2.3 Der phänotypische Switch der VGMZ in der Atherosklerose | 12 |
| 1.2 Das proinflammatorische Hormon Resistin | 16 |
| 1.2.1 Resistin und Insulinresistenz, Diabetes Mellitus und metabolisches Syndrom | 17 |
| 1.2.2 Resistin und Inflammation | 19 |
| 1.2.3 Resistin und seine Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen | 20 |
| 1.3 Der Guaninnukleotid Austauschfaktor ARNO | 21 |
| 1.4 Fragestellung | 26 |
| 2 Methoden und verwendetes Material | 27 |
| 2.1 Chemikalien & Kits | 27 |
| 2.2 Puffer und Lösungen | 29 |
| 2.2.1 PBS – Puffer | 29 |

| | |
|--|----|
| 2.2.2 Zellkulturmedien | 29 |
| 2.3 Materialauflistung | 30 |
| 2.3.1 Instrumente | 30 |
| 2.3.2 Zellkultur | 31 |
| 2.3.3 Antikörper, Inhibitoren, Hormone und Wachstumsfaktoren | 32 |
| 2.3.4 Software | 33 |
| 2.4 Zellen und Zellkultur | 33 |
| 2.4.1 Verwendete Zellen | 33 |
| 2.4.2 Einfrieren der Zellen | 34 |
| 2.4.3 Auftauen der Zellen | 34 |
| 2.4.4 Zellkultur | 34 |
| 2.4.5 Beschichtung der Zellkulturschalen | 35 |
| 2.4.6 Stimulation und Inhibition der Zellen | 35 |
| 2.5 Transfektion | 36 |
| 2.5.1 Transfektionslösungen und Plasmid-DNA | 36 |
| 2.5.2 ARNO Konstrukte (Plasmide) | 36 |
| 2.5.3 Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA | 36 |
| 2.6 Versuche | 38 |
| 2.6.1 MTT-Assay | 38 |
| 2.6.2 Western-Blot und Proteinbestimmung | 39 |
| 2.6.3 RNA-Isolation | 46 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.6.3.1 | Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) von MMP-2 mRNA | 46 |
| 2.6.4 | Messung der Zellviabilität | 47 |
| 2.6.4.1 | Trypanblau-Färbung | 47 |
| 2.6.4.2 | Propidiumiodid-Färbung | 48 |
| 2.6.5 | Zellkernfärbung | 49 |
| 2.6.5.1 | Zellfixierung | 49 |
| 2.6.5.2 | DAPI-Färbung | 49 |
| 2.7 | Adhäsions-Assay | 49 |
| 2.8 | Scratch-Assay | 50 |
| 2.9 | Statistische Auswertung | 51 |
| 3 | Ergebnisse | 52 |
| 3.1 | Resistin beeinflusst nicht die Proliferation von VGMZ | 52 |
| 3.2 | Cytohesinhemmung beeinflusst resistinabhängige VGMZ Adhäsion | 54 |
| 3.3 | Resistin fördert die VGMZ-Migration | 55 |
| 3.4 | Cytohesinhemmung unterdrückt resistinabhängige VGMZ-Migration | 56 |
| 3.5 | Expression von ARNO WT, E156K und R280D in VGMZ | 57 |
| 3.6 | ARNO Inaktivierung hemmt resistininduzierte VGMZ-Migration | 59 |
| 3.7 | PI3K/AKT und p38 MAPK medieren resistinabhängige VGMZ-Migration | 60 |
| 3.8 | ARNO steigert die Migration der VGMZ durch die Expression von Matrix-Metalloproteinase-2 | 61 |
| 3.9 | ARNO beeinflusst die Aktivierung des PI3K/AKT und p38 MAPK Signalwegs | 63 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 4 | Diskussion | 66 |
| 4.1 | Resistin und der phänotypische Switch von VGMZ | 66 |
| 4.2 | ARNO und die resistinvermittelte Proliferation, Migration, MMP-2 Expression und Adhäsion | 68 |
| 4.3 | ARNO und resistinvermitteltes VGMZ Signalling | 70 |
| 4.4 | Mögliche Effekte von Resistin auf ARNO und den atherosklerotischen Prozess | 73 |
| 4.5 | Limitationen dieser Arbeit | 74 |
| 4.6 | Ausblick | 75 |
| 5 | Zusammenfassung | 76 |
| 5.1 | Abstract Deutsch | 76 |
| 5.2 | Abstract Englisch | 78 |
| 6 | Appendix | 81 |
| 6.1 | Abkürzungen | 81 |
| 7 | Verwendete Literatur | 83 |
| 8 | Danksagung | 97 |
| | Affidavit | 98 |
| | Eidesstattliche Versicherung | 98 |
| | Lebenslauf | 99 |
| | Publikationen | 100 |
| | Erstautorschaften | 100 |
| | Zweitautorschaften | 100 |

Abbildungsverzeichnis

| | Seite |
|--|-------|
| Abbildung 1.1.1: Aufbau eines arteriellen Gefäßes | 3 |
| Abbildung 1.1.2: Differenzierte vs. dedifferenzierte VGMZ | 6 |
| Abbildung 1.1.3: Wichtige vereinfachte Signalkaskaden für VGMZ-Proliferation und -Migration | 12 |
| Abbildung 1.2.1: Die Rolle des Resistin im Circulus Vitiosus | 17 |
| Abbildung 1.3.1: Funktionskreis des GEF | 22 |
| Abbildung 1.3.2: ARNO und seine Rolle in der Migration und Proliferation | 23 |
| Abbildung 2.6.1: Komplexveränderung, die dem MTT-Assay zugrunde liegt und zu der Farbveränderung führt | 39 |
| Abbildung 2.6.2: Abbildung eines Versuchsaufbaus zum Western Blot | 43 |
| Abbildung 3.1.1: VGMZ-Proliferation | 53 |
| Abbildung 3.2.1: Cytohesinhemmung reduziert die Adhäsion von VGMZ | 54 |
| Abbildung 3.3.1: Resistin steigert die Migration der VGMZ | 55 |
| Abbildung 3.4.1: Cytohesinhemmung senkt die Migration der VGMZ | 56 |
| Abbildung 3.5.1: Transfektion mit ARNO-Mutanten und Wildtyp beeinflusst nicht das Zellüberleben | 58 |
| Abbildung 3.6.1: Die ARNO GEF-Aktivität und die PH-Domäne beeinflussen resistinvermittelte VGMZ-Migration | 59 |
| Abbildung 3.7.1: Inhibitoren der PI3K/Akt, sowie p38 MAPK Signalwegen senken die Resistin-Stimulierte Migration | 60 |
| Abbildung 3.8.1: Resistin steigert die MMP-2 mRNA-Expression via ARNO und p38 MAPK | 62 |
| Abbildung 3.9.1: Resistin führt via ARNO zur signifikanten Steigerung der p38 Phosphorylierung | 64 |
| Abbildung 3.9.2: Resistin induziert AKT-Phosphorylierung via ARNO | 65 |
| Abbildung 3.9.3: Resistinvermittelte ERK1/2 Phosphorylierung geschieht unabhängig von ARNO | 65 |
| Abbildung 4.3.1: Resistinvermittelte Signalkaskaden-Aktivierung in VGMZ im Bezug auf ARNO | 72 |

1 Einleitung

1.1 Vaskuläre glatte Muskelzellen (VGMZ)

1.1.1 Funktion der VGMZ

Die wichtigste Aufgabe des Blutgefäßsystems (bestehend aus Arterien, Venen und Gefäßen der Mikrozirkulation wie Venolen, Arteriolen und Kapillaren) ist die Versorgung der Zellen im gesamten Körper, unabhängig von ihrer Spezifikation und mit nur einigen wenigen Ausnahmen, mit sauerstoffreichem Blut. Darüber hinaus ist die Aufgabe des Gefäßsystems die Verteilung und der Ausgleich der Elektrolyte und Nährstoffe, sowie der Abtransport der vom Körper verstoffwechselten Abbauprodukte, sodass diese später über Lunge, Leber oder Niere ausgeschieden werden können. Die Verteilung von Hormonen jeglichen Ursprungs findet ebenfalls durch das Gefäßsystem statt. Für die Funktion des Gefäßsystems ist die Aufrechterhaltung des Blutdrucks essenziell. ⁽¹⁾

Mit Ausnahme der Kapillaren, welche nur aus Endothelzellen bestehen, sind alle weiteren Gefäße gleich aufgebaut und bestehen aus drei Gewebsschichten (Abbildung 1.1.1). Die *Tunica intima* besteht aus Epithel- und Bindegewebe sowie Endothelzellen, die das Gefäßlumen auskleiden. In der *Tunica media* befinden sich vaskuläre glatte Muskelzellen (VGMZ) und in der *Tunica Externa* zum größten Teil Kollagen.⁽²⁾ Arterien sind insbesondere in der zweiten Schicht, der *Tunica media*, dicker, da sich hier mehrere Schichten VGMZ befinden. Dies liegt einerseits an dem höheren Blutdruck, welchen sie aushalten, aufrechterhalten und weitertransportieren müssen. Andererseits muss hier ein größerer Aufwand zur Blutdruckregulation betrieben werden, wofür diese Muskelzellen von elementarer Bedeutung sind. Die *Tunica externa* oder *adventitia* sowie die *Tunica interna* sind in den Arterien und Venen in etwa gleich ausgeprägt ⁽²⁾.

Die VGMZ in der *Tunica media* können durch Kontraktion bzw. Dilatation das Gefäßlumen verändern, damit den Tonus des Gefäßes erhöhen oder senken und dadurch den Blutdruck wie auch die Perfusion regulieren.⁽³⁾ Hierbei spielen die Arterien mit ihrer ausgeprägteren Schicht an VGMZ eine deutlich größere Rolle verglichen mit den weiteren Gefäßen.⁽³⁾ Die Blutdruckregulation wird auf unterschiedliche Weise durchgeführt. Wichtige Funktionen bei der Blutdruckregulation spielen z.B. das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), welches von der Niere kontrolliert wird, sowie die

Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, die über ihre Wirkung an α 1-Adrenozeptoren (Adrenalin und Noradrenalin; Tonussteigerung) oder β 2 Rezeptoren (Adrenalin; Tonussenkung) an den VGMZ den Blutdruck dosisabhängig erhöhen bzw. senken. Lokal spielen Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO), ADP, H⁺, K⁺, Prostaglandine (PGI) und Endothelin-1, die aus dem Endothel freigesetzt werden und auf VGMZ wirken, eine tragende Rolle.⁽³⁾ Adipokine, wie z.B. Adiponektin, Leptin oder Resistin⁽⁴⁾ aus dem Fettgewebe können ebenso durch Wirkung auf die VGMZ den Blutdruck beeinflussen⁽⁵⁾. Intrazellulär bewirken die systemischen und lokalen Faktoren eine Aktivierung von Signalkaskaden und eine Erhöhung des intrazellulären Calciums, die final dazu führt, dass Calcium an Troponin bindet und Tropomyosin, ein über dem Aktinstrang gelegenes Protein, entfernt. Jetzt können die Myosinfilamente unter Hydrolyse von ATP zu ADP entlang des Aktinstranges wandern und verringern somit die Länge des Muskels. Handelt es sich bei dieser Reaktion um eine gerichtete Bewegung, wird das Lumen des Gefäßes kleiner.

Die VGMZ, die den Gefäßtonus regulieren, sind differenzierte Zellen, die dadurch einen kontraktilen und „ruhenden“ Phänotyp aufweisen. Da sie aber nicht terminal differenziert sind, unterliegen sie einer phänotypischen Plastizität und können durch Dedifferenzierung ihren Phänotyp zu einer nicht kontraktilen ändern.⁽⁶⁾ Dedifferenzierte VGMZ sind proliferativ, können migrieren und Proteasen exprimieren, sowie die Komponente der extrazellulären Matrix (EZM) abbauen. Diese Dedifferenzierung wird „phänotypischer Switch“ (aus dem englischen „phenotypic switch“) genannt und ist abhängig von der Umgebung. Diese phänotypische Veränderung kann laut der aktuellen Theorie von Gefäßverletzungen, oxidativem Stress, Gefäßentzündung mit hoher Zytokinfreisetzung, Wachstumsfaktoren (PDGF, IGF, FGF) und Veränderungen der intrazellulären Umgebung (microRNA, Genexpression) induziert werden⁽⁷⁾.

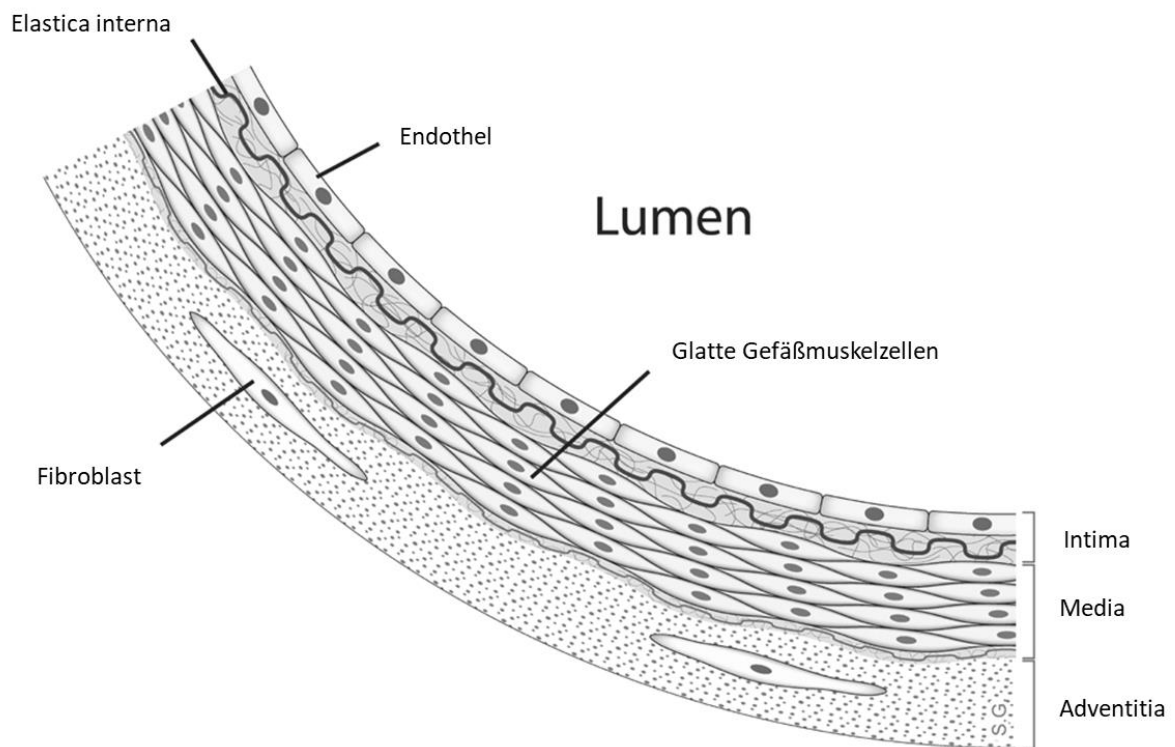


Abbildung 1.1.1

Abbildung 1.1.1: Aufbau eines arteriellen Gefäßes⁽⁸⁾

Die Gefäßwand besteht aus einzelnen Schichten. Außen befindet sich die Adventitia, welche aus einem lockeren Bindegewebe und Fibroblasten besteht. In dieser Schicht befinden sich ebenfalls die Vasa Vasorum, welche an der Versorgung des Blutgefäßes beteiligt sind. Die Tunica Media besteht aus vaskulären glatten Muskelzellen (VGMZ), die durch Kontraktion und Relaxation eine Veränderung des Lumens verursachen können. In der innen gelegenen Intima oder Tunica intima befinden sich die Endothelzellen, die das Innere des Gefäßes auskleiden und Signalstoffe freisetzen können, die den Tonus der VGMZ beeinflussen, sowie die *Elastica interna*, welche aus elastischen Fasern besteht und von Bindegewebe umgeben ist.

Quelle: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Anatomy_artery.png; Anpassung mit Integration deutscher Namensentsprechungen.

1.1.2 Phänotypischer „Switch“ der VGMZ

Unter dem phänotypischen „Switch“ versteht man die Zustandsänderung der VGMZ von fest verankerten, ortständig kontraktilen Zellen zu mobilen Zellen, welche erneut sowohl zur Migration als auch Proliferation fähig sind. Differenzierte ruhende VGMZ haben einen kontraktilen Phänotyp und exprimieren hierfür typische Proteine, wie smooth muscle (SM) α -Actin, SM22a, myosin heavy chain (MHC) und Smothelin, welche auch als Marker für diesen Phänotyp benutzt werden können. Differenzierte VGMZ haben eine niedrige Proliferationsrate und sind nicht synthetisierend aktiv.⁽⁹⁾ Unter bestimmten Bedingungen können VGMZ ihren Phänotyp aber verändern. Mit dem Phänotyp ist in diesem Zusammenhang sowohl die physiologische als auch die morphologische Erscheinung gemeint. So sind differenzierte VGMZ eher länglich und lediglich zu einer eindimensionalen Bewegung imstande, während dedifferenzierte VGMZ nach dem „Switch“ eine deutlich rundere Form haben und prinzipiell dreidimensionale Bewegungen durchführen können (Abbildung 1.1.2). Physiologisch geschieht dieser Switch z.B. während der embryonalen Angiogenese, Neovaskularisation, vaskulären Remodelling und Gefäßschädigung, wobei VGMZ entlang des durch Promotionsfaktoren vorgegebenen Weges migrieren und proliferieren, wodurch sie zur Entstehung der Gefäße entscheidend beitragen.⁽⁹⁾ Diese phänotypische Veränderung kommt aber auch in pathophysiologischen Zuständen vor, z.B. in der Atherosklerose. Während die Expression von Proteinen, die wichtig für die Proliferation und Migration sind, hochreguliert werden, sinkt die Expression der oben genannten typischen Markern für differenzierte VGMZ.^(10, 11) Es wird unter anderem die Expression von Integrinen, Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Ca^{2+} -Kanälen induziert.⁽¹²⁻¹⁴⁾ Relativ neue Ergebnisse zeigen interessanterweise, dass microRNAs (miRNA) diese phänotypischen Veränderungen regulieren können, indem sie die Expression der Signalproteine, die für diesen Prozess wichtig sind, steuern.⁽¹³⁾

Der phänotypische Switch wird durch verschiedene Faktoren induziert. Einer der wichtigsten Faktoren hierfür ist der Wachstumsfaktor Platelet derived growth factor (PDGF). Dieser unterdrückt die Expression von VGMZ Markern, induziert die Proliferation und insbesondere auch die Migration.^(10, 15) Obwohl der Effekt von PDGF auf VGMZ *in vitro* unumstritten ist, ist noch nicht abschließend geklärt ob PDGF auch diesen Effekt *in vivo* bei Atherosklerose oder dem Gefäßremodeling hat, obgleich es einige Hinweise darauf

gibt.^(10, 16) Ein weiterer, für den phänotypischen Switch wichtiger, Wachstumsfaktor ist der Insulin like Growth Factor-I (IGF-I). Interessant bei diesem ist die unterschiedliche Aktivierung der Signalkaskaden. So kann er im differenzierten Zustand nur eine Aktivierung der AKT Kaskade bewirken und führt dabei zur Stabilisierung dieses Zustandes. Ist der phänotypische Switch bereits vollzogen, kann auch die ERK und p38 MAPK Kaskade durch IGF-1 aktiviert werden. Dies resultiert in der Migration und Proliferation der Zellen und damit im Erhalt des dedifferenzierten Zustandes.⁽¹⁷⁾ Proinflammatorische Faktoren, wie der tumor necrosis factor (TNF) - α und einige Interleukine, können den phänotypischen Switch ebenfalls induzieren.⁽¹⁸⁻²¹⁾

Des Weiteren können einige Adipokine aus dem perivaskulären Fettgewebe, welches die Gefäße umschließt, das Wachstum der VGMZ fördern. Beispiele hierfür sind z.B. Visfatin, Leptin und Resistin.⁽²²⁾ Während für Visfatin ein proliferativer Effekt nachgewiesen wurde⁽²³⁾, induziert Leptin die VGMZ Proliferation, Migration und die Expression von MMP.⁽²⁴⁾ Resistin scheint ebenso die Proliferation, Migration und MMP-Expression in VGMZ zu induzieren.^(25, 26) Die darauffolgenden Mechanismen und Signalwege sind noch nicht abschließend erforscht. Ebenso deren Rolle in pathophysiologischen Situationen wie der Atherosklerose.

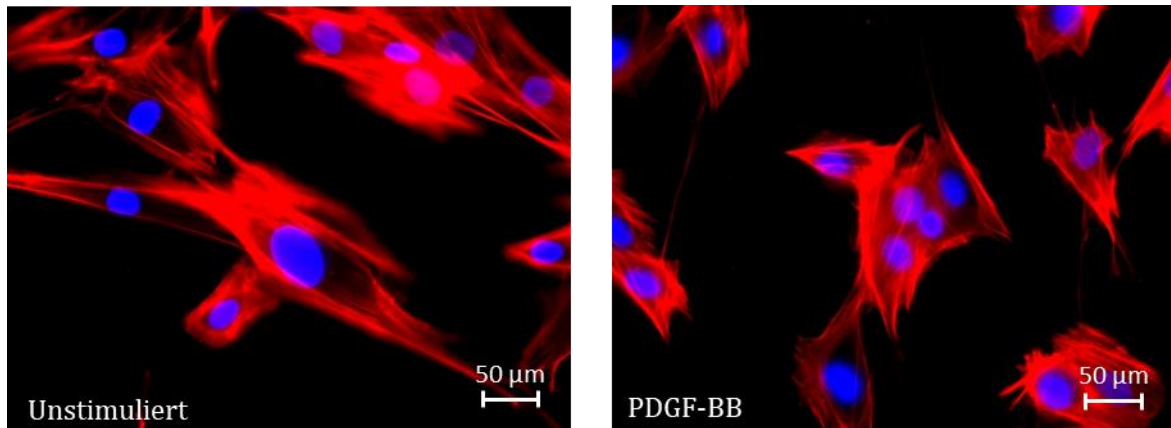


Abbildung 1.1.2

Abbildung 1.1.2 Differenzierte vs. dedifferenzierte VGMZ

Differenzierte VGMZ auf der linken Seite (unstimuliert) sind länglich und das Zytoskelett (SM-Aktin; hier rot gefärbt) zeigt sich als längere ausgezogene Stränge, die durch die Zelle verlaufen. Blau: Zellkernfärbung durch DAPI. Dedifferenzierte Zellen, wie hier im rechten Bild (nach PDGF-BB Stimulation (1h), wobei das BB die Bildung des PDGF aus zwei B-Ketten beschreibt) sichtbar, sind eher rundlich und die SM-Aktin stränge eher kürzer.

Quelle: Aufnahmen sind aus der zum Teil aus dieser Arbeit entstandenen Publikation (Heun et al., 2020) und wurden mit Bezeichnungen in deutscher Sprache versehen.⁽²⁷⁾

1.1.2.1 Migration und Proliferation der VGMZ

Der Begriff der Migration beschreibt die Bewegung einer Zelle in eine Richtung, die gerichtet oder ungerichtet sein kann. Hierbei bewegt sich die Zelle entlang der extrazellulären Matrix (EZM), einem Gebilde aus Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen als Grundsubstanz sowie Kollagen-, elastischen- und retikulären Fasern des Faseranteiles.⁽²⁸⁾ Dabei ist eine wichtige Aufgabe der EZM die Adhäsion der Zelle am Untergrund, wobei sie unterstützt wird von zellulären Integrinen. Dies sind Transmembranproteine, die zur Adhäsion zwischen Zellen und der extrazellulären Membran beitragen.⁽²⁹⁾ Bei *in vitro* Versuchen lässt sich die EZM durch eine dreidimensionale Kollagen-Matrix imitieren.⁽³⁰⁾ Der Auf-, Ab- und Umbau der Matrix geschieht durch Metalloproteasen (MMP), einer Gruppe verwandter Enzyme, die allesamt als Peptidasen fungieren. Ihre Hauptaufgabe ist es, Peptidbindungen zu spalten.⁽³¹⁾ Dabei

ist bekannt, dass die MMP-2 und -9 von VGMZ exprimiert werden und somit bei deren Migration eine entscheidende Rolle spielen, indem sie vor der Zelle zur Resorption der EZM führen, wodurch sie die Richtung der Zellwanderung mitbestimmen.⁽³²⁾ Daneben ist bekannt, dass MMP-2 und -9 in der Entstehung und Aufrechterhaltung von atherosklerotischen Plaques durch Förderung des VGMZ- Wachstums und der Zellmigration eine bedeutende Rolle spielen⁽³³⁾.

Die Migration an sich geschieht in amöboiden Bewegungen, also in einer Fortbewegung, bei der mindestens ein Teil der Zelle als Standbein an der EZM angeheftet ist, während der Rest der Zelle die Umgebung, im Sinne eines „Spielbeines“, abtastet und sich, sobald eine adäquate Stelle gefunden ist, an der EZM anheftet. Damit wird das Spielbein zum Standbein, der vormals fixierte Teil der Zelle kann sich vom Untergrund lösen und nachziehen. Diese Fortbewegung hat den enormen Vorteil der maximalen Beweglichkeit der Zelle, um auch durch kleine Engstellen zu passen. Dabei bewegen sich VGMZ am ehesten lamellipod fort.⁽³⁴⁾ Dies erfolgt mit eher flachen und breiten Zellausstülpungen, die sich auf einer breiteren Fläche am Boden festhalten. ⁽³⁵⁾

Eine wichtige Rolle spielt die Zellmigration der VGMZ bei der Neovaskularisation. Hierbei wandern primär Endothelzellen in das umliegende Gewebe. Im nächsten Schritt werden die VGMZ durch freigesetzte Wachstumsfaktoren wie PDGF rekrutiert und wandern ein. Nachdem sich die Muskelzellen um das Endothel formiert haben, entsteht mit der Anlagerung des Epithels ein neues, vollständiges Gefäß. Auch an der Angiogenese, die u.a. bei der Wundheilung eine Rolle spielt, nehmen VGMZ teil. Migrierende VGMZ spielen ebenfalls in der Revaskularisation nach dem Stenting der Koronararterien durch die Einwanderung in das wiedereröffnete Blutgefäß eine tragende Rolle. Dadurch unterstützen sie die Erholung des versorgten Gewebes wie auch des Gefäßes selbst.⁽³⁶⁾ Die Proliferation der VGMZ spielt eine ähnlich wichtige Rolle in der Gefäßbildung und Heilung wie die Migration, indem sich aus einzelnen Zellen ganze Verbände bilden können. Dieser Regenerationsmechanismus des Körpers kann jedoch z.B. in der oben genannten Situation nach dem Stenting auch ins Gegenteil umschlagen und zum erneuten Gefäßverschluss bei überschießender Proliferation führen.⁽³⁷⁾ Aus diesem Grund muss eine Steuerung beider Prozesse stattfinden. Induziert werden diese beiden Prozesse unter anderem durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie Platelet Derived Growth Factor (PDGF)⁽³⁸⁾, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Insulin like Growth Factor

(IGF)⁽³⁹⁾ und Fibroblast Growth Factor (FGF)⁽⁴⁰⁾. Wie bereits erwähnt ist eine Beteiligung von PDGF an der Initiierung der Migration und Proliferation bekannt⁽⁴¹⁾. Darüber hinaus hat sich im Laufe der Zeit VEGF als einer der effektivsten Aktivatoren der Migration herauskristallisiert.⁽⁴²⁾ Während diese Faktoren in der embryonalen Entwicklung sowie bei der Wundheilung beim erwachsenen Menschen eine Angiogenese induzieren, tragen sie ebenso im erwachsenen Menschen zur Bildung von Atherosklerose bei. Hierbei durchleben die glatten Gefäßmuskelzellen einen vermutlich durch PDGF-BB, wobei es sich bei der Aussage BB um eine Bildung eines Homodimers aus zwei B Strängen handelt, verursachten phänotypischen Switch^(10, 43) von der ruhenden, kontrahierenden Zelle zur primär synthetisierenden und mobilen Zelle.

Bei einer Inflammation des Gefäßsystems, welche einer Atherosklerose zugrunde liegt, spielen nach dem aktuellen Stand der Forschung auch Tumornekrosefaktor (TNF) - α und Interleukin (IL) -6 eine entscheidende Rolle.^(44, 45) Es steigt unter anderem die MMP-2-Produktion, welche die Zellmigration durch den Abbau der EZM begünstigt, an. Diese wird, wie andere MMP (1,3,9), durch ein vermehrtes NF- κ B Signal in der Zelle überproduziert, wodurch auch dieser Faktor zur Entstehung einer Atherosklerose beiträgt. Ähnliches gilt für die Adhäsionsmoleküle Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM) -1 und Intercellular Adhesion Molecule (ICAM) -1. Die zuvor genannte NF- κ B Aktivierung wird in diesem Fall durch die vermehrte LDL Aufnahme in die VGMZ ausgelöst. Diese Lipidaufnahme führt darüber hinaus zur vermehrten IL-1 β Ausschüttung, welche sich positiv auf die Kollagen I Produktion auswirkt.⁽⁹⁾ Dadurch bewirkt die vermehrte IL-1 β Ausschüttung in der inflammatorischen, im Gegensatz zur non-inflammatorischen Zelle, eine vermehrte Migration und Adhäsion via Integrin $\alpha_2\beta_1$.⁽⁴⁶⁾ Auch Kollagen⁽⁴⁷⁾ und Fibronectin⁽⁴⁸⁾ können VGMZ-Migration und Proliferation induzieren.

1.1.2.2 Signalkaskaden des phänotypischen Switches

Der phänotypische Switch der VGMZ wird intrazellulär durch Signalkaskaden gesteuert. Initiiert werden sie über G-Protein-gekoppelte Angiotensin-II Rezeptoren (z.B. Endothelin-1 Rezeptor)^(49, 50) oder Tyrosinkinase-gekoppelte (z.B. PDGF-R, IGF-R, FGF-R) Rezeptoren⁽¹⁵⁾ nach Bindung der Liganden. Durch Aktivierung von Signalproteinen, wie

G-Proteinen (z.B. GTPasen) und Kinasen (z.B. MAPK und PI3K), werden diese Signale weitergeleitet und induzieren Prozesse typisch für phänotypische Veränderungen wie Proliferation, Migration und Expression von MMP.^(51, 52)

Kleine GTPasen

Eine Klasse an Signalproteinen, die eine prominente Rolle in der Zellmigration, auch in VGMZ, haben, sind die sogenannten kleinen GTPasen.⁽¹²⁾ Sie gehören zur Gruppe der G-Proteine, welche durch die Bindung von Guanosin triphosphat (GTP) aktiviert werden. Die Hydrolyse zu GDP durch ihre GTPase-Aktivität, welche von GTPase aktivierenden Proteinen (GAP) aktiviert wird, inaktiviert sie. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*; GEF) beschleunigen den Austausch von GDP zu GTP an den GTPasen und sind dementsprechend essentiell für deren Aktivierung.⁽⁵³⁾ Für die VGMZ-Migration sind vor allem kleine GTPasen wie Ras, Rho GTPasen, Rac und Cdc 42 von Bedeutung.^(12, 54) Die Aktivierung der Rho GTPasen führt zur Bildung von Actin-Stressfasern und zu Fokalkontakten mit Integrinen, wodurch „Outside-In Signalling“ vom EZM zu intrazellulären Signalwegen ermöglicht wird. Hierdurch wird die gerichtete VGMZ-Migration bewerkstelligt.^(55, 56) Die Rho GTPasen spielen nicht nur unter anderem für PDGF mediierte VGMZ-Migration eine wichtige Rolle, sondern auch für die PDGF abhängige Proliferation, indem sie die Expression von Zellzyklusproteinen induzieren.⁽⁵⁷⁾ Die Rho GTPase Cdc 42 ist für die Aktinpolymerisierung wichtig, welche in der Bildung von Lamellipodien und Filopodien und damit für die Migration eine essenzielle Bedeutung einnimmt.^(56, 58) Ebenfalls zu den kleinen GTPasen gehört die RAS Familie. RAS Proteine wirken insbesondere auf die Alterung der VGMZ, die sie induzieren können, wodurch im Rahmen einer Inflammation auch eine Atherogenese induziert wird.⁽⁵⁹⁾ Ebenfalls sind die GTPasen durch eine Aktivierung des MAPK ERK Signalweges für die VGMZ-Migration wichtig.⁽⁶⁰⁾

Mitogen activated Proteinkinasen

Mitogen-activated Proteinkinasen (MAPK) sind Serin/Threoninkinasen, welche auf die Weiterleitung von extra- und intrazellulären Stimuli zum Zellkern spezialisiert sind.⁽⁶¹⁾ Sie sind in der Antwort auf z.B. oxidativen Stress, DNA-Schäden, Hyperosmose, Inflammation aber auch physiologische Stimuli, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, involviert.^(62, 63) In Tieren wirken sich die MAPK auf die Proliferation, und

Zelldifferenzierung aus. Sie können jedoch auch eine Apoptose und den Arrest des Zellzyklus bewirken.^(64, 65) MAPK können ligandenabhängig von verschiedenen Signalproteinen wie Ras, Proteinkinase C (PKC), Focal adhesion kinase (FAK) und Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) aktiviert werden.⁽⁶⁶⁾

Für die phänotypischen Veränderungen der VGMZ sind insbesondere die MAPK p38 und ERK1/2 von Bedeutung. Beide MAPK sind wichtig für die Migration und Proliferation von VGMZ.^(67, 68) Ebenso beeinflussen p38 MAPK und ERK1/2 MAPK die MMP-2 Expression in VGMZ.^(69, 70) Weiterhin konnte bereits nachgewiesen werden, dass p38 MAPK für die Veränderungen der VGMZ in atherosklerotischen Plaques (Proliferation, Migration, Hypertrophie und später die Apoptose) eine Rolle spielt.⁽⁷¹⁾ Die p38 MAPK wird insbesondere durch einen extrazellulären Stressor, wie UV-Licht, Hitze, hyperosmotische Konditionen und inflammatorische Zytokine, aktiviert.⁽⁷²⁾ Eine Signalweiterleitung durch die MAP3 Kinasen MEKK 1/4, und ASK (Apoptosis signal-regulating kinase) 1/2, führt zur Aktivierung der MAP2 Kinasen MKK 3/6 und MKK 4, die wiederum die Phosphorylierung und Aktivierung von p38 veranlassen. Dadurch kann eine Apoptose, eine Entzündungsantwort oder ein Arrest des Zellzyklus induziert werden.^(73, 74) Die ERK 1/2 MAPK wird nach Aktivierung der MAP3 Kinasen A/B/C-Raf und der nachgeschalteten MAP2 Kinasen MKK 1/2 phosphoryliert und kann daraufhin eine Proliferation und Zellteilung induzieren (wie in Abbildung 1.1.3 dargestellt).^(73, 75)

Die MAPK c-jun N-Terminale Kinase (JNK) ist auch wichtig in der Weiterleitung von Signalen, die zur VGMZ-Proliferation und -Migration führen.⁽⁷⁶⁾ Die MAP3 Kinasen MLK 1/2/3 können durch extrazelluläre Noxen aktiviert werden und wiederum die MAP2 Kinasen MKK7 und MKK4 aktivieren. Diese phosphorylieren daraufhin JNK, die durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Activator protein 1 (AP-1) ebenfalls eine Apoptose und Inflammation induzieren kann.^(73, 77)

Phosphoinositide 3-Kinase

Die Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) spielt eine tragende Rolle für die VGMZ-Migration und Proliferation.⁽⁷⁸⁾ Es ist gezeigt worden, dass PI3K diese Prozesse in VGMZ nach Aktivierung durch verschiedene Faktoren, wie die Wachstumsfaktoren PDGF⁽⁷⁹⁾ und IGF-1⁽⁸⁰⁾ sowie das Hormon Insulin⁽⁷⁸⁾, mediiert. Durch Phosphorylierung von phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate (PIP₂) zu phosphatidylinositol (3,4,5)-

trisphosphat (PIP₃) in der Membran reguliert PI3K die Translokation von Signalproteinen mit pleckstrin-homologie (PH) Domänen vom Zytosol an die Membran, wo diese durch Phosphorylierung anderer Kinasen aktiviert werden können.⁽⁸¹⁾ AKT (Proteinkinase B, PKB) ist einer der wichtigsten Targets von PI3K, die an PIP₃ bindet, anschließend durch Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphoryliert und aktiviert wird und somit das Signal weiterleiten kann.⁽⁸¹⁾ Durch anschließende Aktivierung von mTORC1 wird unter anderem eine vermehrte Proteinsynthese und das Zellüberleben induziert.^(82, 83) In VGMZ kommt es ebenfalls zur Steigerung der Migration und Proliferation.⁽⁸⁴⁾ PI3K kann aber mehrere Signalkaskaden aktivieren und somit die Migration und Proliferation der VGMZ durch mehrere Signalwege fördern. Zum Beispiel kann PI3K auch die Focal adhesion Kinase (FAK) und Rac aktivieren und somit zur Migration beitragen.⁽⁸⁵⁾ PI3K kann aber auch MAPK aktivieren.⁽⁸⁶⁾

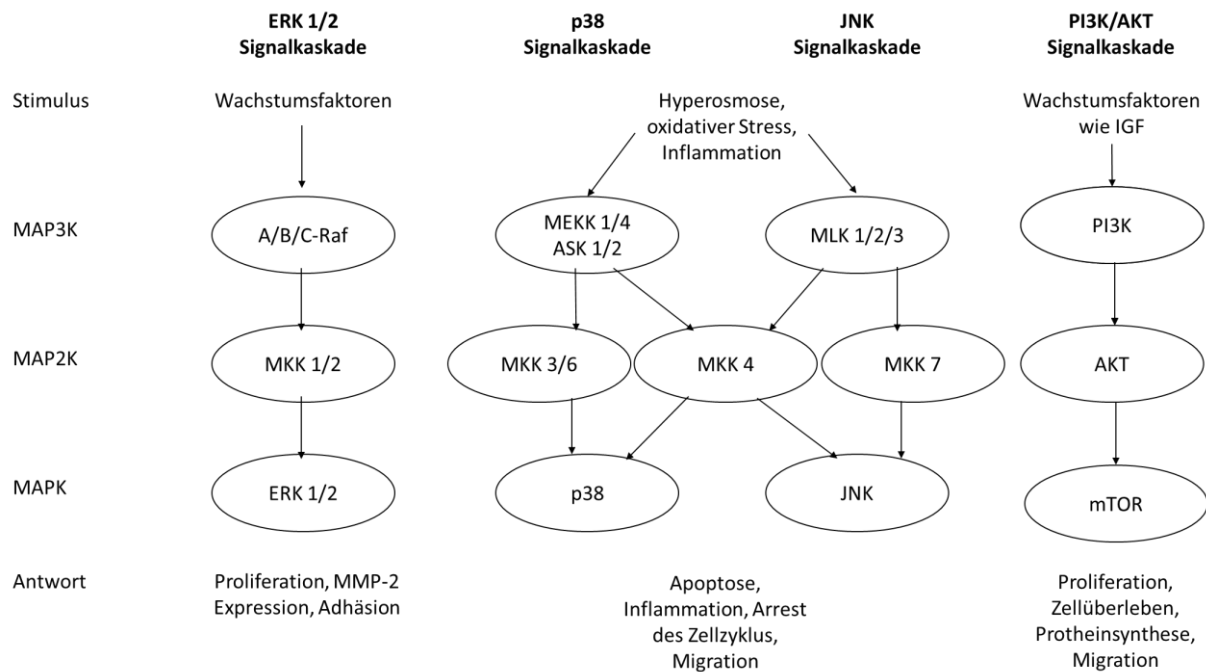


Abbildung 1.1.3

Abbildung 1.1.3: Wichtige vereinfachte Signalkaskaden für VGMZ-Proliferation und -Migration

Die verschiedenen MAPK Kaskaden bestehen aus jeweils drei aufeinanderfolgenden Kinasen (MAP3K, MAP2K und MAPK), die jeweils von der übergeordneten Kinase phosphoryliert und somit aktiviert wird. Auf der rechten Seite ist die PI3K/ AKT Kaskade dargestellt. Diese wird vor allem durch Wachstumsfaktoren aktiviert. PI3K aktiviert AKT, indem sie PIP_3 produziert, woran AKT durch ihre PH-Domäne binden kann. Dadurch kommt es in den VGMZ zur dargestellten Antwort der Proteinsynthese und des Zellüberlebens wie auch Migration.

Quelle: Eigene Erstellung mit neuer Aufteilung und Erweiterung um PI3K/AKT sowie einiger Stimuli und Antworten, angelehnt an Soares-Silva et al. (2016)⁽⁸⁷⁾

1.1.2.3 Der phänotypische Switch der VGMZ in der Atherosklerose

Laut WHO sind insbesondere in den Industriestaaten die höchsten Sterblichkeitsraten unter Erwachsenen bei den Erkrankungen des kardiozirkulatorischen Systems zu finden.⁽⁸⁸⁾ Dabei spielt die Atherosklerose eine entscheidende Rolle. Mit ihr hängen Krankheiten wie Hypertonie⁽⁸⁹⁾, Schlaganfall⁽⁹⁰⁾ und koronare Herzkrankheiten (KHK) als kardiale Manifestation der Gefäßverkalkung zusammen. Neben der Sterblichkeit spielt es

auch volkswirtschaftlich eine entscheidende Rolle durch die jährlich entstehenden Kosten für die Behandlung der KHK. So verursacht sie in Deutschland jährlich direkte Kosten von ca. 6,6 Mrd. € – mit steigender Tendenz.⁽⁹¹⁾

Die aktuelle Hypothese über die Entstehung einer Atherosklerose stützt sich auf viele verschiedene, teilweise gleichzeitig ablaufende Vorgänge, die sowohl Leukozyten, Thrombozyten als auch glatte Gefäßmuskelzellen involvieren. In jeder dieser ist jedoch die zentrale Rolle der VGMZ in der Tunica Media herausgehoben.⁽⁹⁾

Am Beispiel des Begriffs „response to injury“, erstmals von Ross et al. beschrieben⁽⁹²⁾, erkennt man die deutlich exponierte Stellung der Zellmigration der VGMZ im Zusammenhang mit der Atherosklerose. In diesem Vorschlag beginnt die Atherosklerose mit einer Läsion, ausgelöst durch Noxen, wie zum Beispiel Traumata, Bakterientoxine oder Bluthochdruck⁽⁹³⁾, in der Wand des Gefäßes. Insbesondere im Zusammenhang mit dem Blutdruck steht der „shear stress“⁽⁹⁴⁾, welcher unter anderem an Abzweigungen im Bereich des arteriellen Gefäßes durch Verwirbelungen des Blutes entstehen kann. Dabei werden diverse Mediatoren aus Endothelzellen, VGMZ oder Thrombozyten freigesetzt, wie zum Beispiel VEGF, PECAM, und Cadherine.⁽⁹⁵⁾ In den angesprochenen Bereichen des „shear stress“ kommt es aufgrund der freigesetzten Mediatoren zu einem verstärkten Remodelling. Dadurch wird das Lumen weiterhin eingeengt, was zum erneuten Anstieg des „shear stress“ führt. Im Rahmen eines phänotypischen Switchs induzieren die genannten Mediatoren die Proliferation und Migration der VGMZ.

Die Heilung der Läsion beginnt durch die Anlagerung von Thrombozyten. Dadurch wird unter anderem PDGF freigesetzt, was zur Proliferation⁽⁹⁶⁾ und Migration⁽³⁸⁾ der VGMZ führt. Diese Entzündungsreaktion in Kombination mit einem phänotypischen Switch wird zusätzlich unterstützt von in die Gefäße einwandernden Entzündungszellen, welche wiederum Zytokine freisetzen. Zu diesen Zytokinen gehören unter anderem TNF- α , verschiedene Interleukine und Adipokine (z.B. Leptin, Adiponektin).⁽⁹⁷⁾ Bei Krankheiten, wie einem Diabetes Mellitus Typ II (DM II) oder dem verwandten metabolischen Syndrom, kommt es zu einer Art chronischer Gefäßentzündung u.a. durch eine kontinuierliche Freisetzung der oben genannten Zytokinen und Adipokinen. Zum Beispiel wurden in Patienten mit DM II u.a. erhöhte Serumkonzentrationen von IL-12, Resistin und Leptin gemessen.⁽⁹⁸⁾ Dies wiederum begünstigt den phänotypischen Switch der VGMZ⁽¹¹⁾ hin zu der Proliferation und Migration.⁽⁹⁹⁾

Durch eine Läsion in der Endothelschicht können sich LDL nun ungehindert einlagern, die dann über Rezeptoren an VGMZ, wie auch an den entzündungsbedingt einwandernden Makrophagen, aufgenommen werden und die Lipoproteine ähnlich einem Schwamm aufsaugen. Dieser Vorgang verleiht ihnen den Namen „Foam cells“⁽¹⁰⁰⁾. Eine weitaus wichtigere Funktion der VGMZ in diesem Zusammenhang ist die Bildung einer Barriere um die Fettpolster, was zur sekundären Ausbildung einer fibrösen Kappe führt, die sich über diese Schaumzellen legt und die Elastizität des Gefäßes herabsetzt. Durch eine neuerliche Läsion in der zwischenzeitlich verschlossenen Intima kommt es zum sekundären Riss der Intima und einer Thrombusbildung. Erst ab diesem Zeitpunkt ist die Atherosklerose symptomatisch mit einer höhergradigen Volumeneinengung, dem Krankheitsbild einer Angina Pectoris oder einem Gefäßverschluss als mögliche Folge ^(92, 93).

Diese aus den 70er-Jahren stammende und regelmäßig auf den neuesten Stand der Forschung aktualisierte Theorie ist heute eine weitestgehend anerkannte Hypothese zur Atherosklerose⁽¹⁰¹⁾. Auch abseits dieser Hypothese spielt die Zellmigration eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Atherome, die als Vorläufer der Atherosklerose gesehen werden können.

Für die Entwicklung der Gefäßverkalkung (aus dem Griechischen Arteria = Ader, sklerós = Hart) gibt es mehrere Risikofaktoren. Einer der wichtigsten Risikofaktoren ist das Übergewicht gepaart mit fehlender Bewegung. Daraus resultiert meist ein Bluthochdruck, welcher ebenfalls als Risikofaktor für eine Atherosklerose gilt.⁽¹⁰²⁾ Ebenfalls wird Übergewicht mit einer Hypercholesterinämie, insbesondere mit LDL-Cholesterinen in Verbindung gebracht. Gleiches gilt für einen DM Typ II. Jedoch sind nicht nur die Lebensumstände, Angewohnheiten (z.B. Rauchen) und Übergewicht für die Entstehung dieser Geißel der modernen Menschheit ausschlaggebend. Die Abstammung ist ein weiterer wichtiger Faktor, da Herz- und Gefäßkrankungen vererbt werden können.⁽¹⁰³⁾

Nun gibt es aktuelle Ansätze, das Fortschreiten der Atherosklerose zu hemmen. Aufgrund der wichtigen Bedeutung des Cholesterins wurden die Statine als Cholesterinsenker etabliert.⁽⁹⁰⁾ Durch den geringeren Einbau von Cholesterin in die Zellwände der VGMZ konnte die Progression der Gefäßverkalkung nachweislich verlangsamt werden. Jedoch weist dies unter anderem das Risiko der Myalgie und der Myolyse auf ⁽¹⁰⁴⁾. Darüber hinaus

gibt es Hinweise auf eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels, was zu Problemen bei Diabetikern führen kann.

Andere Ansätze propagieren den Einsatz gezielter medikamentöser Therapie. Dies unter anderem mit Tocilizumab, einem Antikörper, welcher bisher nur zur Therapie rheumatoider Erkrankungen zugelassen ist, der gezielt den IL-6 Rezeptor hemmt und bereits in Studien, im Fall der Atherosklerose in VGMZ, erste Erfolge zeigt.⁽¹⁰⁵⁾ Dadurch wird die Immunreaktion reduziert, welches das Fortschreiten der Atherosklerose verhindert.⁽⁴⁵⁾ Mehrere potenzielle Targets werden aktuell erforscht. Mögliche Ansätze sind Antikörper gegen proinflammatorische Zytokine wie IL-1 (Anakinra)⁽¹⁰⁶⁾, IL-12 und TNF- α (Etanercept, Adalimumab, Infliximab)^(107, 108), Antagonisten für Rezeptoren, wie z.B. für TLR-4, oder Adhäsionsmoleküle, wie P-Selectin⁽¹⁰⁹⁾, sowie Inhibitoren für intrazelluläre Signalmoleküle, wie p38 MAPK (SB-681323)⁽¹¹⁰⁾ oder ROCK-2 (SLx2119)⁽¹¹¹⁾.

Kam es bereits zu einem Gefäßverschluss, hat sich in den letzten Jahren immer mehr die Katheterisierung mit koronarangiographischer Intervention durch eine Aufdehnung und der Einlage eines runden Drahtgeflechtes, ein sogenannter Stent, zum Offenhalten des Gefäßes etabliert.⁽¹¹²⁾ Diese werden im Anschluss an das Stenting revaskularisiert, was unter anderem durch das Einwandern von VGMZ und die anschließende Proliferation geschieht. Der wichtigste Faktor zur Steuerung dieses Prozesses ist PDGF.⁽¹¹³⁾ Dies führte in der Anfangszeit der Stenteinlage zu einer raschen Restenose aufgrund einer überschießenden Proliferation der VGMZ.⁽¹¹⁴⁾ Nachdem dies erkannt wurde, kam es zur Erfindung der Drug eluting Stents (DES). Dabei handelt es sich um Stents, welche mit einer Medikamentenschicht überzogen sind. Aktuell setzen diese Chemotherapeutika wie Paclitaxel⁽¹¹⁵⁾ und Immunsuppressiva wie Everolimus, welche intrazelluläre Proteine bzw. Signalmoleküle hemmen, frei.⁽¹¹⁵⁾ Dadurch wird insbesondere die Zellteilung der VGMZ verlangsamt und der frühzeitige Verschluss der Gefäße verhindert.

Um weitere potenzielle Zielmoleküle für eine zukünftige Therapie oder Prävention der Atherosklerose zu identifizieren, ist es wichtig, diesen Prozess weiter aufzuklären und die essenziellen Signalwege und Signalproteine in den beteiligten Zellen zu untersuchen.

1.2 Das proinflammatorische Hormon Resistin

Resistin ist ein Hormon, welches zur Familie der resistin-like molecules (RLM) gehört.⁽¹¹⁶⁾ Der Name setzt sich aus den Worten „Resistance“ und „Insulin“ zusammen, genannt nach der Entdeckung, dass Resistin die Funktion von Insulin hemmt⁽¹¹⁷⁾. Sein Vorkommen wurde erstmals in Mäusen nachgewiesen, wo es von Adipozyten im Fettgewebe produziert und sezerniert wird und die Wirkung von Insulin hemmt.⁽¹¹⁷⁾ In Menschen wird Resistin hauptsächlich von Leukozyten, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und Makrophagen exprimiert und freigesetzt.⁽¹¹⁸⁾ Es existiert als 12,5 kDa schweres Protein, das im Blut aber als Oligomer vorhanden ist.⁽¹¹⁹⁻¹²¹⁾ Ein spezifischer Resistin-Rezeptor ist noch nicht identifiziert worden, aber mehrere Studien zeigen, dass Resistin an vier verschiedene Rezeptoren bindet: Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4), adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP1), receptor tyrosine-kinase like orphan receptor 1 (ROR1) und eine Isoform des Proteoglycans Decorin.⁽¹²²⁾ Die Resistin-Rezeptorkombination scheint zell- oder gewebespezifisch zu sein. In Menschen spielen vermutlich nur TLR-4 und CAP1 eine Rolle als Resistin-Rezeptoren.⁽¹²²⁾ Durch Bindung an TLR-4 oder CAP1 induziert Resistin die Transkription von inflammatorischen Zytokinen.^(123, 124) Hierbei konnte gezeigt werden, dass Resistin dies durch Aktivierung von den MAPK ERK1/2 und p38 sowie der Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt. Diese Befunde ließen auf eine Rolle von Resistin in inflammatorischen Bedingungen schließen. Mittlerweile ist die Beteiligung von Resistin an mehreren pathophysiologischen Prozessen, wie Insulinresistenz, DM II, und kardiovaskulären Krankheiten (Atherosklerose, Hypertension, Thrombose und endotheliale Dysfunktion) belegt.^(118, 125) Darüber hinaus scheint ein deutlicher Zusammenhang zwischen Resistin und einerseits dem Zuckerstoffwechsel sowie andererseits der zentralen Rolle bei der Inflammationsreaktion zu bestehen, was individuell und in Kombination zur Atherosklerose führen kann, deren Koexistenz und gegenseitige Bedingung mittlerweile als erwiesen gilt.⁽¹²⁶⁾

1.2.1 Resistin und Insulinresistenz, Diabetes Mellitus und metabolisches Syndrom

Bei einem metabolischen Syndrom, welches mit einem DM II einhergeht, spielt insbesondere eine erhöhte Proliferationsrate glatter Gefäßmuskelzellen durch die Aktivitätssteigerung der p38 MAPK eine Rolle (Abbildung 1.2.1).

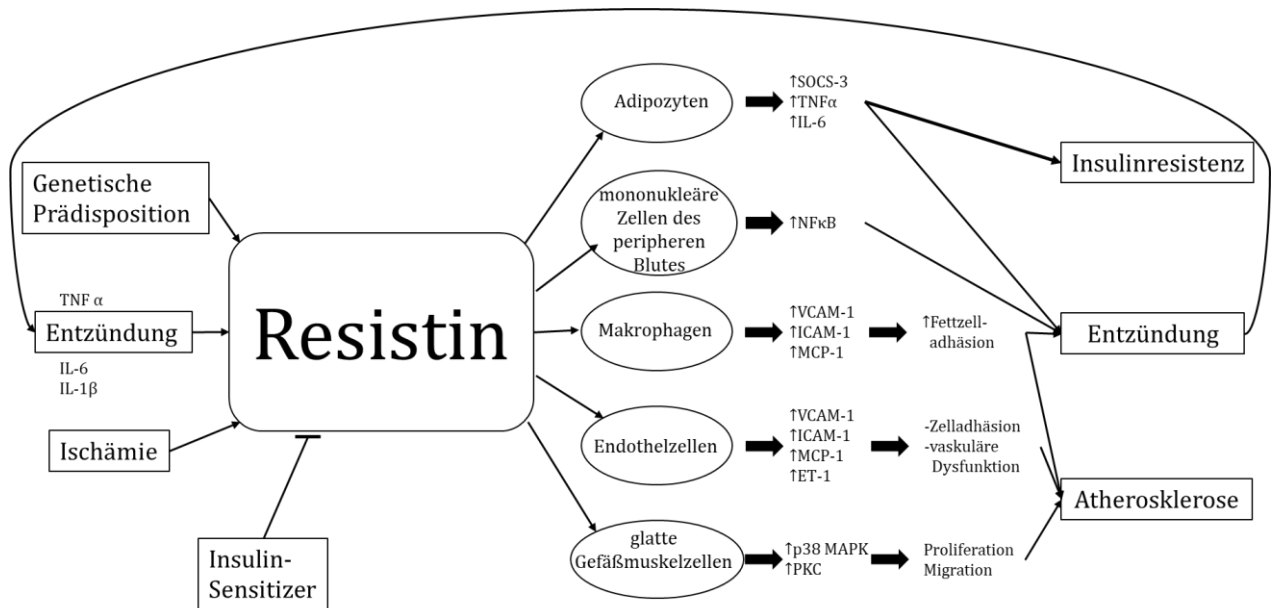


Abbildung 1.2.1

Abbildung 1.2.1: Die Rolle des Resistin im Circulus Vitiosus

Einfluss und Wirkung von Resistin auf verschiedene pathologische Vorgänge im Körper. Hierbei ist explizit auf den bereits bekannten Einfluss auf die Atherosklerose, welche durch die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen gefördert wird, hinzuweisen. Insbesondere im Bereich der Entzündungsreaktion scheint einen positiven Feedbackmechanismus zu bestehen, der diesen Prozess verstärkt.

Quelle: Eigene Erstellung mit neuer Aufteilung und Erweiterung angelehnt an Schwartz et al. (2011)⁽¹²⁷⁾

Eine der verheerendsten, einer Epidemie gleichenden Krankheiten dieser Zeit ist der DM, welcher in zwei Typen vorkommt. Einerseits besteht der Typ I, welcher insbesondere junge Menschen betrifft. Hierbei handelt es sich um eine Autoimmunreaktion auf die

insulinproduzierenden β -Zellen. Der Typ II hingegen betrifft meist ältere, übergewichtige Menschen, die eine Resistenz gegenüber dem zur Verfügung stehenden Insulin entwickeln. Beim DM Typ II ist eine schleichende Resistenzbildung gegen Insulin der Grund für den Beginn der Krankheit. Zumeist sind Patienten mit einem DM Typ II übergewichtig. Ungünstig dabei ist, dass Insulin gleichzeitig eine adipogene (fettaufbauende) Wirkung hat. Da es aufgrund der Resistenz vermehrt durch den Blutkreislauf zirkuliert, entsteht dadurch ein *circulus vitiosus*, indem immer mehr Fett angesetzt wird, was wiederum zur höheren Insulinresistenz führt.⁽¹²⁸⁾

Im Jahr seiner Entdeckung (2001) entwickelte sich eine kontroverse Diskussion um einen möglichen Zusammenhang von Resistin und der Insulinresistenz⁽¹¹⁷⁾. Wobei auch gleichzeitig eine fehlende Verbindung zwischen Beidem behauptet wurde.⁽¹²⁹⁾ Mittlerweile scheint dieser Zusammenhang jedoch bestätigt zu sein.⁽¹²⁷⁾ So wurde initial eine Erhöhung der Konzentration von Resistin in fettleibigen Mäusen gefunden. In einem weiteren Versuch wurde Mäusen rekombinantes Resistin verabreicht, woraufhin eine Glucosetoleranz einsetzte und die Wirkung des Insulins nachließ.⁽¹¹⁷⁾ Im Mensch wurde eine deutlich erhöhte Resistinkonzentration bei adipösen Personen gefunden. Hierbei wurde ein Zusammenhang zur Insulinresistenz vermutet, welcher bereits im Tiermodell beobachtet wurde.⁽¹¹⁹⁾

Der DM Typ II führt in der Folge nicht selten und bei fehlender Therapie zum metabolischen Syndrom. Dieses sogenannte tödliche Quartett, bestehend aus abdomineller Fettleibigkeit, Hypertonus, Hypertriglyzeridämie und DM Typ II, wird als eines der größten Risiken angesehen, eine Atherosklerose zu entwickeln und ist mit einer erhöhten Mortalität bei sonstigen Erkrankungen assoziiert.⁽¹³⁰⁾ Therapien sind bisher nur in Form der Behandlung der einzelnen Symptome möglich. Es gibt Hinweise, dass Resistin und andere Adipokine eine Rolle in der Entstehung des metabolischen Syndroms spielen.⁽¹³¹⁻¹³³⁾ So kommt es durch einen größeren Anteil an viszeralem Fett zu einer erhöhten Produktion an Adipokinen wie Leptin, Adiponektin und Resistin, die zu einer Entzündungsreaktion führen.^(134, 135) Durch diese kann es zu einer Dyslipidämie, einer Insulinresistenz und zuletzt auch zur Ausbildung einer Atherosklerose kommen. Insbesondere durch die ersten beiden kann es zu mehr viszeralem Fett und dadurch zur erneut höheren Produktion der Adipokine kommen, wodurch der Entzündungsprozess verstärkt wird.⁽¹³⁶⁾ Allerdings gibt es ebenfalls Studien, welche einen direkten

Zusammenhang in Zweifel ziehen, da unter anderem die Datenlage zu gering oder nicht umfassend genug sei, um einen einwandfreien Zusammenhang zwischen Resistin und dem metabolischen Syndrom zu erkennen.⁽¹³⁷⁾

1.2.2 Resistin und Inflammation

Da beobachtet werden konnte, dass Resistin eine Hochregulation von NF- κ B bewirkt, wodurch es zur vermehrten Ausschüttung von TNF- α , IL-6 und IL-12 kommt, wurde eine Verbindung zu inflammatorischen Prozessen hergestellt.⁽¹³⁸⁾ Ebenfalls wurde entdeckt, dass Resistin die „intercellular adhesion molecule“ ICAM und die „vascular cell adhesion molecule“ VCAM als Mediatoren für Entzündungsreaktionen durch Resistin hochreguliert. Beschrieben ist dies bisher jedoch nur für Endothelzellen.⁽¹³⁹⁾

Zum Tragen kommt diese Erkenntnis auch, weil Resistin selbst durch proinflammatorische Zytokine verstärkt exprimiert wird (siehe auch Abbildung 1.2.1.1.). Dies führt erneut zur Rückkopplung und damit zur Verstärkung der Inflammationsreaktion. Darüber hinaus führen auch Lipopolysaccharide in diesem Zusammenhang zur Entzündungsreaktion, womit auch hier ein Querverweis zur Atherosklerose möglich ist.⁽¹²⁵⁾

Eine der tödlichsten Entzündungsreaktionen ist die Sepsis,⁽¹⁴⁰⁾ in Laiensprache die Blutvergiftung, hervorgerufen z.B. durch im Blut zirkulierende Bakterien. Aufgrund der oben dargestellten Erkenntnisse über Resistin besteht hier ein weiteres interessantes Untersuchungsfeld. Dabei fiel auf, dass Resistin scheinbar selektiv in Neutrophilen die Fähigkeit, Bakterien zu töten, deutlich senkt, während Makrophagen und Monozyten diese weiterhin behalten. In Neutrophilen kann Resistin den „oxygen burst“ unterdrücken, womit diese am aktivsten gegen Bakterien vorgehen können.⁽¹⁴¹⁾

So scheint es nur logisch zu sein, Resistin als prognostischen Faktor in der Sepsisdiagnostik und der Erhebung der Überlebensraten einzusetzen. Nach ersten Studien konnte gezeigt werden, dass Resistin-Konzentrationen im Blut in der präseptischen Phase stärker ansteigen und nach dem Beginn der septischen Phase wieder abfallen.⁽¹⁴²⁾ Ebenso wird Resistin in Verbindung mit der Sepsisdiagnostik in der Neonatalen- und Kindermedizin getestet. Auch hier wurden ähnliche Erkenntnisse gewonnen.^(143, 144)

1.2.3 Resistin und seine Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen

In einer im Jahr 2017 veröffentlichten Studie, in Form einer Metaanalyse anhand von 14 Fall-Kontroll-Studien mit insgesamt fast 1400 Probanden, konnte eine positive Korrelation zwischen einer Hypertonie und erhöhten Resistin-Konzentrationen festgestellt werden.⁽¹⁴⁵⁾ Der Pathomechanismus hierbei bezieht sich, zumindest im Mausmodell, auf eine Regulationsänderung des TLR-4-Signalwegs über die Hochregulation von Angiotensinogen.⁽¹⁴⁶⁾

Im Rahmen eines Herzinfarktes ist in der westlichen Welt ein Herzkatheter, bei gegebener Indikation, die Therapie der Wahl. Kann das Gefäß wiedereröffnet werden kommt es zur Reperfusion, welche eine hohe Belastung für das Herz darstellt. Hier konnte jedoch eine protektive Wirkung des Resistin festgestellt werden. Diese Protektion führt hier zur Apoptosehemmung und dadurch zu einer Reduktion der Penumbra. Hierfür entdeckten Gao et al. in ihrer Publikation aus dem Jahr 2007 den PI3K Signalweg mit AKT und die Proteinkinase C (PKC) als wichtige resistin-getriggerte Faktoren. Diese wiederum führen zur Aktivierung der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle.⁽¹⁴⁷⁾ Diese Kanäle sind in der aktuellen Herzinfarktforschung ein wichtiger Faktor für die Protektion der Myozyten nach einer Ischämie und insbesondere nach der Reperfusion.⁽¹⁴⁸⁾

Resistin aktiviert Gefäßendothelzellen, indem die Produktion und Freisetzung von IL-6 und $TNF\alpha$ sowie die Hochregulation von Endothelin-1 induziert wird, welche eine Entzündungsreaktion im Gefäß fördern.^(149, 150) Ebenfalls wurde durch Resistin in Endothelzellen eine erhöhte Permeabilität durch eine Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges entdeckt. Ebenso wurde eine Reduktion der junctionalen Proteine der Endothelzellen gefunden, wodurch das Endothel durchlässiger wurde. Diese Veränderungen tragen zur Situation der Gefäßentzündung bei und spielen daher auch eine Rolle in der Entstehung von Gefäßkrankheiten wie der Atherosklerose.⁽¹⁵¹⁾

Resistin beeinflusst auch Prozesse in VGMZ. Auf diese wirkt Resistin proliferationssteigernd, indem sie die PI3K/AKT und ERK1/2-Signalwege aktiviert. Dies wurde mit VGMZ und einer ansteigenden Resistindosis untersucht.⁽²⁵⁾ Ebenfalls scheint Resistin in der homocysteinvermittelten Migration eine Rolle als Botenstoff einzunehmen, da es eine Steigerung der Expression von Resistin bewirkt, welche über den Rac-1-Signalweg, ebenfalls ein kleines G-Protein, abläuft.⁽¹⁵²⁾ Es konnte des Weiteren

gezeigt werden, dass Resistin die Dedifferenzierung und Migration der VGMZ, sowie die Ausschüttung von Zytokinen über die Proteinkinase C bewirkt. Dies wurde auf eine Erhöhung der intrazellulären ROS Produktion zurückgeführt.⁽¹⁵³⁾

Der genaue Mechanismus wie Resistin die Migration in VGMZ induziert ist bisher nicht bekannt⁽²⁶⁾. Ein Zusammenhang mit Matrixmetalloproteasen wurde aber beschrieben. So konnten Ding et al., indem sie VGMZ mit Resistin in pathologischer (40 ng/ml) Dosierung für 24 h stimulierten, eine erhöhte Migration sowie erhöhte MMP-2 und MMP-9 Expression messen.⁽²⁶⁾ Der genaue Ablauf dieser Signalkaskade konnte bisher aber nicht geklärt werden. Darüber hinaus ist es noch nicht bekannt, ob es einen Zusammenhang zwischen der VGMZ Adhäsion und Resistin besteht.

1.3 Der Guaninnukleotid Austauschfaktor ARNO

Cytohesine sind kleine Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF), die eine essenzielle Rolle für die Aktivierung von GTPasen aus der Familie der Adenosin-diphosphat-ribosylierungsfaktoren (ARFs) spielen⁽¹⁵⁴⁾. Da GDP eine deutlich stärkere Bindung zu GTPasen besitzt, sorgt der GEF für die Auflösung dieser Verbindung, um ein neues GTP-Molekül andocken zu lassen⁽¹⁵⁵⁾.

Beim Menschen gibt es vier verschiedene Cytohesine: Cytohesin-1, Cytohesin-2 (ARNO), Cytohesin-3 (Grp1) und Cytohesin-4. Sie sind alle ähnlich aufgebaut, obwohl die Genlokalisierung auf verschiedenen Chromosomen vorkommt, und beinhalten eine N-Terminale coiled-coil (cc) Domäne, die die Interaktion mit anderen Proteinen mit cc-Domänen steuert. Mittig haben sie eine Sec7 Domäne, welche zur Guaninnukleotiden Austauschaktivität beiträgt. Am C-Terminalen Ende ist eine Pleckstrin-Homologie (PH) Domäne vorhanden, die mit Phospholipiden interagiert und aus diesem Grund für ihre Bindung an der Zellmembran zuständig ist. Zuerst entdeckt wurde sie im Jahr 1996, wo sie bei Überexpression zu einer Aktivierung von β 2-Integrin medierter Adhäsion führten.⁽¹⁵⁶⁾

Das Vorkommen der Cytohesine scheint ubiquitär, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung. So wird Cytohesin 1 zum Beispiel verstärkt in NK-Zellen und T-Zellen exprimiert, was ihm zu einer zentralen Rolle in der Immunabwehr verhilft.⁽¹⁵⁷⁾

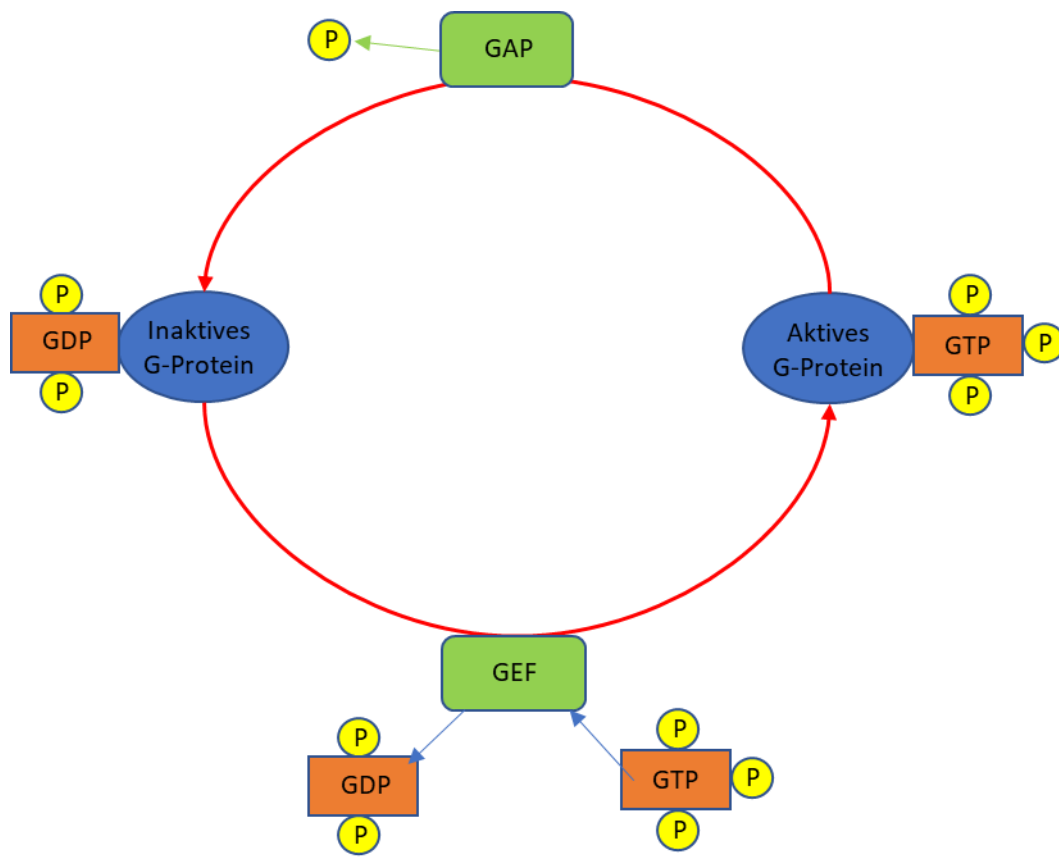


Abbildung 1.3.1

Abbildung 1.3.1: Funktionskreis des GEF

GEFs tauschen bei GTPasen GDP gegen GTP aus (im unteren Teil der Abbildung dargestellt). Dadurch wird aus einem inaktiven G-Protein ein aktives. Zur Inaktivierung wird hierfür nun ein GAP benötigt, welches GTP zu GDP hydrolysiert.

Quelle. Eigene Erstellung und Erweiterung, angelehnt an Stanley et al. (2016)⁽¹⁵⁸⁾

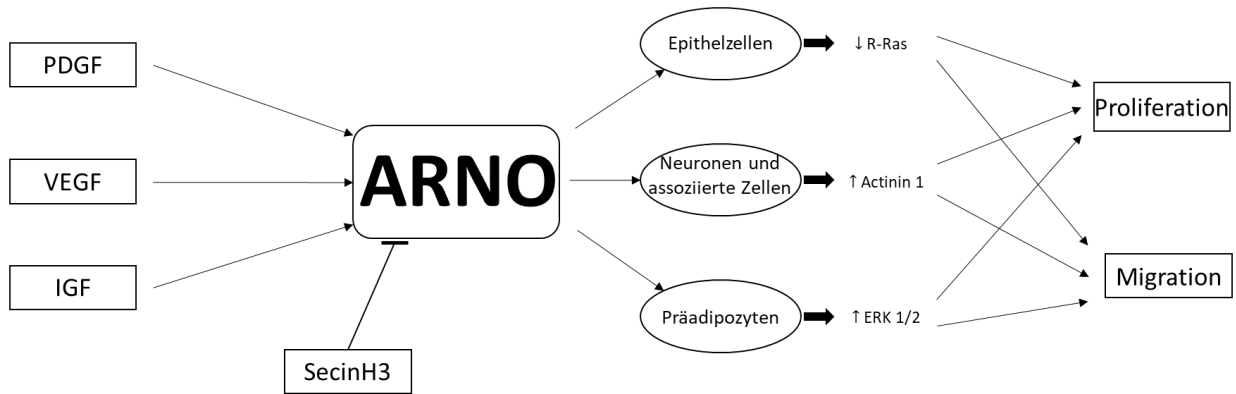


Abbildung 1.3.2

Abbildung 1.3.2: ARNO und seine Rolle in der Migration und Proliferation

Nachgewiesener Einfluss von ARNO in der Proliferation und Migration von verschiedenen Zelltypen unter Einfluss von PDGF, VEGF und IGF. Pharmakologisch kann ARNO durch den Stoff SecinH3 gehemmt werden.

Quelle: eigene Abbildung

ARF nucleotide binding site opener (ARNO) oder Cytohesin-2 kann durch seine PH-Domäne an das von PI3K generierte Lipid Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat (PIP₃) binden und wird somit an der Zellmembran rekrutiert^(159,160). Durch die weit verbreiteten coiled-coil Domänen (cc) kann ARNO auch mit anderen Proteinen mit cc-Domänen interagieren. So sind cc-Domänen unter anderem in Myosinfilamenten vorhanden, welche einen Vesikeltransport ermöglichen. Ebenso sind sie in Intermediärfilamenten, die einen wichtigen Teil zur Bildung des Zytoskelettes beitragen, vorhanden. Dies führt dazu, dass ARNO sowohl durch die Zelle transportiert werden als auch an einem fest definierten Ort vorkommen kann.⁽¹⁶¹⁾

Die Steuerung der Aktivität von ARNO ist multifaktoriell. So bewirkt zum Beispiel die Phosphorylierung an der positiv geladenen Aminosäurekette des Carboxy-terminus die Loslösung von der Zellmembran, am ehesten aufgrund der Neutralisation der Ladung. Damit scheint phosphoryliertes ARNO nicht membranständig zu sein. Für die Rekrutierung von ARNO sind die ARF-ähnliche Proteine (ARF like Proteins) Arl4, Arl4c und Arl4d zuständig, indem sie die PH-Domäne mit der Zellmembran verbinden. Des

Weiteren wurde herausgefunden, dass aktiviertes ARF6 ebenfalls eine Bindung von ARNO an die Zellmembran bewirkt.⁽¹⁶²⁾

Obwohl ARNO ubiquitär vorkommt, gibt es jedoch Hinweise auf spezifische Funktionen in einzelnen Zellen⁽¹⁶²⁾. In manchen Zellen wirkt ARNO auf den Adenosyl Riboxylierungs Faktor 6 (ARF6), in anderen auch auf ARF1 oder beide.^(163, 164) Dadurch sind sie ein wichtiger Bestandteil im Transport zwischen dem Endoplasmatischen Reticulum und dem Cis-Golgi-Apparat.⁽¹⁶⁵⁾

Darüber hinaus ist über ARNO bekannt, dass es am Integrin-Signaling, dem Vesikeltransport und dem Remodelling des Aktin-Zytoskelettes beteiligt ist. Das Remodelling wird dabei durch die Aktivierung von MMP ermöglicht.^(166, 167) Für den Vesikeltransport scheint insbesondere die Sec-7 Domäne durch die Bindung an den Integrin Beta 2-Ketten einen wichtigen Beitrag zu leisten.⁽¹⁶⁸⁾ Damit liegt eine Beteiligung an der Zellmotilität aller Zellen ebenfalls nahe.⁽¹⁶⁴⁾

In Gefäßendothelzellen zum Beispiel führt ARNO zu einer Proliferationssteigerung unter VEGF-Einfluss⁽¹⁶⁹⁾. Insbesondere in Nervenzellen im peripheren Nervensystem (PNS) ist eine Schlüsselrolle in der Myelinisierung nachgewiesen, wo es in der postnatalen Phase zur Ausbildung der Schwann-Zellen benötigt wird.⁽¹⁷⁰⁾ Jedoch scheint ihm ebenfalls eine Rolle in der Entstehung der familiären amyotrophen Lateralsklerose (ALS) über die Komplexbildung mit der Superoxid-Dismutase 1 (SOD1) zuzukommen.⁽¹⁷¹⁾ Ein weiterer beschriebener Effekt von ARNO ist die Unterbindung der Sekretion sogenannter „dense granula“ in Thrombozyten, welche für die Thrombozytenaggregation essenziell sind. Indem ARNO ARF-6 in einem GTP-gebundenen Zustand behält, wird die Sekretion der Granula eingeschränkt. Durch eine PKC medierte Phosphorylierung von ARNO wird der inhibitorische Effekt aufgehoben.⁽¹⁷²⁾

Die oben genannten Beispiele sind nur einige für die zentrale Rolle, die ARNO in unserem Körper bei physiologischen wie auch pathologischen Vorgängen einnimmt. So ist einerseits beschrieben, dass ARNO eine Phosphorylierung von ERK1/2 MAPK bewirkt, was zur Zellmigration und -Proliferation anregt. Andererseits jedoch konnte eine Beteiligung an der Apoptose und Inflammation der JNK/p38 MAPK-Signalkaskade herausgearbeitet werden.⁽¹⁷³⁾ Ebenso spielt ARNO eine wichtige Rolle in den Insulinrezeptor vermittelten PI3K- und AKT-Kaskaden. Diese hat Einfluss auf das

Zellwachstum aber insbesondere auch auf eine Insulinsensitivität sowie den Glucosemetabolismus.⁽¹⁶²⁾ Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass mit dem Cytohesinhemmer SecinH3 behandelte Mäuse höhere Glucosekonzentrationen und deutlich erhöhte Insulinwerte aufwiesen als die Kontrollgruppe.⁽¹⁷⁴⁾ Dieser Zustand ist auch beim DM II vorhanden. Die Arbeit von Hafner et. al. aus dem Jahr 2006 zog daher in Betracht, dass eine Insulinresistenz im Zusammenhang mit Cytohesinen und besonders mit ARNO steht, da eine Inhibition von ARNO die insulinvermittelte Hemmung der Transkription des Insulin like growth factor binding-proteins (IGFBP)- aufhob. Ferner wurde der Zusammenhang von Cytohesinen zum AKT Signalweg erkannt, indem eine Hemmung der Phosphorylierung von Insulin receptor substrate (IRS) und AKT durch SecinH3 und ARNO siRNA beobachtet wurde.⁽¹⁷⁵⁾

Zuletzt konnte darüber hinaus in einigen Arbeiten die Beteiligung von ARNO an Entzündungsprozessen nachgewiesen werden. Die Untersuchungen bezogen sich ausschließlich auf gefäßbezogene Entzündungen. Dabei wurden im vaskulären Endothel Destabilisierungen der interzellulären Verbindungen festgestellt. Dies lässt einen Zusammenhang zur Entstehung einer Atherosklerose zu.^(176, 177) Ebenso wurde eine Verbindung von IL-1 β zu ARNO festgestellt. Obwohl der Zusammenhang initial für Schleimhäute beschrieben wurde, ist dieser Zusammenhang zwischen einer Inflammationsreaktion und ARNO mittlerweile bewiesen.⁽¹⁷⁸⁾ Die im Zusammenhang mit der Entzündungsreaktion in Erscheinung getretenen Effekte sind dabei die gesteigerte Proliferation und Migration.^(177, 179)

1.4 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Effekt einer Hemmung bzw. Inaktivierung des GEF ARNO auf den phänotypischen Switch der VGMZ unter pathologischen Konzentrationen des proinflammatorischen Adipokins Resistin, das u.a. bei DM II und metabolischem Syndrom erhöht ist, zu untersuchen. Weiterhin soll der Einfluss von ARNO auf Signalwege in VGMZ unter Resistin-Stimulation untersucht werden. Für die Studie sollen ARNO Proteine (Wildtyp, inaktives ARNO oder ARNO ohne seine PH-Domäne) in VGMZ überexprimiert werden. Zusätzlich soll der pharmakologische Cytohesin-Inhibitor SecinH3 eingesetzt werden. Folgende wissenschaftliche Fragestellungen sollen dabei untersucht werden:

- Beeinflusst pathologische Konzentrationen von Resistin die Proliferation, Migration und Adhäsion von VGMZ?
- Beeinflusst ARNO die resistinabhängige VGMZ Adhäsion?
- Beeinflusst ARNO die resistinvermittelte VGMZ-Migration?
- Beeinflusst ARNO die Expression von Proteasen (MMP-2), die für Migration und Gewebsinvasion benötigt werden?
- Über welche Signalwege beeinflusst Resistin die VGMZ-Migration und MMP-2 Expression?
- In welchen resistinabhängigen Signalwegen, die VGMZ-Migration und MMP-2 Expression induzieren, ist ARNO beteiligt?

Durch die Untersuchung dieser Punkte erhoffen wir uns ein tieferes Verständnis der Art und Weise, wie proinflammatorische Adipokine den phänotypischen Switch der VGMZ beeinflussen und zum erhöhten kardiovaskulären Krankheitsrisiko bei z.B. Diabetikern und Patienten mit metabolischem Syndrom beitragen, zu erlangen. Die Erkenntnisse aus dieser Studie könnten helfen, in diesem Zusammenhang potenzielle therapeutische Ziele zu identifizieren.

2. Methoden und verwendetes Material

2.1 Chemikalien & Kits

| <u>Produkt</u> | <u>Hersteller</u> | <u>Produktionsort und -land</u> |
|---|-----------------------|---------------------------------|
| Agarose | Applichem | Darmstadt, Deutschland |
| Ammonium Persulfat | Applichem | Darmstadt, Deutschland |
| Pierce® BCA Protein Assay | Serva Electrophoresis | Heidelberg, Deutschland |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich | Steinheim, Deutschland |
| Bovine serum albumin (BSA) | Sigma-Aldrich | Steinheim, Deutschland |
| 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) | Sigma-Aldrich | Steinheim, Deutschland |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) | Sigma-Aldrich | Steinheim, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich | Steinheim, Deutschland |
| FCS | Biochrom | Berlin, Deutschland |
| Formaldehyd | Applichem | Darmstadt, Deutschland |
| Glycin | Applichem | Darmstadt, Deutschland |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | Applichem | Darmstadt, Deutschland |
| Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) | Biochrom | Berlin, Deutschland |
| Isopropanol | Applichem | Darmstadt, Deutschland |
| Kollagen G | Biochrom | Berlin, Deutschland |
| Luminol | Applichem | Darmstadt, Deutschland |
| Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich | Steinheim, Deutschland |
| Methylthiazoltetrazolium (MTT) | Sigma-Aldrich | Steinheim, Deutschland |
| Nonfat dried milk powder | Applichem | Darmstadt, Deutschland |

| | | |
|---|-----------------------|------------------------|
| p-Coumar-Säure | Fluka (Sigma-Aldrich) | Steinheim, Deutschland |
| Penicillin-Streptomycin | Sigma-Aldrich | Steinheim, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin/Antimycoticum (PSA) | Sigma-Aldrich | Steinheim, Deutschland |
| peqGold total RNA-Kit | PeqLab | Erlangen, Deutschland |
| Polyacrylamid-Lösung (30%) | Applichem | Darmstadt, Deutschland |
| Propidium Iodid (PI) | Abcam | Cambridge, UK |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Applichem | Darmstadt, Deutschland |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Sigma-Aldrich | Steinheim, Deutschland |
| Tris-Hydrochlorid | Applichem | Darmstadt, Deutschland |
| Triton X-100 | Applichem | Darmstadt, Deutschland |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich | Steinheim, Deutschland |
| Trypsin | Gibco | Carlsbad, USA |
| Tween | Applichem | Darmstadt, Deutschland |

2.2 Puffer und Lösungen

2.2.1 PBS- Puffer

Der PBS- Puffer wurde hauptsächlich verwendet, um Zellen zu waschen oder als Transfermedium eingesetzt.

PBS-:

| | |
|----------------------------------|----------|
| NaCl | 136,9 mM |
| KCl | 2,7 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 10,1 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,8 mM |

Bei PBS+ wurde zusätzlich zugegeben:

| | |
|---------------------------------------|---------|
| CaCl ₂ | 4,5 mM |
| MgCl ₂ * 6H ₂ O | 0,42 mM |

Die Puffer wurden mit sterilisiertem Wasser angesetzt und der pH auf 7,4 eingestellt.

2.2.2 Zellkulturmedien

10% VGMZ Medium

10% FCS

1% Penicillin/Streptomycin/Antimycoticum (PSA)

in DMEM

1% VGMZ Hungermedium

1% FCS

1% Penicillin/Streptomycin/Antimycoticum (PSA)

in DMEM

Einfrriermedium

1% DMSO in FCS

2.3 Materialauflistung

2.3.1 Instrumente

| <u>Produkt</u> | <u>Hersteller</u> | <u>Produktionsort und -land</u> |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------|
| Axiovert 200M | Carl Zeiss | Oberkochen, Deutschland |
| Axiocam | Carl Zeiss | Oberkochen, Deutschland |
| BD FACS Canto™ II | Beckton Dickinson | Franklin Lakes, USA |
| Centrifuge 5415 R | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Centrifuge 5810 R | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Digital CCD Camera Controller ORCA-ER | Hamamatsu Photonics | Hamamatsu, Japan |
| IBIDI 8-Well slide | IBIDI | Martinsried, Deutschland |
| Ice Machine Scotsman AF 100 | Scotsman | Vernon Hills, USA |
| Kryoröhrchen | Sarstedt | Nümbrecht, Deutschland |
| Microflow biological safety cabinet | Nunc | Wiesbaden, Deutschland |

| | | |
|--|-----------------|-----------------------------|
| Microplate reader Tecan Spark 10M | Tecan Group | Männedorf, Schweiz |
| Microplate reader Tecan Spectra Fluor | Tecan Group | Männedorf, Schweiz |
| Pipette Research® 2,5 µl; 10 µl; 100 µl; 1000 µl; 5000 µl | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Pipette Research plus® 20 µl; 200 µl; 1000 µl | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Pipetman classic™ 20 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl | Gilson | Villiers le Bel, Frankreich |
| Thermaocycler TProfessional Basic | Biometra | Göttingen, Deutschland |
| Vortex-Genie | Bender & Hobein | Zürich, Schweiz |
| (produced by Scientific Industries inc., Springfield, USA) | | |
| Waterbath WBN 10 | Memmert | Schwabach, Deutschland |
| Weighing scale Acculab ALC 110.4 | Sartorius | Göttingen, Deutschland |

2.3.2 Zellkultur

| <u>Produkt</u> | <u>Hersteller</u> | <u>Produktionsort und -land</u> |
|------------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| Kryoröhrchen | VWR GmbH | Darmstadt, Deutschland |
| Zellkultur-Schale 3cm, 6 cm, 10 cm | BD Falcon | Heidelberg, Deutschland |
| Zählkammer | Biosigma Srl | Venedig, Italien |
| µ-Slide 8 Well | Ibidi GmbH | Martinsried, Deutschland |
| 24 & 96 Well-Plate | BD Falcon | Heidelberg, Deutschland |
| Zellschaber | VWR GmbH | Darmstadt, Deutschland |

2.3.3 Antikörper, Inhibitoren, Hormone und Wachstumsfaktoren

| <u>Produkt</u> | <u>Hersteller</u> | <u>Produktionsort und -land</u> |
|---|-------------------|---------------------------------|
| Mouse anti-GAPDH (#MAB374) | Merck-Millipore | Darmstadt, Deutschland |
| Rabbit anti-phospho-AKT (Ser473) (D9E) XP™ (#4060) | Cell Signaling | Danvers, USA |
| Rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK 1/2) (Thr202/Tyr204) E10 (#9106) | Cell Signaling | Danvers, USA |
| Rabbit anti-myc-tag (#2278) | Cell Signaling | Danvers, USA |
| Rabbit anti-p38 MAPK (#4511) | Cell Signaling | Danvers, USA |
| Anti-mouse Meerrettich peroxidase-gebundener Zweitantikörper (#401253) | Merck Millipore | Darmstadt, Deutschland |
| Anti-rabbit Meerrettich peroxidase-gebundener Zweitantikörper (#401353) | Merck Millipore | Darmstadt, Deutschland |
| LY 294002 (PI3K Inhibitor) | Merck Millipore | Darmstadt, Deutschland |
| Resistin, Humanes rekombinantes (rHu) (#86427.25) | Biomol | Hamburg, Deutschland |
| * Resistin, human recombinant (RD172016300) | BioVendor, R&D | Brno, Tschechien |
| Platelet derived growth factor (PDGF)-BB | Sigma-Aldrich | Steinheim, Deutschland |
| SecinH3 | Merck Millipore | Darmstadt, Deutschland |
| SB203580 (p38 MAPK Inhibitor) | Tocris | Bristol, UK |
| AKT Inhibitor | Tocris | Bristol, UK |
| PD 98059 (ERK Inhibitor) | Merck Millipore | Darmstadt, Deutschland |

** Wechsel aufgrund eines zwischenzeitlichen Lieferengpasses bei der Firma Biomol*

2.3.4 Software

| <u>Produkt</u> | <u>Hersteller</u> | <u>Produktionsort und -land</u> |
|----------------------|-----------------------|---------------------------------|
| SigmaPlot® Version13 | Systat Software, Inc. | San José, USA |
| Microsoft Excel | Microsoft Corporation | Redmond, USA |
| Microsoft PowerPoint | Microsoft Corporation | Redmond, USA |
| Microsoft Word | Microsoft Corporation | Redmond, USA |
| Hokawo | Hamamatsu | Hamamatsu, Japan |
| CellQuest | BD Biosciences | Franklin Lakes, USA |
| AxioVision 4.9 | Zeiss | Jena, Deutschland |

2.4 Zellen und Zellkultur

2.4.1. Verwendete Zellen

Bei den für diese Versuche benutzten Zellen handelte es sich um primäre porcine vaskuläre glatte Muskelzellen (VGMZ). In einem vorangegangenen Projekt wurden diese Zellen aus Schweineaorten extrahiert⁽¹⁸⁰⁾ und eingefroren. Für dieses Projekt wurden sie nun aufgetaut. Um in dem vorangegangenen Projekt die VGMZ zu isolieren, wurden die Schweineaorten longitudinal aufgeschnitten. Zunächst mussten nun die Endothelzellen entfernt werden. Dazu wurde überschüssiges Gewebe manuell entfernt, die Zellen anschließend in PBS- gewaschen und in einem Rahmen eingespannt. Danach wurde die Aorta für eine Stunde bei 37° C mit 0,2 µg/ml Kollagenase A in HBSS inkubiert. Nun wurde der Aorta das Zellkulturmedium DMEM zugegeben und mit einem Zellschaber abgelöst. Die restlichen Endothelzellen wurden nun behutsam mit einem Skalpell entfernt und das Gewebe in mehrere 5x5mm große Stücke geteilt, diese anschließend mit der luminalen Seite in eine Zellkulturschale gelegt und für 4 h bei 37° C mit 0,2 µg/ml Kollagenase A in Hanks gepufferter Salzlösung inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium entfernt und gegen DMEM als Zellkulturmedium ausgetauscht. Dieses wurde so lange alle

3 Tage gewechselt, bis sich ein ausgeprägter Zellrasen gebildet hatte. Dann wurden auch diese Stücke entfernt. Der Zelltyp wurde nun anhand der Detektion des smooth muscle (SM) actins bestätigt.⁽¹⁸⁰⁾ Die Zellen wurden dann für spätere Versuche erst im Einfriermedium eingefroren und in flüssigem N₂ bei -196° C gelagert.

2.4.2 Einfrieren der Zellen

Um Zellen in einer niedrigen Passage für Versuche kontinuierlich einsetzen zu können, wurden Zellen in ebendiesen Passagen nach der Isolation eingefroren. Dafür wurden konfluente Zellen einmalig mit PBS- gewaschen, gefolgt von der Inkubation mit Trypsin, um die Zellen von der Zellkulturschale abzulösen. Nach zusätzlichem, behutsamem Abschaben der Zellen mit einem Zellschaber wurde die gewonnene Suspension in ein Kryoröhrchen gegeben und anschließend in einer Einfrierbox bei -80° C ca. 24 h gelagert. Anschließend wurden die Zellen in flüssiges N₂ überführt.

2.4.3 Auftauen der Zellen

Die verwendeten VGMZ wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, dann im VGMZ Medium in einer Zellkulturschale mit 10 mm Durchmesser ausgesät und anschließend im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Ca. 4 h nach dem Anheften der Zellen am Untergrund der Zellkulturschale wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS+ gewaschen, gefolgt von der Zugabe frischen Mediums, um die zytotoxische Wirkung des DMSO im Einfriermedium zu unterbinden. Die Zellen wurden dann im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ weiter kultiviert.

2.4.4 Zellkultur

Die VGMZ wurden im VGMZ Medium bei 37° C mit 5% CO₂ kultiviert.

Zum passagieren der Zellen wurde zuerst das bestehende Medium abgesaugt. Im Anschluss daran wurden die Zellen einmalig mit calciumfreiem PBS- ausgewaschen, um die Reste des vorherigen Mediums zu entfernen und das freie Calcium ebenfalls

wegzuspülen. Anschließend wurde 1x Trypsin/EDTA zum Ablösen der Zellen zugegeben und ca. 2 min bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert, bis sich der Zellrasen abgelöst hat. Der Erfolg dieser Maßnahme wurde durch mikroskopische Sichtkontrolle kontrolliert. Um die Wirkung des Trypsins nach erfolgreichem Ablösen der Zellen zu neutralisieren, wurde 10% VGMZ Medium zugegeben, wonach die Zellen im Medium durch mehrmaliges vorsichtiges Aspirieren gleichmäßig verteilt und anschließend auf neue Schalen aufgeteilt wurden. Diese wurden mit auf die für die jeweilige Schalengröße passende Menge an Medium aufgefüllt. Daraufhin erfolgte die weitere Züchtung der Zellen, mit regelmäßigem Mediumwechsel alle 2-3 Tage, bis der Zellrasen konfluent war.

2.4.5 Beschichtung der Zellkulturschalen

Für alle Versuche wurden VGMZ auf beschichteten Zellkulturschalen ausgesät und weiter kultiviert. Zur Beschichtung der Zellkulturschalen wurde entweder Kollagen G (10 µg/ml) oder Gelatine (10 µg/ml) auf dem Boden gleichmäßig verteilt und anschließend bei 4° C über Nacht inkubiert. Abschließend wurde die Flüssigkeit abgesaugt, die Schale mit PBS+ gewaschen und die Zellen ausgesät.

2.4.6 Stimulation und Inhibition der Zellen

Bevor eine Behandlung der Zellen mit Resistin, PDGF und/oder Inhibitoren begann, wurden sie 24 h in 1% VGMZ Hungermedium inkubiert. Danach wurde das vorherige Medium abgesaugt und der jeweilige Wirkstoff zum 1%igen-Medium zugegeben (siehe Tabelle 2.1.6.1). Die Inhibitoren wurden immer 30 min vorinkubiert, bevor die Stimulation mit Resistin erfolgte.

Zur Kontrolle der jeweiligen Messung wurde bei jedem Versuch eine Sham-Lösung verwendet. Diese Lösung bestand aus jener, in der die Substanzen gelöst wurden. Hierbei kamen DMSO v/v und Wasser v/v zur Benutzung.

2.5 Transfektion

2.5.1 Transfektionslösungen und Plasmid-DNA

| <u>Produkt</u> | <u>Hersteller</u> | <u>Produktionsort und -land</u> |
|----------------------------------|--|---------------------------------|
| peqFect | PeqLab (VWR international) Erlangen, Deutschland | |
| jetPrime | PeqLab (VWR international) Erlangen, Deutschland | |
| pDNA ARNO-WT ⁽¹⁸¹⁾ | Dr. Lorraine Santy | Penn SU, USA |
| pDNA ARNO-R280D ⁽¹⁸¹⁾ | Dr. Lorraine Santy | Penn SU, USA |
| pDNA ARNO-E156K ⁽¹⁸¹⁾ | Dr. Lorraine Santy | Penn SU, USA |

2.5.2 ARNO Konstrukte (Plasmide)

Um die Funktion von ARNO in VGMZ zu untersuchen, wurden drei verschiedene pDNA-Konstrukte verwendet (ARNO WT, ARNO E156K, ARNO R280D), welche von Dr. Lorraine Santy, Penn State University, zur Verfügung gestellt wurden.⁽¹⁸¹⁾ Die GEF-Aktivität der Sec7 Domäne wurde durch Austausch der Glutaminsäure an Position 156 zu Lysin (E156K) ausgeschaltet. Um die Rolle der Pleckstrin Homology (PH)-Domäne für die Funktion von ARNO zu untersuchen, wurde ebenfalls durch eine Punktmutation an Position 280 das Arginin durch Asparagin ersetzt (R280D). Der Effekt der Expression beider ARNO-Mutanten wurde immer mit dem Effekt der Expression von ARNO Wildtyp (WT) verglichen.

2.5.3 Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA

Das Transfektionsreagenz PeqFect wurde für die Transfektion verwendet, bis die Firma PeqLab dieses Produkt aus dem Sortiment nahm. Die Versuche nach diesem Zeitpunkt wurden mit einem equivalenten Transfektionsreagenz von PeqLab, jetPRIME, durchgeführt.

Transfektion mit PeqFect

Transfektionslösung

7 µg pDNA

10 µl PeqFect (PeqLab, Erlangen, Deutschland)

pDNA und PeqFect wurden serumfreiem DMEM zugegeben zu einem finalen Volumen von 600 µl

Die pDNA wurde in 600 µl serumfreiem DMEM verdünnt und PeqFect dazugegeben. Die Transfektionslösung wurde daraufhin für 20 min bei RT inkubiert. Das Transfektionsreagenz ist aufgebaut auf einem Calciumchelatkomplex, wodurch eine Endozytose begünstigt wird. Für die Transfektion wurden Zellen mit einer Konfluenz von ca. 80% verwendet. Das Medium wurde abgesaugt und mit frischem Medium ersetzt (5,4 ml für eine Zellkulturschale mit 6cm Durchmesser). Die Transfektionslösung (600 µl für eine Zellkulturschale mit 6 cm Durchmesser) wurde daraufhin in das Medium getropft und die Schale vorsichtig geschwenkt, um die Transfektionslösung gleichmäßig zu verteilen.

Die Zellen wurden danach 24 h bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium mit der Transfektionslösung entfernt und mit frischem 10% VGMZ Medium ersetzt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Alle Versuche mit transfizierten VGMZ wurden 48 h nach der Transfektion durchgeführt.

Transfektion mit jetPRIME

Transfektionslösung

2 µg pDNA

4 µl jetPRIME (PeqLab, Erlangen, Deutschland)

200 µl jetPRIME Puffer (10x)

Dazu wurden je Well 2 µg des jeweiligen Plasmids mit 200 µl des fertig gelieferten jetPRIME Puffers gemischt, anschließend mittels Vortex für 5 s gemischt und abschließend zentrifugiert. Nun wurden je zu befüllendem Well 4 µl des jetPRIME hinzugegeben, erneut für 1 s im Vortex gemischt und kurz zentrifugiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl / Zellkulturschale (6 cm

Durchmesser) der Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Das zellenspezifische Medium wurde dabei zuvor nicht entfernt. Nach einem leichten Schwenken wurden die Platten bei 37° C inkubiert. Weitere 24 h später wurde das Medium mit der Transfektionslösung entfernt und durch 1% Wachstumsmedium ersetzt.

2.6 Versuche

2.6.1 MTT-Assay

MTT-Stocklösung

MTT 5 mg/ml in PBS+

Die Stocklösung wurde bei 4° C gelagert und für den gesamten Versuch angesetzt, um Messfehler durch Pipettierfehler und Ungenauigkeiten beim Abwiegen zu minimieren. Vor jeder Messung wurde die MTT-Stocklösung 1:10 in farblosem DMEM verdünnt.

Der MTT-Assay wurde zur Bestimmung der Zellaktivität lebender Zellen verwendet. Dadurch konnte ein direkter Bezug zur metabolischen Aktivität, der Proliferationsrate sowie der Zytotoxizität hergestellt werden. Durch die Reduktion des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu (E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan, die dabei stattfand (Abbildung 2.1.1.2), entstand ein wasserunlösliches Produkt. Diese Reaktion konnte durch einen Farbumschlag von gelb zu blauviolett bei einer Absorption in der Wellenlänge 550 nm quantifiziert werden⁽¹⁸²⁾.

Für die Messung wurden die Zellen in 24-Well-Platten ausgesät (eine konfluente Zellschale mit 10cm Durchmesser auf vier 24-Well Platten), bis zur ca. 30%igen Konfluenz gezüchtet und anschließend für 24 h im Hungermedium inkubiert. Die erste Messung wurde zum Zeitpunkt 0 (vor der Stimulation der Zellen) durchgeführt, um einen Bezugspunkt für die spätere Auswertung zu erhalten. Die beiden anderen Messungen wurden nach je 24 und 48 h durchgeführt. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen einmalig mit PBS+ gewaschen. Nach dem Waschen der Zellen wurde 400 µl MTT/Well (24-Wellplattenformat) pipettiert und die Zellen für 2 h in den Inkubator mit 5%igem CO₂ bei 37° C gestellt. Anschließend wurde die verwendete MTT-Lösung

entfernt, die Zellen einmalig mit PBS+ gewaschen, gefolgt von der Zugabe von 100%igem 2-propranol (500 µl/Well), um das Formazan aus den Zellen zu lösen. Davon wurden 100 µl in einer 96-Well Platte überführt und die Absorbans anschließend bei 550 nm mit einer Referenz von 650 nm gemessen. Für die Auswertung wurden die Absorptionen bei 650 nm von 550 nm abgezogen.

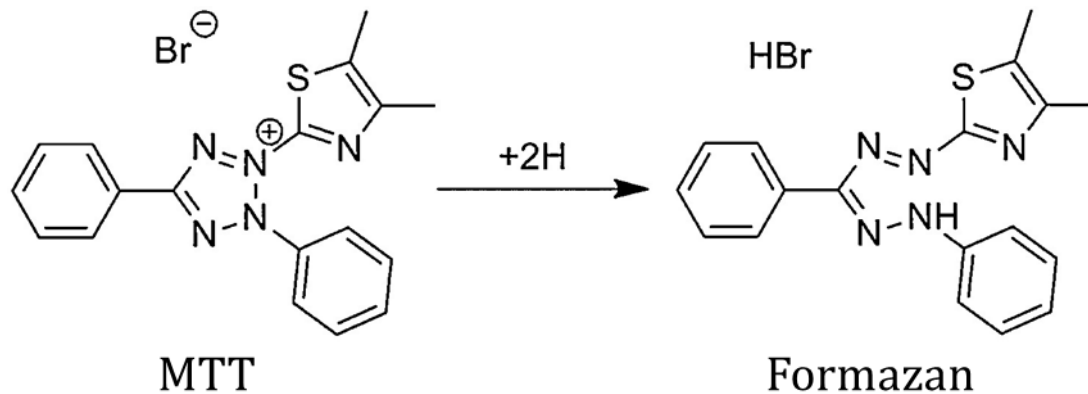


Abbildung 2.6.1

Abbildung 2.6.1: Komplexveränderung, die dem MTT-Assay zugrunde liegt und zu der Farbveränderung führt

Durch die Veränderung in der Ringkonfiguration des MTT wird aus MTT (gelb) Formazan (blauviolett), was den Farbumschlag erklärt.

Quelle: Angepasst und verändert um den mittleren Part der mitochondrialen Reduktase, sowie der Namen zum Original von Pascua-Maestro et al. (2018).⁽¹⁸³⁾

2.6.2 Western-Blot und Proteinbestimmung

Zellyse

Lysispuffer

Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology) 1:10 in destilliertem Wasser

1 mM PMSF

Für die Lyse der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmalig mit PBS+ gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der vorher angefertigte Lysepuffer über den Zellen verteilt (100 µl für eine 6 cm Zellkulturschale, 300 µl für eine 10 cm Zellkulturschale). Die Zellen wurden daraufhin bei -20° C für mindestens 30 min eingefroren. Die eingefrorenen

Zellen wurden danach langsam auf Eis aufgetaut, mit einem Zellschaber vorsichtig vom Boden der Schale abgelöst und ca. 15x durch eine Insulinspritze langsam aufgezogen und wieder in den Behälter zurückgegeben, um die Zellwände zu lysieren.

Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt, in der Zentrifuge für 10 min bei 4° C und 10000 RPM zentrifugiert und das Zellpellet verworfen.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinkonzentration der Lysate zu messen, wurde das Pierce® BCA Protein Assay verwendet. Dazu wurde von jeder angefertigten Probe 10 µl/Well in eine Microplate pipettiert und anschließend 200 µl der BCA-Lösung (Lösung A : Lösung B im Verhältnis 1:50) hinzugegeben. Um die Proteinkonzentration berechnen zu können, wurde gleichzeitig eine Standardreihe mitgemessen. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe von Bovinem Serumalbumin verwendet (siehe Tabelle 2.6.1). Nach einer Inkubation für 30 min bei 37° C wurde die Absorption bei 550 nm gemessen.

| | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|
| BSA-Stock (2 µg/µl) | 0 µl (0 µg) | 0,5 µl (1 µg) | 1 µl (2 µg) | 2,5 µl (5 µg) | 5 µl (10 µg) | 10 µl (20 µg) |
| H₂O | 10 µl | 9,5 µl | 9 µl | 7,5 µl | 5 µl | 0 µl |
| BCA-Lösung | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 200 µl |

Tabelle 2.6.1: Pipettierschema für die Standardreihe

Western Blot

Auftragspuffer (4x)

| | |
|-----------------|--------|
| Tris-HCl pH 6.8 | 0,25 M |
| SDS | 8% |
| Glycerin | 40% |
| Bromphenolblau | 0,02% |
| Mercaptoethanol | 400 mM |

Der Auftragspuffer wurde 1:4 mit Proteinlysaten verdünnt.

Laufpuffer (5x)

| | |
|-------------------------|--------|
| Tris Base | 125 mM |
| Glycin | 1 M |
| SDS | 0,5% |
| In destilliertem Wasser | |

Vor Anwendung wurde der Laufpuffer 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Transferpuffer

| | |
|----------|--------|
| Glycine | 1 M |
| TrisBase | 125 mM |
| MeOH | 20% |

Sammelgel (4%) für 4 kleine Gele

| | |
|----------------------|-------|
| destilliertes Wasser | 12 ml |
| Polyacrylamidlösung | 30% |
| Tris pH 6,8 | 0,5 M |
| SDS | 10% |
| TEMED | 40 µl |
| APS | 10% |

Trenngel (10%) für 4 kleine Gele

| | |
|--------------------------|-------------|
| destilliertes Wasser | 18 ml |
| Acrylamide Bisacrylamide | 30 %: 0.8 % |
| Tris pH 8,8 | 1,5 M |
| SDS | 10% |
| TEMED | 50 µl |
| APS | 10% |

Der Western-Blot ist eine Möglichkeit zur Untersuchung von Proteinmassen, welche in Dalton angegeben werden. Durch Western-Blot werden Proteine anhand ihrer Größe

durch ein SDS-Polyacrylamidgel (PAGE) aufgetrennt.⁽¹⁸⁴⁾ Durch Veränderung des Polyacrylamidanteils im Gel kann die Dichte des Laufgels variiert werden, wodurch eine zusätzliche Fokussierung auf bestimmte Bereiche einer Masse möglich ist. Die leichteren Proteine können mit deutlich weniger Widerstand durch das Gel hindurchlaufen und die größeren und somit auch die schwereren Proteine aufgrund des größeren Widerstandes einen kürzeren Weg zurücklegen. Senkt man den Polyacrylamidanteil, werden die schweren Proteine besser aufgeteilt und umgekehrt. Um die Größe der aufgetrennten Proteine einfacher zuordnen zu können, wird ein Marker, bestehend aus gefärbten Proteinen mit bekannter Daltonzahl, bei dem Versuch mit aufgetragen.

Das benötigte Gel bestand aus einer Sammel- und einer Trennschicht. Beide Gele wurden getrennt voneinander angefertigt. Das Sammelgel wurde zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 1,5 mm gegossen. Um Unebenheiten am Gelrand während des Auspolymerisierens zu vermeiden, wurden anschließend ca. 500 µl Isopropanol hinzugefügt. Nach dem Aushärten des Trenngels und Auswaschen des Isopropanols wurde das Sammelgel gegossen. In das Sammelgel wurden kleine Taschen mittels eines Kunststoffkammes eingefügt, indem er vor dem Erhärten des Gels hineingesteckt wurde. Die Gele wurden in ihrer Halterung in einer Pufferkammer platziert und mit dem Laufpuffer vollständig bedeckt. 30 µg Protein wurden anschließend mit dem Auftragspuffer (1:4) und Wasser gemischt, sodass ein totales Volumen von 30 µl entstand. Abschließend wurden diese Proben bei 94° C für 5 min erhitzt. Die Proben wurden in die Taschen eingefüllt und durch Anlegen einer Spannung von 100 V für ca. 30 min (Sammelgel) und anschließend mit 150 V für ca. 2 h (Trenngel) aufgetrennt.

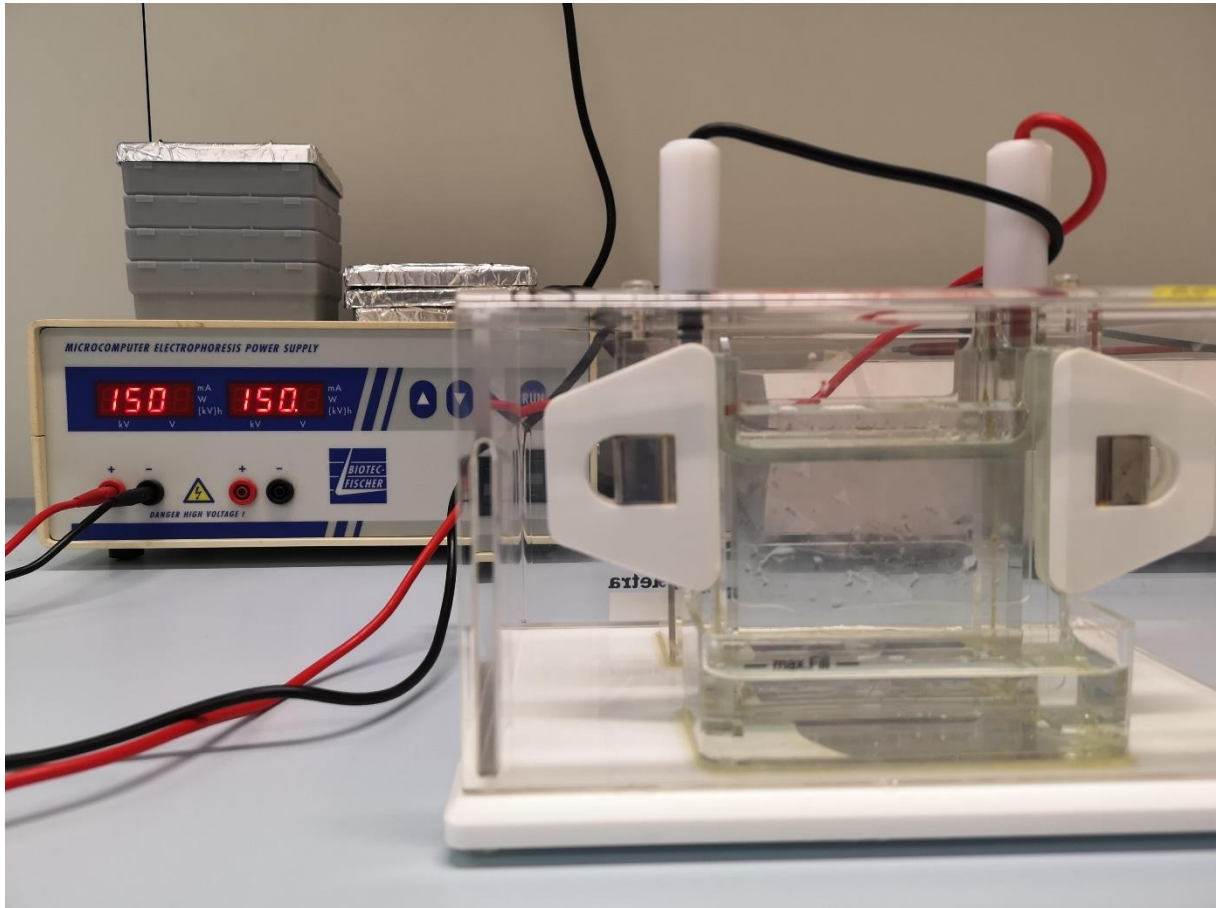


Abbildung 2.6.2

Abbildung 2.6.2: Abbildung eines Versuchsaufbaus zum Western Blot

Man sieht im rechten Abschnitt des Bildes eine Gelelektrophoresekammer mit einem Gel in der Kammer. Im linken Hintergrund ist die Stromversorgung sichtbar, welche über das rote und schwarze Stromkabel mit der Kammer verbunden ist.

Quelle: Eigene Abbildung

Um die aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu übertragen, wurde das Wet-Blotting angewendet. Dafür wurde das Gel auf eine Nitrozellulosemembran, die vorher im Blottingpuffer getränkt wurde, gelegt. Gel und Membran wurden anschließend zwischen zwei im Blottingpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Dieses „Sandwich“ wurde danach zwischen zwei Schwämme in eine Halterung gelegt und in die Blottingkammer eingehängt. Diese wurde anschließend in die Kammer eingelegt, mit dem Transferpuffer bedeckt und bei 50 V für 2 h laufen gelassen.

Detektion von Proteinbanden

Blockingpuffer

TBS(-T) (10x)

| | |
|------------------|------------------------------|
| Tris-Base | 125 mM |
| NaCl | 950 mM |
| H ₂ O | auf benutzte Menge auffüllen |
| Tween 20 | 0,1% (wenn TBS-T benötigt) |

Milchpuffer

| | |
|------------------|-----------------|
| TBS-T | benötigte Menge |
| Magermilchpulver | 5% oder 3% |

BSA-Puffer

| | |
|-----|-----------------|
| TBS | benötigte Menge |
| BSA | 5% |

Antikörperkonzentrationen

| <u>Antikörper</u> | <u>Verdünnung</u> | <u>Puffer</u> |
|-------------------|-------------------|-------------------|
| GAPDH | 1:1000 | in BSA Puffer 5% |
| Myc-tag | 1:1000 | in Milchpuffer 5% |
| Phospho-P38 MAPK | 1:1000 | in BSA Puffer 5% |
| Phospho-p44/p42 | 1:1000 | in Milchpuffer 5% |
| Phospho-AKT | 1:1000 | in Milchpuffer 5% |

| <u>Zweitantikörper</u> | <u>Verdünnung</u> | <u>Puffer</u> |
|------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| Anti-mouse IgG | 1:1000 | In BSA Puffer 5% oder Milchpuffer 5% |
| Anti-rabbit IgG | 1:1000 | In BSA Puffer 5% oder Milchpuffer 5% |

Waschpuffer

siehe TBS-T

Blockingpuffer

Milchpuffer

Magermilchpulver 5% in TBS-T

BSA-puffer

BSA 5% in TBS-T

ECL-Lösung

p-Coumarsiure 0,4 mMol

Tris/HCL (pH 6,8) 100 mMol

Luminol 2,5 mMol

H₂O₂ 0,08%

Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen des Antikörpers, wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur mit Blockingpuffer auf einem Schüttler inkubiert.

Um die zu untersuchenden Proteine detektieren zu können, wurden zuerst die primären proteinspezifischen Antikörper, im Blockingpuffer verdünnt, mit der Membran bei 4° C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer jeweils 5-10 min gewaschen. Anschließend wurden die mit Meerrettichperoxidase markierten Sekundärantikörper im Blockingpuffer (1:10000) verdünnt und mit der Membran für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal jeweils 5-10 min mit Waschpuffer gewaschen. Spezifische Proteinbanden wurden nun mittels Zugabe von ECL-Lösung in einer Dunkelkammer mittels DCC-Kamera

detektiert. Die Quantifizierung der jeweiligen Proteinbanden erfolgte durch Messung der Pixeldichte (Densitometrie) mit dem Programm Hokawo Version 2.9. Für die Auswertung wurde das Verhältnis (Quotient) zwischen dem zu untersuchenden Protein und GAPDH (*house-keeping protein*) für jede Probe berechnet.

2.6.3 RNA-Isolation

Die RNA-Extraktion wurde mit dem peqGold total RNA-Kit laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Kit basiert auf einer Aufreinigung von Silikamembranen durch Zentrifugation. Mit diesem Kit können bis zu 100 µg nicht degradiertes RNA (ab 200 Basenpaare) aufgereinigt werden. Der RNA-Gehalt der Proben wurde bestimmt, indem die Probe mit RNase-freiem Wasser 1:100 verdünnt und anschließend in einer 1 cm Küvette bei 260 nm in einem Photometer gemessen wurde. Die RNA-Konzentration wurde mittels folgender Formel berechnet:

RNA Konzentration in µg/ml = OD₂₆₀ * Verdünnungsfaktor 100 * 40 (Standardkoeffizient für 1 cm Küvette).

2.6.3.1 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) von MMP-2 mRNA

Die MMP-2 mRNA Expression wurde in Kooperation mit Prof. Wörnle, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität München, durchgeführt. Mit der quantitativen Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) konnte die Transkription eines bestimmten mRNA und daher indirekt die DNA-Expression eines Gens gemessen werden.

Dazu wurden zuerst anhand von spezifischen Primern 2 µg mRNA mittels Reverse-Transkriptase PCR in cDNA umgeschrieben, unter Zuhilfenahme des High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kits (Applied Biosystems), und anschließend unter Verwendung von TaqDNA Polymerase vervielfältigt mit TaqMan ABI 7700 (PE Applied Biosystems, Darmstadt,

Deutschland). Die Vervielfältigung wurde durch Interkalation von SybrGreen verfolgt⁽¹⁸⁵⁾. Als house-keeping gene wurde S18 verwendet und die MMP-2 Expression hierauf bezogen. Alle Messungen wurden in Duplikate durchgeführt.

Primersequenzen, die verwendet wurden, waren für MMP-2 Fw agg atg gca agt acg gct tc, MMP-2 Rev agc tgt tgt agg atg tgc cc; s18 rRNA Fw cgc ggt tct att ttg ttg gt, s18 rRNA Rev agt cgg cat cgt tta tgg tc.

Die Expression von MMP-2 wurde durch folgende Formel berechnet:

$$\Delta\Delta Ct = 2^{-((Ct_{target} - Ct_{HK})_T - (Ct_{target} - Ct_{HK})_C)}$$

Ct: Cycles of threshold; T: stimulierte Probe; C: nicht-stimulierte Probe

2.6.4 Messung der Zellviabilität

2.6.4.1 Trypanblau-Färbung

Trypanblau-Lösung

Trypanblau in PBS+ 0,1%

Die Trypanblaufärbung wurde verwendet zur Darstellung des Zellüberlebens, da der Farbstoff nur Zellen mit löchriger Zellmembran färben kann⁽¹⁸⁶⁾.

Die Zellen wurden dabei zuerst in Zellkulturschalen (3 cm Durchmesser) auf Kollagen ausgesät, wachsen gelassen und für diesen Versuch mit den drei bereits beschriebenen ARNO Konstrukten transfiziert. Zusätzlich wurde eine Schale mit unbehandelten Zellen als Vergleichswert gezüchtet. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium entfernt und einmalig mit PBS- gewaschen. Anschließend erfolgte die Ablösung der Zellen mit 5 mM EDTA, da dies die VGMZ nicht-enzymatisch und daher sehr schonend ablöst. Ein Abkratzen mit dem Zellschaber erfolgte ebenfalls nicht, um den lebenden Zellen den Stress des Abkratzens zu ersparen. Nun wurden diese Zellen bei 3000 Umdrehungen/min

für 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand entfernt und der Zellpellet anschließend in der vorbereiteten 0,1% Trypanblaulösung gelöst.

Die Zellen wurden 1 min bei RT in der Lösung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die gewonnenen Suspensionen zu je 7 µl in die Zählkammern (fast-read 102 cell counting chambers von Biosigma Srl) pipettiert. Diese Kammern sind durch ein Gitternetz aufgeteilt in 16 gleich große Quadrate, von denen man je 2-3 zählt. Dazu wurde ein Quadrat eingestellt und die Zellen einzeln mit Hilfe eines Hand- oder Klickzählers gezählt. Diese Quadrate wurden zufällig gewählt, sodass sie ein verwertbares, die Zählkammer abbildendes Ergebnis lieferten. Nach Zählung der drei Kammern wurden diese addiert und davon der Mittelwert berechnet. Um die Zellkonzentration (Zellen/ml) zu berechnen wurde der Mittelwert mit 10^4 multipliziert.

2.6.4.2 Propidiumiodid-Färbung

Propidiumiodid (PI)-Färbelösung

1,2 µg / ml Propidiumiodid in PBS+

Das Zellüberleben wurde darüber hinaus durch Färbung mit PI, die mit der DNA interkaliert, untersucht. Die Messung erfolgte mit Zellen, die nicht für die Färbung lysiert wurden. Dadurch wurden nur Zellen mit löchriger Zellmembran und somit sich in der Apoptose oder Nekrose befindende Zellen gefärbt ^(187, 188). 24 h nach der Transfektion wurde das Wachstumsmedium gegen 1% VGMZ Medium ausgetauscht und die VGMZ für weitere 24 h bei 37° C und 5% CO₂ kultiviert. Für die PI-Färbung wurden die Zellen einmalig mit PBS- gewaschen und schonend mit 5 mM EDTA abgelöst.

Danach wurden die Zellen für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in der PI-Färbelösung resuspendiert. Die Zellen wurden daraufhin für 20 min bei RT und in Dunkelheit inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (2 min bei 3000 rpm) wurde die PI-Färbelösung entfernt und die Zellen in PBS+ resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im PE-Kanal des Durchflusszytometers (FACS-Canto II, BD, Heidelberg) gemessen. Als positive Kontrolle wurden Zellen, die vor der Färbung mit 0,1% Triton X-100 in PBS+ lysiert wurden, verwendet. Durch die Lyse werden sie alle mit PI gefärbt.

2.6.5 Zellkernfärbung

2.6.5.1 Zellfixierung

Um die Zellproteine in ihrer nativen Form für die Färbung zu bewahren und ein Austreten der Proteine aus der Zelle während der Färbung zu verhindern, müssen die Zellen fixiert werden.

Die Methanolfixierung hat den Vorteil, dass man den Schritt der Zellwandpermeabilisierung überspringt, da das Methanol die Zelle fixiert, indem der Alkohol das Wasser in der Zelle ersetzt, dadurch ihre weiteren überlebensnotwendigen Prozesse durch Dehydratation unterbindet⁽¹⁹⁰⁾ und die Zellwand durch ihren polaren Charakter, der von Methanol an einigen Stellen aufgehoben wird, löchrig werden lässt.

Als erstes wurde Methanol (MeOH) 100% mit -20° C auf die Zellen gegeben und für ca. 20 min im Gefrierschrank aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen dreimalig mit PBS+ gewaschen, bis der letzte Rest an MeOH verschwunden war. In diesem Zustand konnten die Zellen auch bei -20° C gelagert werden.

2.6.5.2 DAPI-Färbung

Um Zellkerne sichtbar zu machen wurden Zellen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Zellkernfärbung) gefärbt. DAPI färbt die AU- und AT-reichen Regionen der DNA wie auch der RNA⁽¹⁸⁹⁾.

2.7 Adhäsions-Assay

Der Adhäsions-Assay diente der Messung der Adhäsion von Zellen am Untergrund.

Konfluente VGMZ in einer Zellschale mit 6 cm Durchmesser wurden nach dem Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS- abgelöst. Dies geschah durch Zugabe von EDTA (5 mM). Beschleunigt wurde diese Reaktion durch Inkubation bei 37° C. Zur Sicherstellung des Erfolges der Ablösung wurde mit dem Mikroskop kontrolliert, ob die

Lösung der Zellen vom Untergrund funktioniert hat. Die gelösten Zellen wurden nun in ein Eppendorf-Gefäß überführt und, abhängig vom Versuch, stimuliert oder nicht.

Die so erhaltene Zellsuspension wurde gleichmäßig zu je 300 µl auf eine mit Kollagen G beschichtete 24-Well Platte pipettiert und behutsam vertikal gerüttelt, um ein gleichmäßigeres Verteilen der Zellen gewährleisten zu können. Die somit befüllten 24-Well-Platten wurden anschließend für 1 h in den 37° C Inkubator gestellt. Nach diesem Vorgang wurde das Medium behutsam von den Zellen entfernt und mittels einmaliger vorsichtiger Zugabe von PBS+ wurden letzte Mediumreste entfernt, um im Anschluss mit auf -20°C gekühltem MeOH die Zellen bei ebenfalls -20° C für 30 min zu fixieren. Um die Zellen besser zählen und auseinanderhalten zu können, wurden sie abschließend mit DAPI ((1 µg/ml) in PBS+) gefärbt, da dieser Farbstoff in geringsten Mengen sehr gut und sicher färbt und man so nur lebende Zellen mit Zellkern zählt.

2.8 Scratch-Assay

Zuerst mussten die Zellen gleichmäßig in eine 24-Wellplatte aufgesplittet und konfluent werden. Kurz vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium durch 1%iges Hungermedium ersetzt und für einen weiteren Tag inkubiert. Bei den Proben mit SecinH3 (15 µm) wurde dieses zuvor für 24 h hinzugegeben und bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde wie zuvor beschrieben weiterverfahren.

Eine Wunde⁽¹⁹¹⁾ im Zellrasen wurde nun mithilfe einer 100 µl Pipettenspitze durch die Mitte des Wells gezogen und anschließend das Medium mitsamt den aufschwimmenden Zellen abgesaugt. Daraufhin wurde den Zellen neues Medium mit oder ohne Stimulation und Inhibitoren zugesetzt und für weitere 16 h inkubiert. Vorher wurden allerdings erste Bilder von der entstandenen Wunde (Scratch) angefertigt, um die Breite der Wunde vergleichen zu können (t0). Bilder wurden mit einem Axiotom®, einem Axiovert 200m® und einer AxioCam® jeweils von CarlZeiss, bei 2,5x Vergrößerung aufgenommen.

Nach ca. 16 h (t1) wurden die Zellen vom Medium befreit, einmalig mit PBS+ vorsichtig abgespült und wiederum mit 100% MeOH (auf -20°C gekühlt) für 30 min bei -20° C fixiert. Zum Abschluss wurden die Zellen mit DAPI gefärbt (wie unter 2.6.5.3 beschrieben) und mit dem Mikroskop aufgenommen.

Die Breite des Scratches wurde in Bildern von t0 markiert und die Markierung auf die Bilder von t1 (16 h) überführt. Die Anzahl der Zellkerne innerhalb dieses Bereiches wurden als eingewanderte Zellen gezählt.

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen erfolgte in allen Fällen mit der Software SigmaPlot® Version 13.0 der Firma Systat Software. Die Daten werden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) gezeigt. Die Normalverteilung wurde als erstes mittels des durch das Programm SigmaPlot empfohlenen Kolmogorow-Smirnow-Tests berechnet. Für den Vergleich mehrerer normalverteilter Gruppen wurde der One-Way ANOVA benutzt. Als Post-Test wurde der Student-Newman-Keuls Test bei gleich großen Wertegruppen benutzt, der alle einzelnen Werte gegeneinander vergleicht. In den Fällen unterschiedlich großer Wertegruppen wurde als Post-Test der Duncan-Test durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Gruppen wurde ANOVA on Ranks (Kruskal-Wallis) verwendet, gefolgt von den Post-Tests: Student-Newman-Keuls (bei gleichen Gruppengrößen) oder Dunn's Method (bei ungleich großen Gruppen). Beim Vergleich von zwei normalverteilten Gruppen wurde der t-Test verwendet.

Das Ergebnis wurde als signifikant betrachtet bei einem p-Wert ≤ 0.05 . Die Ergebnisse sind mit Mittelwert und SEM dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Resistin beeinflusst nicht die Proliferation von VGMZ

Die extrazelluläre Matrix (EZM) und deren Proteine haben einen wichtigen Anteil am Wachstum und der Migration der VGMZ. Aufgrund dessen versuchten wir in unseren *in vitro* Versuchen, die *in vivo* Situation möglichst detailgetreu nachzuahmen. Daher interessierte uns als erstes, auf welcher Matrixunterlage die VGMZ in der Zellkultur am besten wachsen. Hierzu wurde der MTT Assay verwendet. Als Hauptbestandteil der EZM kam Kollagen in Frage. Als zweiter Bestandteil wurden die Versuche mit Gelatine durchgeführt, da sich hier RGD-Sequenzen befinden, welche die Zelladhäsion und somit die mechanische Verankerung der Zellen vermitteln. Dazu wurden die VGMZ auf Kollagen G (10 µg/ml) oder Gelatine (10 µg/ml) ausgesät und mit Zellen auf unbeschichteten Oberflächen verglichen. Das Wachstum der VGMZ wurde durch die Anheftung an Kollagen G oder Gelatine gesteigert (Abbildung 3.1.1).

Um das Potential des proinflammatorischen Adipokins Resistin auf Prozesse, die charakteristisch für eine Dedifferenzierung von VGMZ sind, zu untersuchen, wurde nun der Einfluss von Resistin in einer pathologischen Konzentration von 100 µg/ml auf VGMZ Wachstum (Proliferation) untersucht. Bei Stimulation mit Resistin zeigte sich, wie in Abbildung 3.1.1B zu sehen ist, kein signifikanter Unterschied zu den unstimulierten Zellen auf kollagen- bzw. gelatinebeschichtetem Boden.

Obwohl Resistin die Proliferation nicht steigerte, wurde das VGMZ Wachstum unter basalen Bedingungen durch eine künstliche EZM verstärkt (Abbildung 3.1.1A). Aus diesem Grund wurden nachfolgende Versuche mit Zellen, die auf Kollagen G ausgesät wurden, durchgeführt.

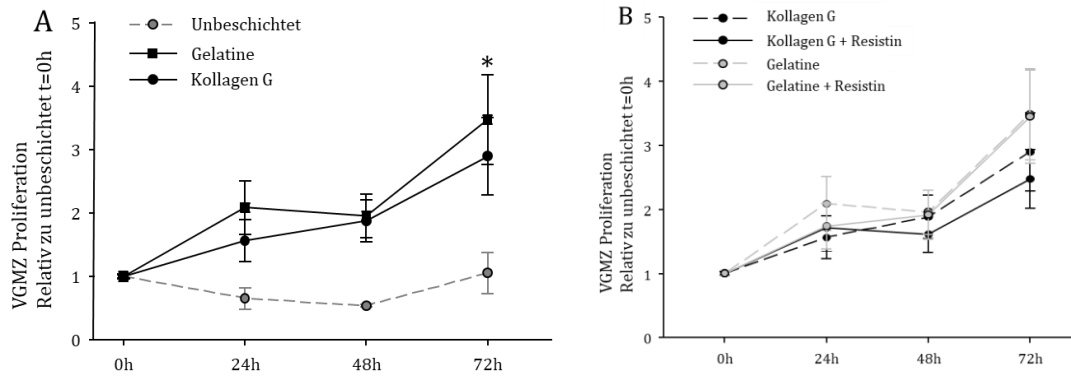


Abbildung 3.1.1

Abbildung 3.1.1: VGMZ-Proliferation

A) Das Wachstum von VGMZ in Abhängigkeit der Matrix (Gelatine oder Kollagen G) wurde mittels dem MTT-Assay untersucht (n=8-14, *p<0.05 Gelatine/Kollagen G vs. unbeschichtet).

B) Das Wachstum von VGMZ auf Kollagen G- oder gelatinebeschichteten Oberflächen in Abhängigkeit von Resistin (100 ng/ml) im Vergleich zu unstimulierten Zellen (n=14).

Quelle: Eigene Abbildung

3.2 Cytohesinhemmung beeinflusst resistinabhängige VGMZ Adhäsion

Während des Prozesses einer Dedifferenzierung von VGMZ spielt die Beweglichkeit der Zellen eine große Rolle. Die Zellen müssen sich vom Untergrund, der EZM, lösen und wieder adhären. Um herauszufinden, ob Resistin die Adhäsion von VGMZ beeinflusst, wurde untersucht, wie viele Zellen sich nach 1 Stunde Resistin-Stimulation an Kollagen G adhären. Stimulation mit Resistin erhöhte die Adhäsion von VGMZ (Abbildung 3.2.1) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle um das Dreifache. Um herauszufinden, ob die durch resistininduzierte Adhäsion durch ARNO beeinflusst wird, wurden Zellen ebenfalls mit dem Cytohesinhemmer SecinH3 behandelt. Wie in Abbildung 3.2.1A gezeigt, reduzierte eine Behandlung mit SecinH3 die basale Adhäsion der VGMZ und verhinderte die resistininduzierte VGMZ-Adhäsion.⁽²⁷⁾

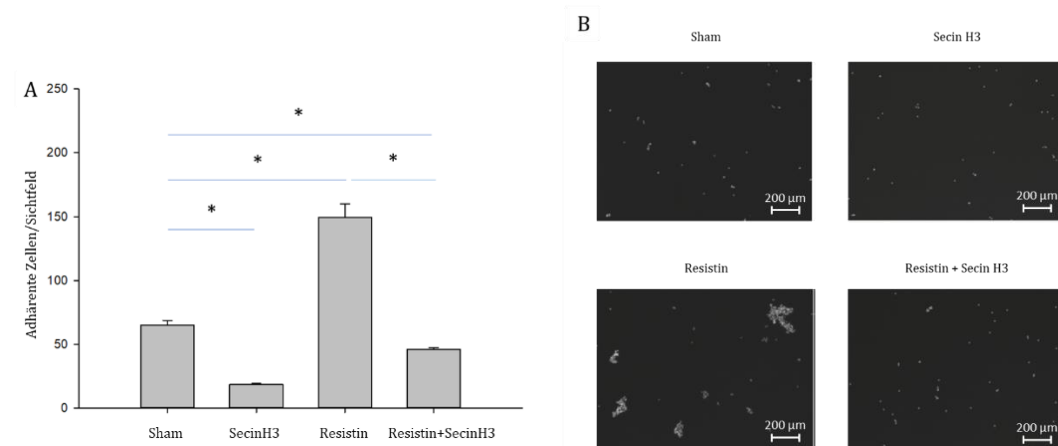


Abbildung 3.2.1

Abbildung 3.2.1: Cytohesinhemmung reduziert die Adhäsion von VGMZ

A) Adhäsion von VGMZ unter Stimulation mit Resistin (100ng/ml) und einem pharmakologischen ARNO-Inhibitor (Secin H3; 15µM) resistininduzierte ($n=18$, $*p<0.05$).

B) Repräsentative Aufnahmen (2,5 x Objektiv) von adhärenen VGMZ nach 1 h. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und anschließend gezählt.

Quelle: Daten und Aufnahmen sind aus der zum Teil aus dieser Arbeit entstandenen Publikation (Heun et al., 2020), wurden für diese Arbeit ins Deutsche übersetzt und graphisch angepasst.⁽²⁷⁾

3.3 Resistin fördert die VGMZ-Migration

Da die VGMZ-Migration charakteristisch für deren Dedifferentierung und ein wichtiger Faktor zur Entwicklung von Atherosklerose ist, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob Resistin in Gefäßmuskelzellen eine Auswirkung auf die Migration hat. Um die VGMZ-Migration zu untersuchen, wurde der Scratch-Assay verwendet, in dem die Zellschicht durch eine Wunde („Scratch“) beschädigt wird. Die Migration wird daraufhin durch das Zählen der in die Wunde einmigrierenden Zellen bestimmt. Als positive Kontrolle wurden Zellen mit PDGF stimuliert, die nachweislich diesen Prozess begünstigt.⁽¹⁹²⁾

In Abbildung 3.3.1A ist eindeutig zu sehen, dass Resistin und PDGF jeweils im Vergleich zu Sham zur signifikant erhöhten Zellmigration führten ($p > 0.05$). Untereinander war jedoch kein signifikanter Unterschied zu sehen.

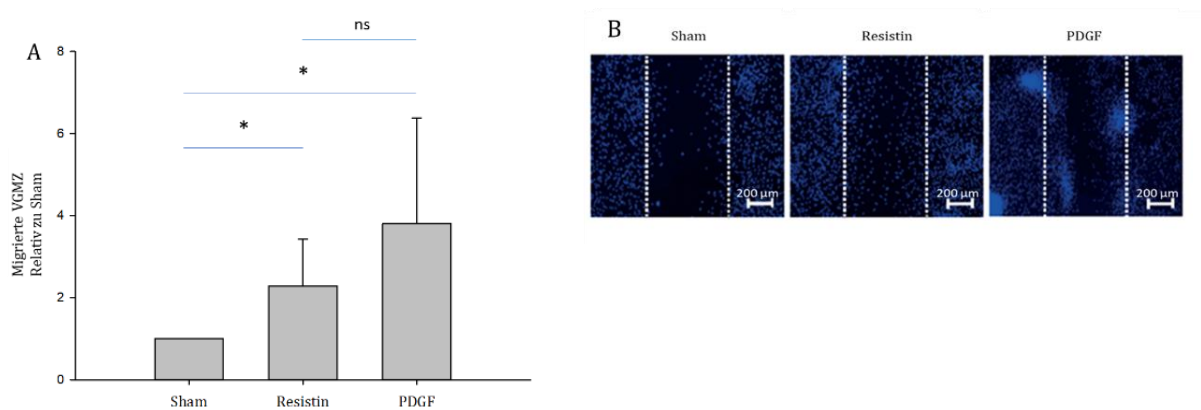


Abbildung 3.3.1

Abbildung 3.3.1: Resistin steigert die Migration der VGMZ

A) Die Migration der VGMZ unter Resistin (100 ng/ml) und PDGF (10 ng/ml) wurde mittels eines Scratch-Assays ermittelt ($*p < 0,05$; $n = 5$ Versuchen jeweils in Triplikaten; ns = nicht signifikant).

B) Repräsentative Aufnahmen (2,5x Objektiv) von in einen Scratch eingewanderten VGMZ 16 h nach Stimulation. Für die Auswertung wurden die Zellen fixiert und anschließend mit DAPI (blau) gefärbt. Weiß gestrichelte Linien zeigen die Ränder des Scratches bei Zeitpunkt 0.

Quelle: Eigene Abbildungen

3.4 Cytohesinhemmung unterdrückt resistinabhängige VGMZ-Migration

Da wir beobachten konnten, dass Resistin die VGMZ-Migration erhöht, wurde als Nächstes untersucht, ob ARNO die resistinvermittelte Migration beeinflusst. Wie in Abbildung 3.4.1A zu sehen ist, führte die Stimulation mit Resistin zu einer signifikant gesteigerten Migration im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Hemmung von ARNO mittels des Cytohesinheimers SecinH3 verhinderte die resistininduzierte Migration ebenfalls signifikant.⁽²⁷⁾ Interessanterweise führte eine Inhibition von ARNO auch zu einer Hemmung der basalen VGMZ-Migration.

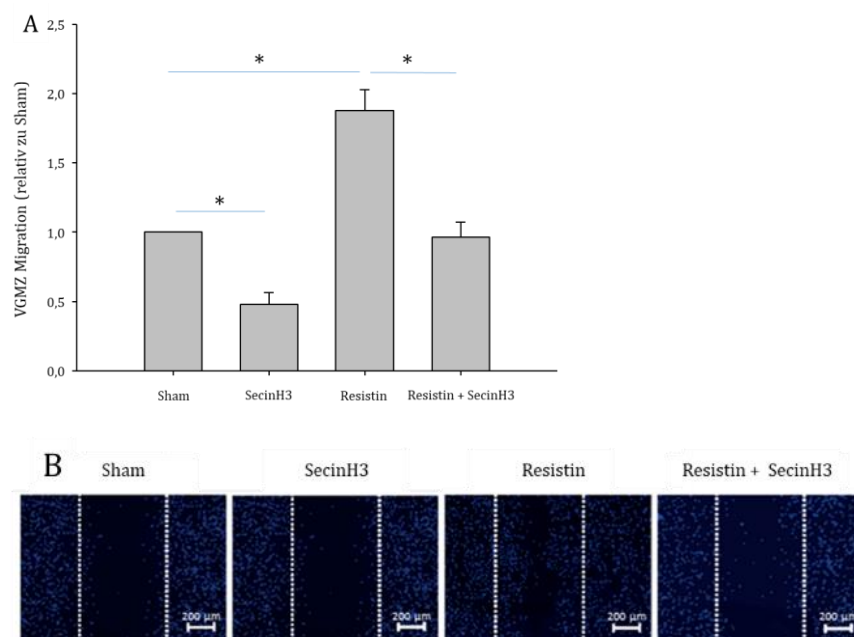


Abbildung 3.4.1

Abbildung 3.4.1: Cytohesinhemmung senkt die Migration der VGMZ

A) VGMZ-Migration unter Stimulation mit Resistin (100ng/ml) und unter Einfluss von ARNO-Hemmung (Secin H3; 15µM) wurde anhand des Scratch-Assays ermittelt (* $p < 0.05$; $n = 11$ in Triplikaten).

B) Repräsentative Aufnahmen (2,5 x Objektiv) von den in den Scratch einmigrierten und mit DAPI gefärbten VGMZ (blau). Weiß gestrichelte Linien zeigen die Ränder des Scratches bei Zeitpunkt 0.

Quelle: Daten und Aufnahmen sind aus der zum Teil aus dieser Arbeit entstandenen Publikation (Heun et al., 2020), wurden für diese Arbeit ins Deutsche übersetzt und graphisch angepasst.⁽²⁷⁾

3.5 Expression von ARNO WT, E156K und R280D in VGMZ

Da wir beobachten konnten, dass eine Applikation von SecinH3 die resistininduzierte VGMZ-Migration beeinflusste, wollten wir dies in einem nächsten Schritt näher untersuchen. Dafür wurden VGMZ mit verschiedenen ARNO Konstrukten transfiziert. Der Einfluss der GEF-Aktivität von ARNO wurde mittels einer Mutation in der Sec7 Domäne (E156K) untersucht. Da es auch Daten aus anderen Forschergruppen gibt, die zeigen, dass PI3K für die Funktion von ARNO wichtig ist⁽¹⁹³⁾, indem ARNO mit der PH-Domäne an von PI3K generierten PIP₃ binden kann, wurde diese Funktion durch Verwendung einer Mutation in der PH-Domäne (R280D) untersucht. Alle Konstrukte wurden als Fusionsproteine mit einem Myc-tag exprimiert. Als Erstes wurde die erfolgreiche Transfektion der pDNA-Vektoren in VGMZ durch den Nachweis des Myc-tags detektiert (Abbildung 3.5.1A). Als Zweites wurde untersucht, ob die Transfektion und die darauffolgende Expression der verschiedenen Konstrukte das Zellüberleben beeinflussten. Dies war vor allem wichtig, um auszuschließen, dass eine eventuell verminderte Zellzahl in den Wunden im Scratch-Assay durch Zelltod zustande kam.⁽²⁷⁾

Wie in Abbildung 3.5.1B gezeigt, konnte durch eine Trypanblaufärbung kein Einfluss der Transfektion auf das Zellüberleben detektiert werden, da sämtliche transfizierte Proben sich nicht signifikant von der nicht-transfizierten Kontrolle unterschieden. Um das Ergebnis des Trypanblau-Assays zu bestätigen, wurden dann Zellen, welche ARNO WT, EK (E156K) und RD (R280D) exprimieren, mit Propidiumiodid gefärbt. Dabei war die Anzahl der Propidiumiodid-positiven Zellen in der positiven Kontrollgruppe (lysierte Zellen) ungefähr bei 90%, während weniger als 10% der transfizierten Zellen eine positive Propidiumiodid-Färbung aufzeigten (Abbildung 3.5.1C).⁽²⁷⁾

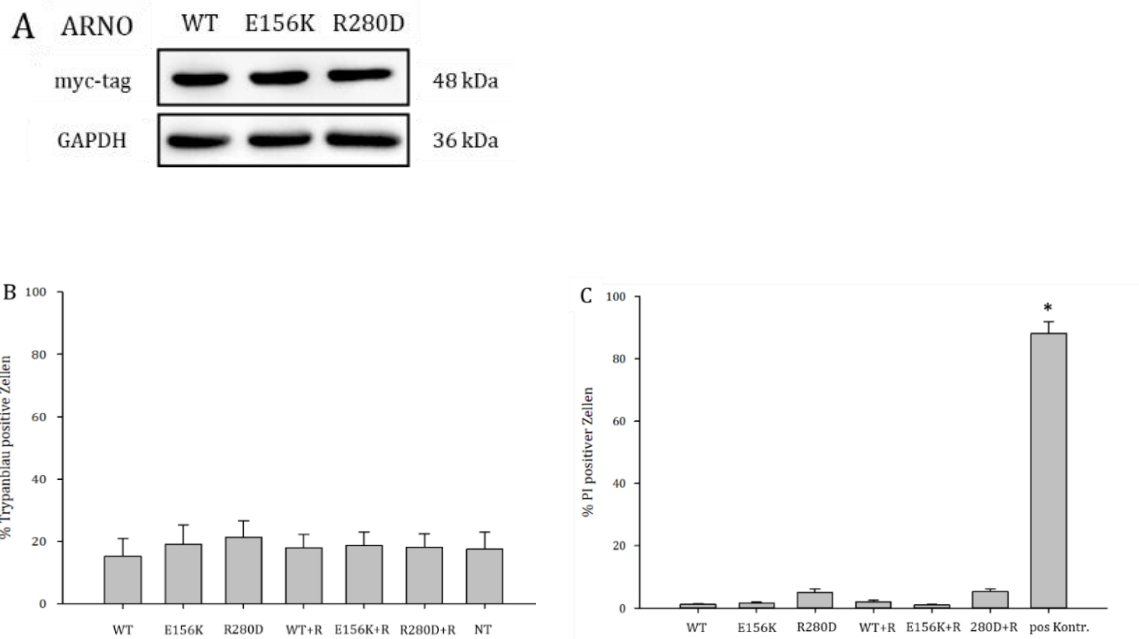


Abbildung 3.5.1

Abbildung 3.5.1: Transfektion mit ARNO-Mutanten und Wildtyp beeinflusst nicht das Zellüberleben

A) Nachweis der Expression von ARNO WT, ARNO E156K und ARNO R280D in VGMZ mittels Detektion des Myc-tags, das als Fusionsprotein mit ARNO exprimiert wird. GAPDH wurde als house-keeping protein detektiert.

B) Die Zellviabilität nach Transfektion mit ARNO WT, ARNO E156K und ARNO R280D wurde mittels Trypanblaufärbung (n=5 in Triplikaten) untersucht. R: Resistin 100 ng/ml; NT: Nicht transfizierte Zellen.

C) Die Zellviabilität wurde weiter durch Propidiumiodidfärbung (PI) und anschließender FACS-Messung ermittelt (n=2 mit je 10.000 Zellen). Als Positivkontrolle wurden Zellen verwendet, die vor der Färbung mit Triton X-100 lysiert wurden. R: Resistin 100 ng/ml (*p<0.05 im Vergleich zu den transfizierten Zellen).

Quelle: Daten in A), B) und C) sind aus der zum Teil aus dieser Arbeit entstandenen Publikation (Heun et al., 2020), wurden für diese Arbeit ins Deutsche übersetzt und graphisch angepasst.⁽²⁷⁾

3.6 ARNO Inaktivierung hemmt die resistininduzierte VGMZ-Migration

Um nun den Einfluss von SecinH3 auf VGMZ-Migration zu bestätigen, wurden die VGMZ mit den unterschiedlichen ARNO Konstrukten transfiziert. Wie in Abbildung 3.6.1A und B zu sehen ist, steigerte Resistin die Zellmigration in ARNO WT exprimierenden VGMZ im Vergleich zu unstimulierten WT-Zellen. Dagegen wurde die Migration von VGMZ, die ARNO E156K exprimierten, unter Resistin-Stimulation verhindert. Die Expression von ARNO R280D reduzierte ebenso stark die resistinvermittelte Migration. Die Expression von ARNO R280D reduzierte darüber hinaus auch die basale Migration.⁽²⁷⁾

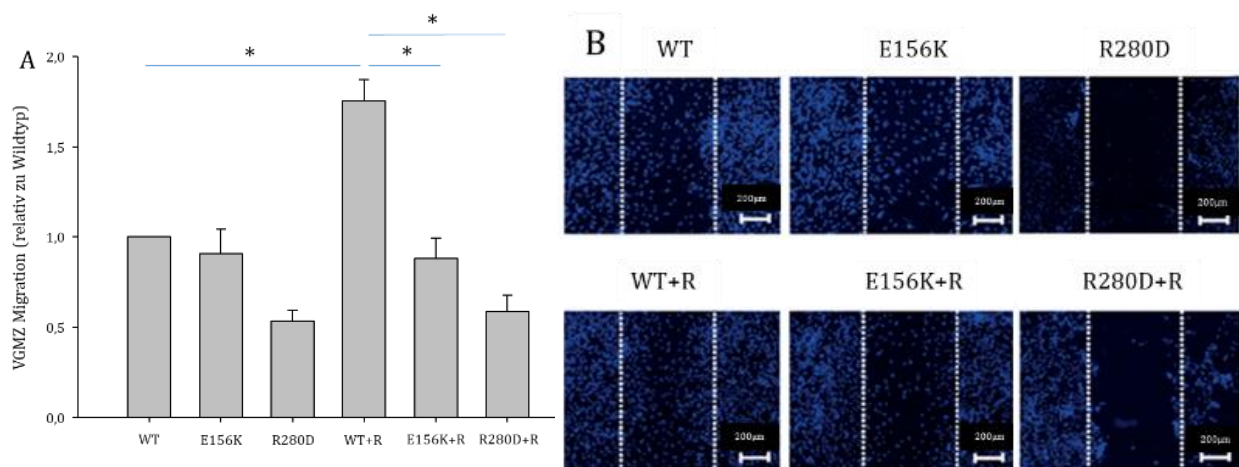


Abbildung 3.6.1

Abbildung 3.6.1: Die ARNO GEF-Aktivität und die PH-Domäne beeinflussen die resistinvermittelte VGMZ-Migration

A) Resistinvermittelte (R; 100 ng/ml) VGMZ-Migration von ARNO E156K (inaktive GEF) und R280D (Mutation in PH-Domäne) im Vergleich zu ARNO WT exprimierenden Zellen nach 16 h (* $p < 0.05$; $n = 5-6$ in Triplikaten).

B) Exemplarische Aufnahmen (2,5x Objektiv) der VGMZ eines Scratch-Assays. Weiß gestrichelte Linien zeigen die Ränder des Scratches bei Zeitpunkt 0.

Quelle: Daten und Fotos sind aus der zum Teil aus dieser Arbeit entstandenen Publikation (Heun et al., 2020), wurden für diese Arbeit ins Deutsche übersetzt und graphisch angepasst.⁽²⁷⁾

3.7 PI3K/AKT und p38 MAPK medieren resistinabhängige VGMZ-Migration

Da die Expression von ARNO R280D, welches nicht mehr an PIP₃ Moleküle binden kann, die VGMZ-Migration reduzierte, und da PIP₃ bekannterweise ein Produkt der PI3K ist, die einen starken Einfluss auf VGMZ-Migration hat⁽¹⁹⁴⁾, wurde als nächstes untersucht, ob der PI3K Signalweg die Migration von VGMZ beeinflusst. Die Inkubation mit dem PI3K Inhibitor LY294002 reduzierte signifikant die resistinvermittelte Migration. Ferner war die VGMZ-Migration vermindert, wenn Zellen mit einem Inhibitor des PI3K nachgeschalteten Proteins AKT behandelt wurden (Abbildung 3.7.1). Der p38 MAPK Signalweg ist ebenfalls wichtig für die VGMZ-Migration.⁽¹⁹⁵⁾ Deshalb wurde als Nächstes untersucht, ob sich in unseren Versuchen dieser Zusammenhang bestätigen ließ. Die Behandlung mit einem p38 MAPK Inhibitor reduzierte signifikant die resistinvermittelte VGMZ-Migration (Abbildung 3.7.1).⁽²⁷⁾

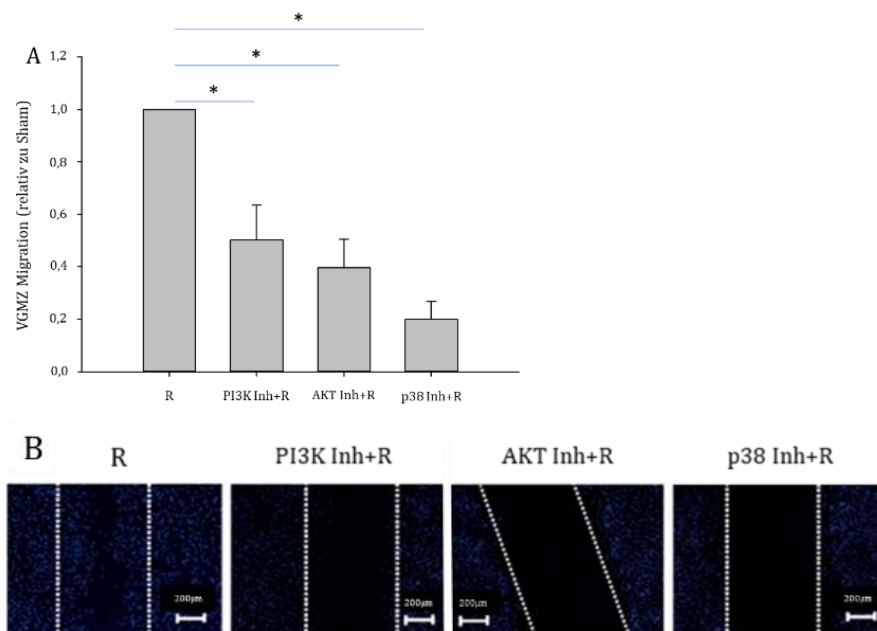


Abbildung 3.7.1

Abbildung 3.7.1: Inhibitoren der PI3K/Akt, sowie p38 MAPK Signalwegen senken die Resistin-Stimulierte Migration

A) VGMZ-Migration unter Resistin Stimulation (R; 100 ng/ml), sowie Zugabe eines PI3K Inhibitors (10 µM LY294002), wie auch die eines AKT- (10 µM AKT Inhibitor) und p38 MAPK (10 µM SB203580) Inhibitors (*p<0,05; n=4 in Duplikaten).

B) Exemplarische Aufnahmen (2,5x Objektiv) des Scratch-Assays nach 16 h. Weiß gestrichelte Linien zeigen die Ränder des Scratches bei Zeitpunkt 0.

Quelle: Daten und Fotos sind aus der zum Teil aus dieser Arbeit entstandenen Publikation (Heun et al., 2020), wurden für diese Arbeit ins Deutsche übersetzt und graphisch angepasst.⁽²⁷⁾

3.8 ARNO steigert die Migration der VGMZ durch die Expression von Matrix-Metalloproteinase-2

In der Zellmigration spielen Matrixmetalloproteasen (MMP) durch ihre Eigenschaft als Peptidasen eine bedeutende Rolle in der Zersetzung der EZM.⁽¹⁹⁶⁾ Dedifferenzierte VGMZ exprimieren vermehrt MMP, insbesondere MMP-2 und -9^(197, 198). Eine erhöhte Produktion lässt daher auf den phänotypischen „switch“ der VGMZ schließen.

Da wir einen Einfluss von ARNO auf die Migration feststellen konnten, wollten wir als Nächstes untersuchen, ob ARNO dies durch einen Einfluss auf die MMP-Produktion verursacht. Aus diesem Grund wurde die MMP-2 mRNA Expression mittels qRT-PCR detektiert.

Eine Resistin-Stimulation induzierte die Expression von MMP-2 in VGMZ (Abbildung 3.8.1A). Dies wurde aber durch Applikation von SecinH3 verhindert.⁽²⁷⁾ Als Nächstes wurde die MMP-2 Produktion in Zellen, die ARNO WT, E156K oder R280D exprimierten, untersucht. Die Expression von E156K ohne GEF-Aktivität reduzierte signifikant die resistinvermittelte MMP-2 mRNA Expression (Abbildung 3.8.1B). Ebenso war die MMP-2 Produktion nach Expression von R280D mit einer Mutation in der phosphatidylinositolbindenden PH-Domäne vermindert (Abbildung 3.8.1B).⁽²⁷⁾

Da bereits bekannt ist, dass p38 MAPK die MMP-2 Expression induziert und wir beobachten konnten, dass p38 MAPK die Migration ebenso beeinflusst, untersuchten wir anschließend, ob Resistin in VGMZ die MMP-2 Produktion durch den Einfluss von p38 induziert. Hierfür wurde die p38 MAPK pharmakologisch gehemmt. Wie in Abbildung 3.8.1C zu sehen ist, konnte die resistinvermittelte MMP-2 Expression durch die Applikation von einem p38 MAPK Inhibitor (SB203580) signifikant reduziert werden.⁽²⁷⁾

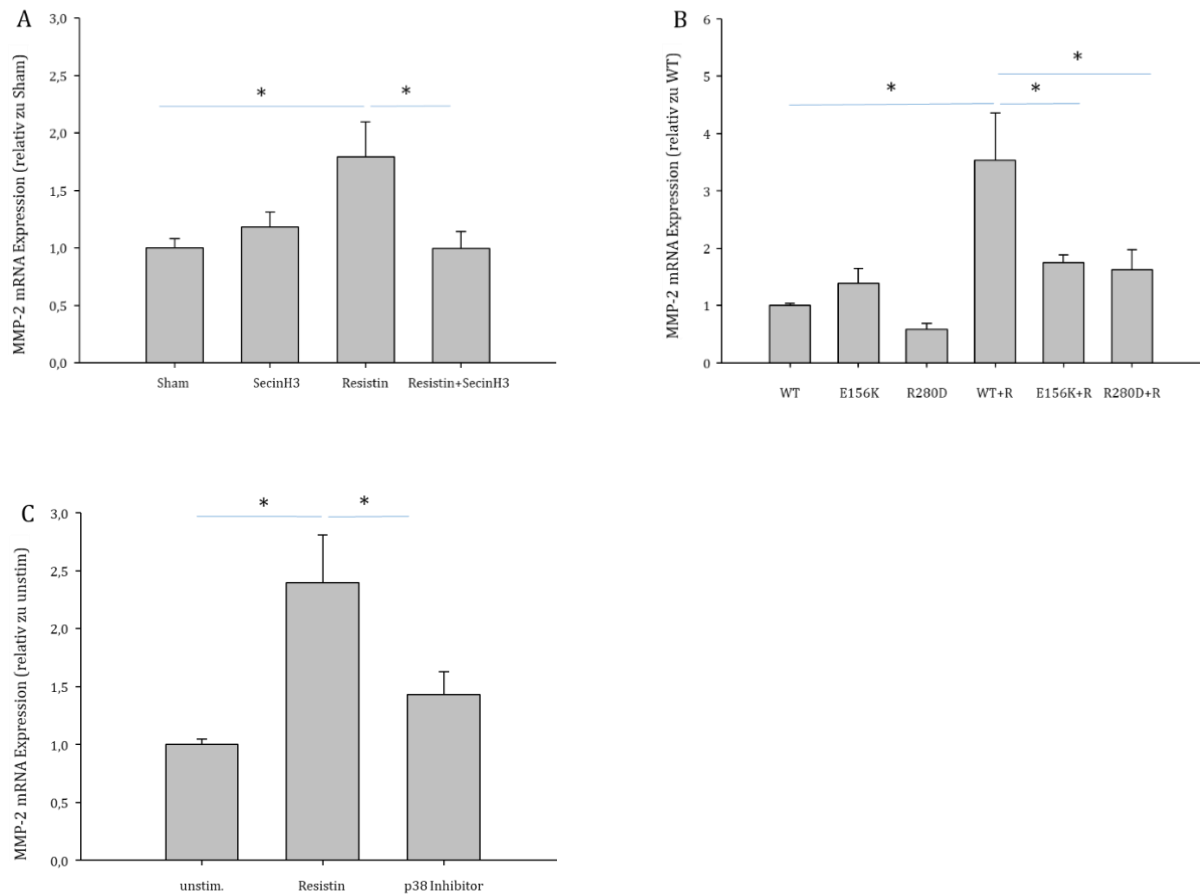


Abbildung 3.8.1

Abbildung 3.8.1: Resistin steigert die MMP-2 mRNA-Expression via ARNO und p38 MAPK

A) Die MMP-2 mRNA-Expression unter Resistin-Stimulation (100 ng/ml) und unter Einfluss eines ARNO Hemmers (SecinH3; 15 μ M), im Vergleich zu Sham (DMSO v/v) wurde mittels qRT-PCR detektiert (* $p < 0.05$; $n = 6-11$ Versuche in Duplikaten).

B) MMP-2 mRNA-Expression in ARNO WT, ARNO E156K oder ARNO R280D exprimierenden VGMZ unter Resistin-Stimulation (100 ng/ml) (* $p < 0.05$; $n = 3$).

C) MMP-2 mRNA-Expression unter Resistin-Stimulation (100 ng/ml) und Zugabe eines p38 MAPK-Inhibitors (SB 203580; 10 μ M) im Vergleich zu unbehandelter Probe (DMSO v/v) (* $p < 0,05$; $n = 10$).

Quelle: Daten in A), B) und C) sind aus der zum Teil aus dieser Arbeit entstandenen Publikation (Heun et al., 2020), wurden für diese Arbeit ins Deutsche übersetzt und graphisch angepasst.⁽²⁷⁾

3.9 ARNO beeinflusst die Aktivierung des PI3K/AKT und p38 MAPK Signalwegs

Da nun herausgefunden wurde, dass ARNO in VGMZ sowohl einen Einfluss auf die Zellmigration hat als auch eine Erhöhung der MMP-2 Produktion bewirkt und dass die p38 MAPK ebenso für die MMP-2 Produktion und die VGMZ-Migration wichtig ist, wurde nun untersucht, ob ARNO den p38 MAPK Signalweg beeinflusst. Da ebenso festgestellt werden konnte, dass eine Mutation in der Phosphatidylinositol bindenden PH-Domäne von ARNO (ARNO R280D) die Migration und MMP-2 Produktion verhinderte, wurde der Einfluss von ARNO auf den PI3K/AKT Signalweg untersucht. Die Aktivierung der Signalproteine wurde anhand der Detektion von aktivierenden Phosphorylierungen mittels Western Blotting ermittelt.

Wie in Abbildung 3.9.1 zu sehen ist, wurde die p38 MAPK in ARNO WT Zellen durch eine Resistin-Stimulation phosphoryliert. Im Gegensatz dazu war keine Phosphorylierung und damit Aktivierung von p38 MAPK in ARNO E156K und R280D exprimierenden Zellen nach Resistin-Stimulation zu sehen.⁽²⁷⁾ Die Phosphorylierung der PI3K nachgelagerten Kinase AKT wurde durch eine Stimulation mit Resistin verstärkt (Abb 3.9.2). Eine verminderte AKT-Phosphorylierung unter Resistin-Behandlung konnte nur nach einer Mutation in der Phosphatidylinositol-bindenden PH-Domäne (R280D) beobachtet werden. Die ausbleibende GEF-Aktivität (E156K) schien hier nur tendenziell (nicht signifikant) einen Einfluss zu haben.

Da auch die MAPK ERK1/2 wichtig für VGMZ-Migration ist ⁽¹⁹⁹⁾, wurde als Letztes die Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK1/2 untersucht. Obwohl Resistin die ERK1/2-Phosphorylierung signifikant erhöhte, konnte kein Einfluss von ARNO E156K oder R280D auf die ERK1/2-Aktivierung im Vergleich zum WT beobachtet werden (Abbildung 3.9.3).

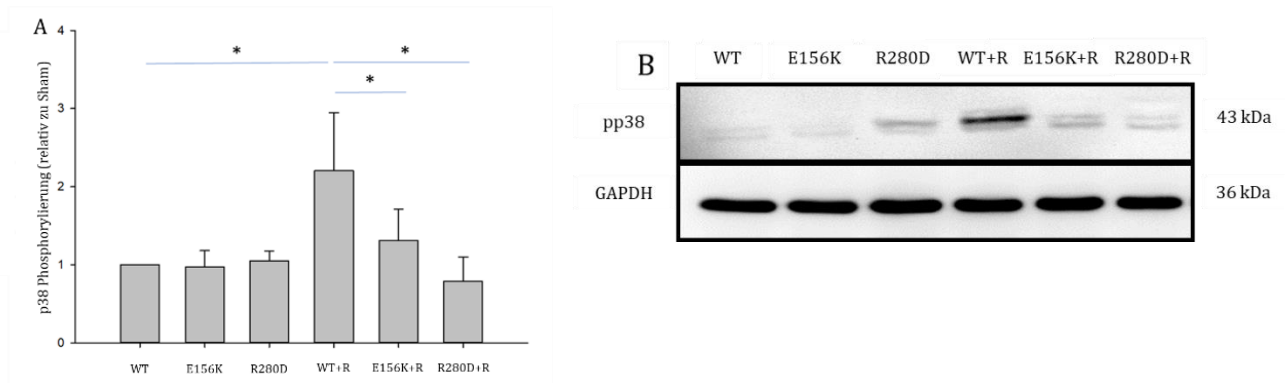


Abbildung 3.9.1

Abbildung 3.9.1: Resistin führt via ARNO zur signifikanten Steigerung der p38 Phosphorylierung

A) Die resistinabhängige (R; 100 ng/ml) p38 MAPK Phosphorylierung in ARNO WT und mit Mutanten transfizierten (E156K und R280D) VGMZ wurde mittels Western Blot nachgewiesen (* $p < 0,05$; $n = 7$).

B) Exemplarische Aufnahme eines Western Blots zum phosphorylierten p38 MAPK und GAPDH zur Kontrolle (house-keeping protein).

Quelle: Daten und Aufnahmen sind aus der zum Teil aus dieser Arbeit entstandenen Publikation (Heun et al., 2020), wurden für diese Arbeit ins Deutsche übersetzt und graphisch angepasst.⁽²⁷⁾

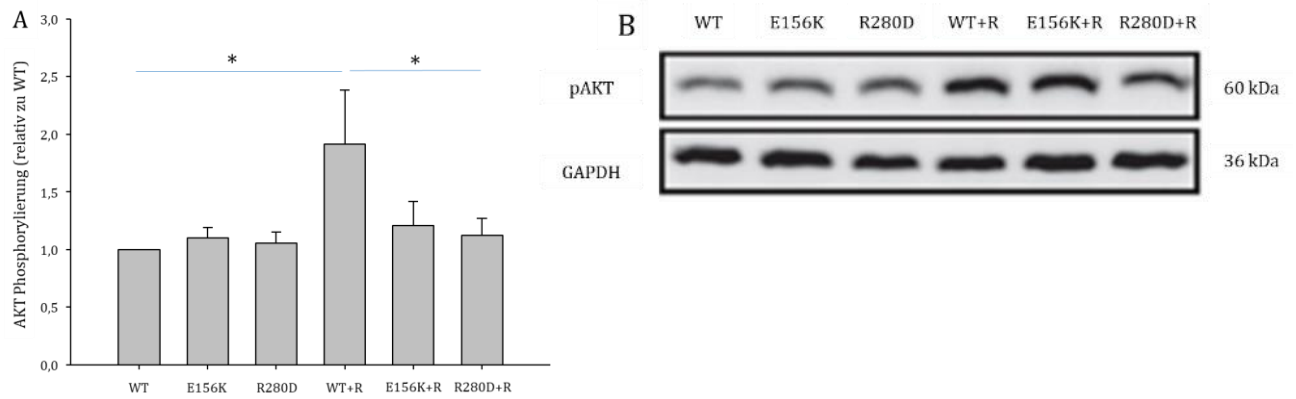


Abbildung 3.9.2

Abbildung 3.9.2: Resistin induziert AKT-Phosphorylierung via ARNO

A) Die resistinvermittelte (R; 100 ng/ml) AKT Phosphorylierung (pAKT) in VGMZ, die ARNO WT, ARNO E156K oder ARNO R280D exprimieren, wurde mittels Western Blot untersucht (* $p < 0,05$; $n = 6$).

B) Beispiel eines Western Blots mit Detektion von AKT Phosphorylierung. GAPDH wurde detektiert, um das gleichmäßige Auftragen von Proteinmengen zu überprüfen.

Quellen: Eigene Abbildungen

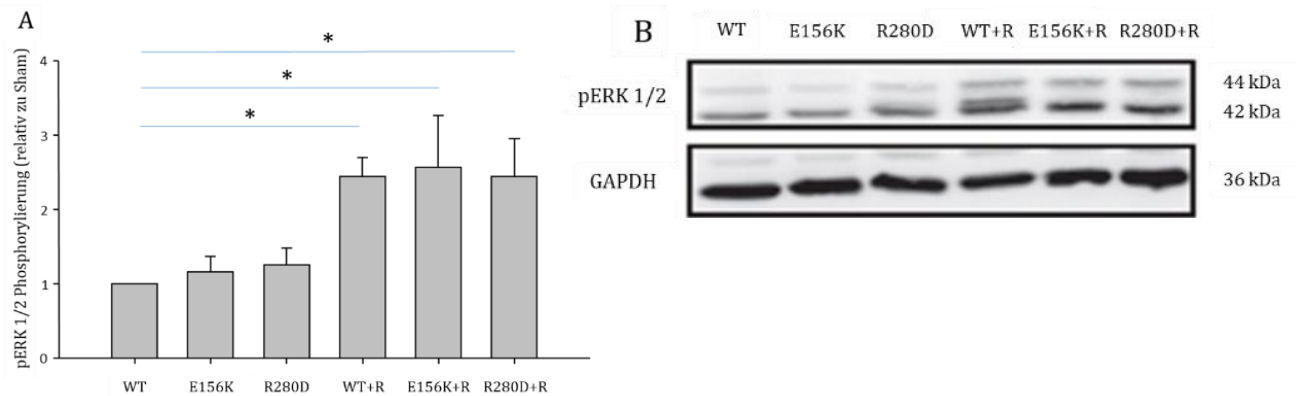


Abbildung 3.9.3

Abbildung 3.9.3: Resistinvermittelte ERK1/2 Phosphorylierung geschieht unabhängig von ARNO

A) ERK 1/2 Phosphorylierung (pERK1/2) in VGMZ nach Expression von ARNO WT, ARNO E156K und ARNO R280D unter Stimulation mit Resistin (R; 100 ng/ml) (* $p < 0,05$; $n = 4$).

B) Exemplarische Aufnahme eines Western Blots nach Detektion von pERK1/2 (p44 und p42). GAPDH wurde detektiert, um das gleichmäßige Auftragen von Proteinmengen zu überprüfen.

Quelle: Eigene Abbildungen

4. Diskussion

Ein wichtiger Bestandteil der Entstehung einer Atherosklerose ist der phänotypische Switch der VGMZ, welche durch Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Adipokinen ihren differenzierten Phänotyp in einen dedifferenzierten (proliferativen, migrierenden und synthetisierenden) Phänotyp wechseln.^(200, 201) Pathologische Zustände wie z.B. DM II oder das metabolische Syndrom sind mit einer vaskulären Dysfunktion assoziiert.⁽²⁰²⁾ Dies führt zu einem für die Patienten erhöhten Risiko, an Atherosklerose zu erkranken.⁽²⁰³⁾ Das Adipokin Resistin wurde mit der Entwicklung dieser Krankheiten in Verbindung gebracht und kann VGMZ aktivieren.^(125, 204) Die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen sowie die involvierten zellulären Bestandteile sind aber noch weitestgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden weitere Auswirkungen von Resistin auf die VGMZ Aktivierung, wie Proliferation, Migration und Adhäsion, untersucht. Des Weiteren wurde die Rolle des kleinen Guaninnukleotid-Austauschfaktors ARNO auf die resistinvermittelten Effekte in VGMZ ermittelt.

4.1 Resistin und der phänotypische Switch von VGMZ

In der aktuellen Literatur finden sich zu diesem Thema fünf Publikationen, welche einen direkten Einfluss von Resistin auf die Migrationssteigerung von VGMZ haben. Die dazu in direkter Verbindung stehende Adhäsion wurde in mehreren Publikationen beschrieben^(12, 38, 205), wobei der gemeinsame Nenner nahezu aller zuvor beschriebenen Publikationen die Bildung einer Atherosklerose ist. Insbesondere die Arbeit von Ding et al. gibt einen interessanten Ansatz, da dort bereits Hinweise auf die MMP-Produktion beschrieben wurden.⁽²⁶⁾ Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen, die ebenfalls die Steigerung der Migration, Adhäsion und MMP-Produktion, durch die oben beschriebenen Ergebnisse des Scratch- und Adhäsions-Assays sowie der qRT-PCR, zeigen konnten.

Zur Gefäßbildung und zur Regeneration der Gefäße ist der phänotypische Switch von VGMZ nötig. Er führt dazu, dass VGMZ aus ihrem ortsgebundenen, kontraktile Zustand in einen zur Proliferation und Migration befähigten Zustand geändert werden. Dies kann auch durch Entzündungsreaktionen gefördert werden, welche eine wichtige Grundvoraussetzung für die Entstehung einer Atherosklerose sind.⁽¹⁰⁾ Der Einfluss von Resistin auf Zellmigration und -Proliferation über verschiedene intrazelluläre

Signalwege ist für einige Zelltypen (Porzine folliculäre Ovarialzellen⁽²⁰⁶⁾, Prostatakrebszellen⁽²⁰⁷⁾, Mesangiumzellen⁽²⁰⁸⁾, Magentumorzellen (Human Stomach Adenocarcinoma cell line AGS)⁽²⁰⁹⁾, Hepatische Sternzellen⁽²¹⁰⁾) bereits bekannt. Die Proliferation von VGMZ konnte aber in dieser Arbeit durch Resistin nicht weiter gesteigert werden. Dabei wurden in weiteren Arbeiten zuvor schon Versuche mit Resistin in ansteigender Dosierung durchgeführt. Darunter zum Beispiel von Calabro et al. im Jahr 2004.⁽²⁵⁾ Diese zeigten, dass eine gesteigerte Dosierung (10 ng/ml bis 100 ng/ml) des Resistin in Humanen Aorten Gefäßmuskelzellen (HASMC) zu einer gesteigerten Proliferation führten. Ebenso fanden Messini et al. einen Effekt für steigende Resistin-Dosierungen.⁽²¹¹⁾ Auch wenn es sich bei dieser Arbeit um die Sekretion von Hormonen des weiblichen Reproduktionszyklus handelt, ist hier die Kernaussage eine ähnliche wie bei Calabro: Unter steigender Dosierung kommt es zu einer Steigerung der untersuchten Proliferation. Beide verwendeten als Maximalkonzentration 100 ng/ml, wie auch in unseren Versuchen. Die hier ausbleibende Proliferationssteigerung anhand der MTT-Assays kann damit nicht aufgrund einer paradoxen Reaktion der hohen Konzentration angenommen werden. Gründe hierfür könnten am Ursprung der Zellen liegen, sowie am Resistin. So benutzten Calabro et al.⁽²⁵⁾ HASMC, human aortic smooth muscle cells (humane VGMZ), und humanes Resistin, während wir porcine VGMZ verwendeten in Kombination mit humanem Resistin. Es wäre möglich, dass humanes Resistin potenter auf humane Zellen als auf porcine Zellen wirkt. Des Weiteren haben Calabro et al.⁽²⁵⁾ die Proliferation ohne eine Beschichtung des Untergrundes gemessen im Gegensatz zu unseren Versuchen, bei denen die Zellen auf Kollagen ausgesät wurden. Es ist vorstellbar, dass eine Beschichtung mit Matrixproteinen allein die Proliferation der VGMZ verbesserte, sodass keine weitere Steigerung durch Resistin vorkommt. Ferner wurde in der Publikation von Wang et al.⁽⁷⁶⁾ und Calabro et al.⁽²⁵⁾ die Proliferation nicht durch MTT gemessen, sondern mittels der Salze WST-1⁽²⁵⁾ und WST-8⁽⁷⁶⁾, die aber in Formazanfarbstoffe umgesetzt werden, was eine ähnliche Reaktion wie MTT darstellt. Obwohl der MTT Assay eigentlich die metabolische Aktivität misst, wird er in mehreren Studien zur indirekten Untersuchung der Zellproliferation verwendet.⁽²¹²⁻²¹⁴⁾ Neben den HASMC gab es bisher nur Erkenntnisse für Adipozyten bezüglich der resistinvermittelten Proliferation.^(215, 216)

Aufgrund der zuvor genannten Versuche mit einer Resistin-Dosierung von 100 ng/ml führten wir unsere Versuche mit dieser Dosierung durch, da damit ein möglichst

pathologischer Wert imitiert werden sollte. So konnten Meng et al. bereits im Jahr 2017 nachweisen, dass sich hohe Resistinwerte im Serum zwischen 10 und 20 ng/ml befinden, jedoch sind auch Messwerte von knapp unter 100 ng/ml zu messen gewesen.⁽²¹⁷⁾ Ebenso kann man annehmen, dass lokale Konzentrationen von Resistin deutlich höher sein können als die im Serum gemessenen Werte.^(218, 219) Da Resistin-Konzentrationen im Menschen jedoch nur über eine Blutentnahme zu messen sind, gestaltet es sich schwierig die lokal erhöhten Konzentrationen nachzuweisen, da es exakt an der Stelle des erhöhten Vorkommens abgenommen werden müsste. Durch die systemische Verteilung des Resistin im Blutkreislauf wird der lokal erhöhte Wert dadurch verdünnt.

Die gesteigerte Proliferation durch eine Beschichtung mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix, spricht indirekt für eine verbesserte Adhäsion der Zellen am Untergrund. Dies wurde durch unsere Adhäsionsversuche bestätigt, bei denen eine Resistin-Stimulation zu einer schnelleren Adhäsion von VGMZ an der Matrix führte.

Ferner konnten wir zeigen, dass Resistin die MMP-2 Expression erhöht. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Ding et al.⁽²⁶⁾, die aber zusätzlich zeigen konnten, dass auch die MMP-9 Produktion in VGMZ von Resistin induziert wird. Dadurch wird die Migration von VGMZ ebenfalls gefördert.⁽²⁶⁾ Unsere Ergebnisse bestätigen somit die positive Rolle von Resistin in der VGMZ-Migration und im phänotypischen Switch von VGMZ.⁽²⁷⁾

4.2 ARNO und die resistinvermittelte Proliferation, Migration, MMP-2 Expression und Adhäsion

Für Zellen ist die Adhäsion von größter Wichtigkeit. Sie sorgt für den Halt der Zellen am Untergrund und an den umgebenden Zellen⁽²²⁰⁾. Dabei ist die Schlüsselrolle der Cytohesine und insbesondere des ARNO mittlerweile für viele Zellreihen untersucht und anerkannt. In diesen Fällen wurde ebenso eine Inhibition mit SecinH3 durchgeführt, welches in einer verminderten Adhäsion resultierte.^(170, 221)

Ähnlich verhält es sich mit der Migration. Diese wurde ebenfalls mit der Inhibition durch SecinH3 untersucht.⁽²²¹⁻²²³⁾ Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen ARNO und dem Aktinremodelling, welches für die Zellmigration bedeutend ist, gefunden.^(224, 225) Für ARNO ist bereits bekannt, dass es über die Aktivierung von R-Ras die Migration steigert. Ebenso konnte eine Verbindung zwischen ARNO und R-Ras beim Integrin-Recycling festgestellt werden.⁽¹⁵⁴⁾ Bezüglich der Migration in VGMZ in Verbindung mit ARNO wurde

bisher keine direkte Verbindung zu den GTPasen hergestellt. Ferner gibt es Hinweise, dass ARNO die Migration von diversen Zellen und Zusammenhängen zu steuern vermag. So unter anderem für Präadipozyten^(221, 222), Epithelzellen⁽²²⁶⁾, colorektale Tumorzellen^(227, 228) und Madin-Darby Nierenzellen vom Hund^(229, 230). Dabei wurden jedoch diverse Zusammenhänge gefunden, ohne einen gemeinsamen Nenner bezüglich der Signalkaskaden zu finden. GTPasen wie ARF-1⁽²²⁹⁾, Rac1⁽²³⁰⁾ und Rezeptoren wie EGFR und IGF-1⁽²²⁷⁾ wurden in diesem Zusammenhang beschrieben. Daher setzten wir in dieser Arbeit an der p38 Signalkaskade an, da für diese bereits bekannt ist, dass in VGMZ eine Migrationssteigerung und eine Hochregulation der MMP-Produktion induziert wird.⁽²³¹⁾

Für VGMZ gab es bisher jedoch noch keinen Hinweis auf die Beteiligung von ARNO an resistininduzierter Adhäsion und Migration. Dies konnte schon im frühen Stadium dieser Arbeit bewiesen werden. Dabei wurden im Scratch-, wie auch im Adhäsions-Assay Versuchsreihen mit Resistin und SecinH3 durchgeführt. Dort konnte durch Cytohesinhemmung erstens eine deutliche Verschlechterung der Bindung an den Untergrund festgestellt werden, sowie eine Verminderung der Migration. Des Weiteren wurden diese Ergebnisse durch Überexpression von ARNO E156K (inaktive GEF-Funktion) bestätigt. Somit ist einerseits der Einfluss von ARNO auf die VGMZ und andererseits der Einfluss von Resistin auf ebendiese bewiesen.⁽²⁷⁾

Darüber hinaus konnte der Einfluss von ARNO auf die Hochregulation der MMP-2 gezeigt werden.⁽²⁷⁾ Diese ist ein wichtiger Faktor für den Abbau der extrazellulären Matrix⁽²³²⁾ und wirkt sich als zusätzlich begünstigender Faktor für eine Migrationssteigerung aus, da sie für die Zellwanderung den Weg durch ein Freiräumen der Umgebung ebnet. Ferner ist MMP-2 erwiesenermaßen auch an pathologischen kardiovaskulären Vorgängen, wie zum Beispiel einem Herzinfarkt, beteiligt ^(233, 234). Durch die hier bewiesene vermehrte Ausscheidung der MMP-2 durch die Beteiligung von ARNO ist ein weiterer wichtiger, an der Zellmigration beteiligter Faktor vorhanden, der die initiale Hypothese weiter festigt.⁽²⁷⁾

Interessanterweise konnten wir in dieser Arbeit einen Einfluss von PI3K auf ARNO Signalling beobachten, da die VGMZ-Migration und die MMP-2 Expression durch Überexpression von ARNO R280D, ein ARNO Konstrukt mit einer Mutation in der PH-Domäne, gehemmt wurde. Dies deutet darauf hin, dass PI3K, durch die Generierung von PIP₃, eine Rolle für die Funktion von ARNO spielt.⁽²⁷⁾ Lee et al. wie auch Davies et al. haben

beide bereits im Jahr 2014 die Rolle von PI3K in der ARNO vermittelten Migration beschrieben.^(193, 222) Durch diese beiden Publikationen sehen wir unsere Ergebnisse in VGMZ aufgrund der vergleichbaren Daten gestützt.

4.3 ARNO und resistinvermitteltes VGMZ Signalling

In zuvor angefertigten Arbeiten sind primär die spezifischen Targets (kleine GTPasen) von ARNO untersucht worden.⁽²²¹⁾

Die bekannte und durch mehrere Gruppen beschriebene Migrationssteigerung durch ARNO^(154, 222), sowie die Migrationssteigerung durch PI3K in diversen Zellreihen^(231, 235-238) lässt auch an einen Einfluss von ARNO auf die Migration in VGMZ denken. Um nun herauszufinden, wo und in welcher resistinaktivierten Signalkaskade ARNO in VGMZ wirkt, wurde der Einfluss auf migrationssteigernde Signalwege untersucht. In unseren Versuchen konnte die resistininduzierte VGMZ-Migration durch Inhibition der Kinasen PI3K, AKT und p38 MAPK gehemmt werden. Der Zusammenhang von p38 MAPK, Resistin und einer Migration wurde bisher in Tumorzellen⁽²³⁹⁾, Endothelzellen⁽²⁴⁰⁾ und sogar für VGMZ durch Wang et al. im Jahr 2021 beschrieben.⁽²⁴¹⁾ Unsere Versuche bestätigen somit die Ergebnisse der anderen Forschergruppen.⁽²⁷⁾

Interessanterweise konnten wir hier aber erstmals feststellen, dass ARNO einen Einfluss auf den p38 MAPK Signalweg, sowie den AKT Signalweg unter Resistin-Stimulation in VGMZ hat. Für die Aktivierung der beiden Signalwege schien die PH-Domäne von ARNO wichtig zu sein, da Überexpression von ARNO R280D die Phosphorylierung von p38 MAPK und AKT signifikant reduzierte. Es liegt daher nahe, daraus zu folgern, dass PI3K generierte PIP₃ für die Funktion von ARNO in der resistinvermittelten Signalweiterleitung wichtig sind.⁽²⁷⁾ Der Stellenwert von ARNO in PI3K Kaskaden ist für andere Zellen und Stimulationen bereits bekannt und durch Lee et al. im Jahr 2014 hergestellt worden. Diese konnten herausfinden, dass ARNO durch PI3K Aktivierung eine Migrationssteigerung in NIH-3T3 Zellen⁽²⁴²⁾ auslösen konnte.⁽¹⁹³⁾ Yamaoka et al. fanden heraus, dass ARNO eine Endo- und Exozytose durch die PI3K-Aktivierung begünstigt, indem sie den Clathrin-Zusammenbau fördert und damit insbesondere in der frühen Phase der Endozytose wirkt.⁽²⁴³⁾ Ebenfalls auf die Endozytose, jedoch zur Insulinwiederaufnahme, wirkt ARNO durch eine Translokation an die Plasmamembran. Dort geschieht die Produktion von PIP₃, welche die Endozytose induzieren.⁽²⁴⁴⁾ Wie zuvor schon angeführt, wurde durch Yamaoka

et al.⁽²⁴⁴⁾ die Rekrutierung von ARNO zur Membran beschrieben. Aufgrund der PH-Domäne des ARNO ist dieses in der Lage an den PIP zu binden. Durch die so gewonnene örtliche Nähe kann ARNO an seinen Targets wirken.⁽²⁴⁴⁾

Bereits bekannt ist die aktivierende Wirkung von p38 MAPK auf die MMP-2 Produktion in Endothelzellen⁽²⁴⁰⁾. Daher lag die Vermutung nahe, dass dies auch der Fall in VGMZ ist. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die resistinvermittelte MMP-2 Produktion in VGMZ abhängig von der p38 MAPK ist. Ferner konnten wir durch qRT-PCR zeigen, dass Resistin die MMP-2 Produktion in VGMZ via ARNO induziert. Schließlich konnten wir zeigen, dass ARNO die Aktivierung von p38 MAPK in VGMZ unter Resistin-Stimulation positiv beeinflusst. Zusammengefasst konnten wir also zeigen, dass ARNO durch die Aktivierung von p38 MAPK einen Einfluss auf die resistinvermittelte MMP-2 Expression in VGMZ hat.⁽²⁷⁾ Anschaulich ist dies in Abbildung 4.3.1 dargestellt.

Die MAPK ERK 1/2 hat auch eine wichtige Rolle für die Migration und Proliferation in VGMZ.⁽²⁴⁵⁾ Bisher wurde ARNO in Fettgewebszellen mit ERK 1/2 in Verbindung gebracht. Dabei wurde für Präadipozyten herausgefunden, dass ERK 1/2 durch eine Aktivierung von ARF6 phosphoryliert und dadurch aktiviert wird⁽²²²⁾. Ferner zeigten Jayaram et al. im Jahr 2012, dass ARNO über die ERK 1/2 Kaskade einen Einfluss auf die Insulinausschüttung in Ratten-Insulinom-Zellen bewirkt.⁽²⁴⁶⁾ Ob ARNO über eine ERK 1/2 Aktivierung zur Migration in VGMZ führt, ist noch unbekannt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob ARNO auf die ERK 1/2 Aktivierung einen Einfluss hat. Obwohl Resistin die ERK 1/2 Phosphorylierung induzierte, konnte kein Effekt einer Änderung der Expression von ARNO-Mutanten (ARNO E156K, ARNO R280D) beobachtet werden. Daraus schließen wir, dass die Signalweiterleitung von ARNO in VGMZ nicht über ERK 1/2 geht.

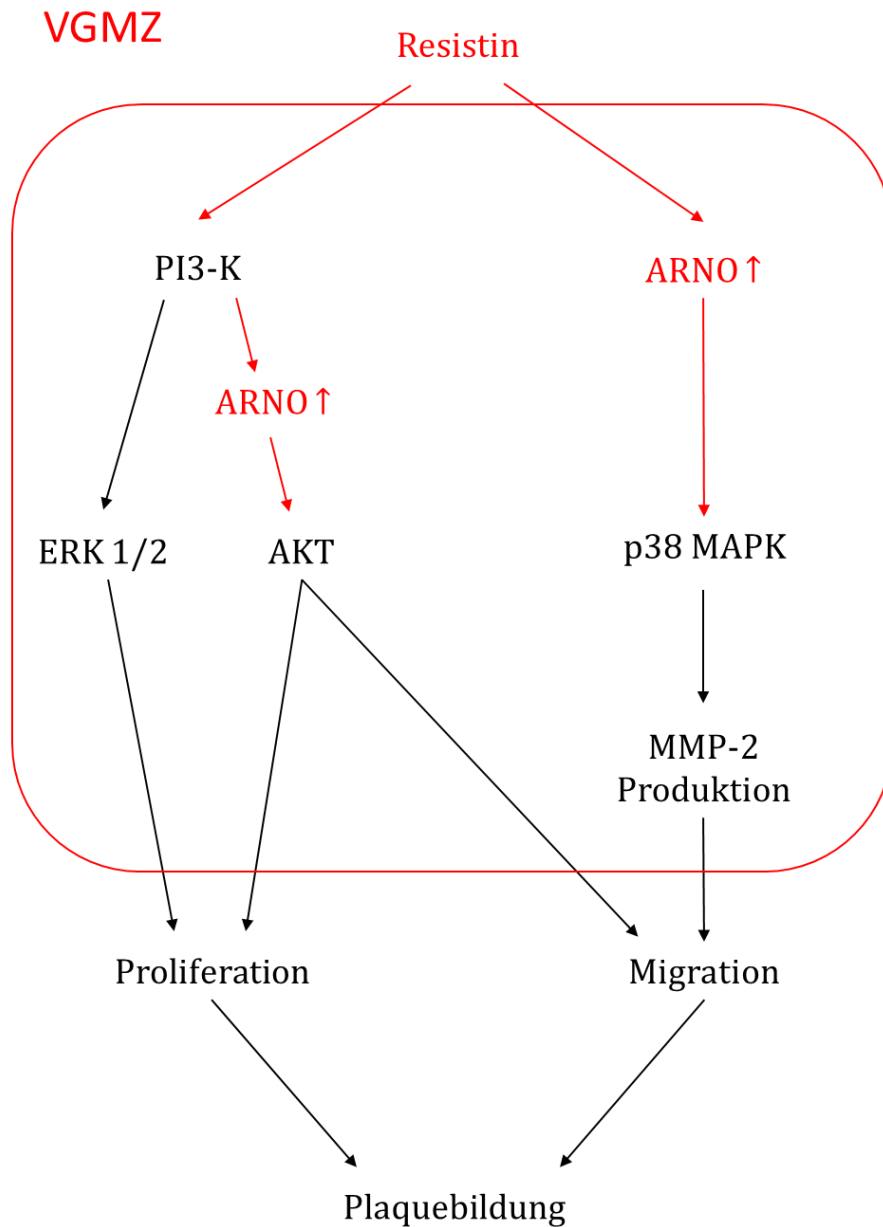


Abbildung 4.3.1

Abbildung 4.3.1: Resistinvermittelte Signalkaskaden-Aktivierung in VGMZ im Bezug auf ARNO

Die hier gezeigte Abbildung gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit herausgearbeitete Beziehung von Resistin, ARNO und den phänotypischen Switch in glatten Gefäßmuskelzellen (VGMZ). In **ROT** sind die Entdeckungen aus dieser Arbeit aufgeführt.

PI3K wird für die ARNO-Funktion benötigt (vermutlich über ihre PIP₃ Produktion). ARNO wird wiederum für eine Aktivierung von AKT benötigt und fördert damit die Migration. Eine VGMZ-Migration wird auch durch ARNO-abhängige p38 MAPK Aktivierung und darauf gefolgte MMP-2 Produktion induziert.

Quelle: Eigene Abbildung

4.4 Mögliche Effekte von Resistin auf ARNO und den atherosklerotischen Prozess

Wir konnten hier beobachten, dass Resistin die Migration von VGMZ signifikant steigert. Des Weiteren zeigten unsere Versuche, dass ARNO essenziell für die resistininduzierte VGMZ-Migration ist. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Resistin und der Atherosklerose bei Typ II Diabetikern. Für diesen konnte aber bis dato kein kausaler Zusammenhang gefunden werden⁽¹²⁷⁾. Zwar gab es immer wieder Hinweise auf eine Verbindung zwischen Beiden^(247, 248), jedoch fehlte das Bindeglied. Obwohl bekannt ist, dass die individuelle Entstehung von Atherosklerose und DM II mit einer durch Adipositas induzierten Hyperlipoproteinämie einhergeht,⁽²⁴⁹⁻²⁵²⁾ ist nicht klar, ob diese nur zufällig nebeneinander auftreten oder einen direkten Zusammenhang haben. Da aber Resistin zu einer Motilitätssteigerung bei glatten Gefäßmuskelzellen führt^(185, 253), könnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines DM Typ II, mit der assoziierten Resistinerhöhung⁽¹³³⁾, und dem Auftreten einer Atherosklerose bestehen.

Die Entstehung der Atherosklerose beginnt mit der vermehrten Zellmigration in der Schicht der Gefäßmuskelzellen. An diesem Punkt setzten auch die Versuche dieser Arbeit an.

Anhand unserer Ergebnisse können wir schlussfolgern, dass ARNO unter anderem einen eindeutigen Einfluss auf die Migration wie auch die Adhäsion in Gefäßmuskelzellen hat. Damit liegt eine mögliche Bedeutung für den Atherosklerose-Prozess nahe. Ebenfalls erwiesen wurde zuvor durch Xiang et al. die Rolle der MMP-2 in der Migration in der Frühphase⁽²⁵⁴⁾, sowie in der Destabilisierung der fibrösen Kappe in der Spätphase.^(255, 256) In einer Arbeit von Kadoglou et al. wurde MMP-9 neben MMP-2 und 3 bereits in Zusammenhang mit kardiovaskulären Ereignissen bei Diabetikern gebracht⁽²⁵⁷⁾. Verknüpft man die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen der vorliegenden, unterstreicht das den Verdacht des Einflusses von ARNO auf die Atherosklerose durch einerseits die gesteigerte Migration und MMP-2 Expression, sowie andererseits der Adhäsion der VGMZ. Diese Faktoren können zur Ausbildung und Stabilisierung einer Plaque führen.

Vor diesem Hintergrund wäre anzunehmen, dass die ARNO-Inhibition ein Ansatzpunkt zur Therapie der Atherosklerose im frühen Stadium darstellen könnte.⁽²⁷⁾ Da es sich bei unseren Versuchen jedoch ausschließlich um *in vitro* Versuche handelt, ist es angebracht zuvor weitere Untersuchungen durchzuführen. Als nächster Schritt wären damit weitere konfirmatorische Studien *in vitro*, sowie eine *in vivo* Untersuchung am Tiermodell nötig.

Letztere kann sinnvollerweise erst durchgeführt werden, nachdem erstere durchgeführt wurden, da eine stabile Studienlage vor der Anfertigung von Tierversuchen bestehen sollte.

4.5 Limitationen dieser Arbeit

Bei den untersuchten Zellen handelt es sich um Gefäßmuskelzellen aus Schweineaorten. Obwohl es sich hierbei nicht um menschliche Zellen handelt, ist von der Übertragbarkeit der Ergebnisse auszugehen, da die verwendeten Zellstämme von ihrer Funktion und ihrem Genom her sehr eng mit dem des Menschen verwandt sind und auf ähnlichen Funktionsweisen beruhen.⁽²⁵⁸⁾ Dennoch sollten die Versuche mit humanen VGMZ verifiziert werden. Ein weiterer Aspekt zur Untersuchung wäre der Einfluss der weiteren Cytohesine, da sich diese sehr ähnlich sind und ähnliche Aufgaben haben.⁽²⁵⁹⁾ In dieser Arbeit wurden keine Untersuchungen durchgeführt, um das direkte Target (GTPase) von ARNO zu finden. Dies wäre jedoch von Interesse. GTPasen spielen eine wichtige Rolle in der Migration in VGMZ^(205, 260, 261). Ebenso wurde die Rolle der GEF-Aktivität von ARNO nicht direkt durch eine Detektion des GDP/GTP Austausches gemessen, sondern durch Verwendung eines ARNO Konstruktes mit einer Mutation in der GEF-Domäne. Obwohl dies eine valide Aussage über den Einfluss von ARNO GEF-Aktivität auf die untersuchten Prozesse gibt, kann keine Aussage über die tatsächliche Intensität der Aktivität gemacht werden. Für weitere Arbeiten wäre es dementsprechend interessant, die ARNO GEF-Aktivität (GDP/GTP Austausch) unter Resistin-Stimulation zu messen, auch im Vergleich zu schon für ARNO bekannten Stimulantien, wie zum Beispiel dem Hormon Insulin. Eingeschränkt werden die Annahmen, welche auf unseren Ergebnissen beruhen, durch den fehlenden Nachweis *in vivo*. In einem Lebewesen könnte es zu einer anderen Antwort, aufgrund der zunehmenden Komplexität der Abläufe, kommen. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, eine definitive klinische Relevanz dieser Ergebnisse einzuschätzen. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine Knockout (KO)-Mäuse für ARNO. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit der Untersuchung an einer ARNO KO-Maus wäre der erste Schritt, die Untersuchung von Diabetesmäusen durchzuführen, welchen mit einer hochkalorischen Nahrung ein DM II mit Insulinresistenz entwickeln⁽²⁶²⁾. Unter der Applikation von SecinH3 könnte der Einfluss von ARNO auf die Entwicklung einer Atherosklerose im Vergleich zu nicht behandelten Mäusen untersucht werden. Ein

weiterer Ansatzpunkt wäre die Untersuchung in Apolipoprotein (APO)E-KO Mäusen. Für diese ist bekannt, dass sie vermehrt Atherosklerose entwickeln.⁽²⁶³⁾ Vor diesem Hintergrund wäre es nun interessant zu testen, ob eine ARNO-Inhibition zur Reduktion der Atherosklerose führen kann.⁽²⁷⁾

4.6 Ausblick

Die hier beschriebenen Ergebnisse sind ein Grundstein zur weiteren Untersuchung der dieser Arbeit zugrundeliegenden These, dass ARNO ein wichtiges Signalprotein in der resistinabhängigen Migration und dem phänotypischen Switch der VGMZ ist.

Um einen definitiven Beweis für die Auswirkung und die Verwendbarkeit dieser Ergebnisse in Händen zu halten, sind weitere Untersuchungen nötig. Diese könnten gegebenenfalls als *in vivo* Versuche am Mausmodell durchgeführt werden. Diese Mäuse könnten, mit dem Phänotyp eines Typ 2 Diabetiker mit erhöhtem Resistinspiegel, eine gezielte ARNO-Inhibition erhalten, um letztendlich das Auftreten der Atherosklerose zu untersuchen.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung von VGMZ aus DM II Patienten sowie Patienten mit atherosklerotischen Plaques. Damit könnten weitere *in vitro* Versuche durchgeführt werden, um Erkenntnisse über die veränderten Vorgänge in Zellen bereits erkrankter Patienten zu gewinnen.

Zusätzlich wäre eine prospektive Studie mit wiederholter Messung der Werte des Resistin im Blut von Diabetikern und einer Korrelation mit dem Auftreten von Atherosklerose denkbar.

Dies würde möglicherweise zeigen, ob sich daraus eine therapeutische Konsequenz ergeben kann.⁽²⁷⁾ Bei einem positiven Befund besteht die Option, dass sich daraus ein interessantes Forschungsfeld entwickelt.

5. Zusammenfassung

5.1 Abstract Deutsch

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind statistisch gesehen die weltweit führende Todesursache. In der westlichen Welt verbreitete Erkrankungen wie das metabolische Syndrom und der damit verbundene Diabetes Mellitus Typ II (DM II), werden in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung gesetzt. Ein zentraler pathologischer Prozess, der durch die kardiovaskulären Erkrankungen gefördert wird, ist die Atherosklerose. Verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel der phänotypische Switch der vaskulären glatten Muskelzellen (VGMZ), tragen zur Plaquebildung in eben diesen bei. Der phänotypische Switch, genauer gesagt die Dedifferenzierung der VGMZ, wurde als sehr wichtig für das Fortschreiten der Atherosklerose identifiziert.

Unter normalen Bedingungen sind VGMZ ausdifferenziert. In diesem Zustand haben sie einen kontraktilen Phänotyp und reihen sich an der Außenseite des Gefäßendothels auf. Durch Stimulation mittels Wachstumsfaktoren, inflammatorischen Zytokinen oder Adipokinen verändern diese VGMZ ihren Phänotyp von der ruhenden differenzierten zur proliferierenden und migrierenden Zelle. Dies führt zur Migration der VGMZ ins Gefäßinnere, wo sie zu proliferieren beginnen und damit zu einer Verdickung und im weiteren Verlauf zur Versteifung der vaskulären Wand in Form eines Plaques beitragen.

Resistin ist ein Adipokin, welches beim Menschen primär von Immunzellen sezerniert wird und an der Entstehung von Insulinresistenz und Übergewicht beteiligt ist. Darüber hinaus konnte eine Verbindung zwischen Resistin und der gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine in Endothelzellen nachgewiesen werden, wodurch Atherosklerose und eine vaskuläre Inflammation gefördert wird. Interessanterweise wurde für Resistin ebenfalls eine induzierende Wirkung auf die VGMZ-Proliferation und -Migration, sowie eine gesteigerte Produktion von Metalloproteasen (MMP) nachgewiesen. Dies sind Faktoren, welche durch die Dedifferenzierung der VGMZ begünstigt sind. Die zugrundeliegenden Mechanismen und Signalkaskaden in resistinaktivierten VGMZ sind dabei bisher noch nicht vollständig erforscht.

ARF nucleotide-binding site opener (ARNO) ist ein Guaninnukleotid Austauschfaktor, (GEF) der in der Lage ist, kleine GTPasen, wie zum Beispiel ARF6 und Rac, zu aktivieren.

Dadurch ist ARNO in der Migrationssteigerung von Epithelzellen und Präadipozyten beteiligt. Bisher war jedoch nicht bekannt, ob ARNO eine Rolle in der Dedifferenzierung der VGMZ spielt. Darüber hinaus ist nicht bekannt, inwieweit ARNO an der Migration, Adhäsion und MMP-Produktion in VGMZ beteiligt ist. Ebenso wurde das therapeutische Potential einer ARNO-Inhibition noch nicht untersucht, obwohl diverse Entdeckungen eine wichtige Rolle von ARNO in der pathologischen Migration und Gewebeinvasion in VGMZ vermuten lassen.

Aus diesem Grund zielt diese Arbeit auf die Untersuchung, ob ARNO eine resistininduzierte VGMZ Proliferation, -Adhäsion, -Migration und MMP-2 Expression *in vitro* beeinflusst, ab. Darüber hinaus wurden die zugrundeliegenden Signalkaskaden, welche hieran beteiligt sind, erforscht.

Pathologische Konzentrationen von Resistin (100 ng/ml) hatten, gemessen anhand eines MTT-Assays, keinen Einfluss auf die Proliferation von porcinen VGMZ. Eine signifikante Steigerung der Adhäsion ($p < 0,05$; $n=18$) und der Migration, gemessen durch einen Wundheilungs-Assay ($p < 0,05$; $n=5$), sowie die MMP-2 mRNA Expression ($p < 0,05$; $n=6$) konnte aber beobachtet werden. Die pharmakologische Inhibition von ARNO durch Secin H3 (15 μM) reduzierte die VGMZ-Adhäsion ($p < 0,05$; $n=18$), Migration ($p < 0,05$; $n=11$) und MMP-2 Expression ($p < 0,05$; $n=11$) signifikant. Darüber hinaus verhinderte die Expression von inaktivem ARNO (ARNO E156K), durch pDNA-Transfektion, ebenfalls signifikant die resistininduzierte VGMZ-Migration und MMP-2 Expression ($p < 0,05$; $n=3$) im Vergleich zu jenen Zellen mit ARNO Wildtyp (WT) Expression ($p < 0,05$; $n=10$). Eine Hemmung der PI3K (LY294002; 10 μM) ($p < 0,05$; $n=4$), AKT (AKT-Inhibitor; 10 μM) ($p < 0,05$; $n=4$) und p38 MAPK (SB203580; 10 μM) ($p < 0,05$; $n=4$) beeinträchtigte ebenso die VGMZ-Migration. Die Inhibition der p38 MAPK reduzierte ebenfalls die resistininduzierte MMP-2 Expression ($p < 0,05$; $n=10$).

Interessanterweise reduzierte die Expression von ARNO E156K die resistinabhängige AKT und p38 MAPK Aktivierung ($p < 0,06$; $n=6$ und $n=7$), aber nicht die Aktivierung von ERK1/2 MAPK ($n=4$) verglichen mit ARNO WT und untersucht durch Detektion der aktivierenden Phosphorylierungen mittels Western Blot.

Zuletzt wurde die Bedeutung der PI3K für die ARNO-Funktion in VGMZ durch die Expression einer ARNO Mutante (ARNO R280D) mit einer Mutation in der PH-Domäne, welche die Bindung an die PIP₃ verhindert, untersucht. Es wurde herausgefunden, dass

die VGMZ-Migration unter Resistin-Stimulation ($p < 0,05$; $n=5$) und MMP-2 Expression ($p < 0,05$; $n=10$) hierdurch verhindert wurde, indem die Aktivierung von AKT ($p < 0,05$; $n=6$) und der p38 MAPK ($p < 0,05$; $n=7$) ausblieb.

Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, dass hohe Resistin-Konzentrationen einen pathologischen Effekt auf VGMZ ausüben, indem sie die Migration und MMP-2 Expression induzieren. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der GEF ARNO eine wichtige Rolle in der resistinvermittelten Induktion der VGMZ Adhäsion, Migration und MMP-2 Expression zukommt. Als dritte große Erkenntnis konnte nachgewiesen werden, dass ARNO als intermediäres zentrales Protein Resistin mit dem AKT und dem p38 MAPK Signalweg verbindet. Dies lässt den Schluss zu, dass die resistininduzierte Funktion von ARNO stark den phänotypischen Switch der VGMZ induziert. Dies sollte als potenzielles therapeutisches Ziel der kardiovaskulären Erkrankung weiter untersucht werden.

5.2 Abstract English

Cardiovascular disease is the leading cause of death worldwide and common diseases of the western world, such as diabetes type 2 (DM II) and the metabolic syndrome, are associated with higher risk for developing cardiovascular disease. A prominent pathologic process contributing to cardiovascular disease is atherosclerosis. Several factors, such as inflammatory cytokines, inflammatory cell activation, lipid sequestration and phenotypic switching of vascular smooth muscle cells (VSMC), contribute to the formation of plaques in vessels. The phenotypic switch or dedifferentiation of VSMC have been shown to be critical for atherosclerosis progression. Under normal conditions, VSMC are differentiated thus exhibiting a contractile phenotype and line the outside of the vessels. Upon stimulation with growth factors, inflammatory cytokines or adipokines, these VSMC change their phenotype from a quiescent differentiated one to a proliferative and migratory dedifferentiated one. Thus, VSMC migrate from the vessel towards the intima where they then proliferate and contribute to a thickening and stiffening of the vascular wall (vascular plaque).

Resistin is an adipokine secreted mainly from immune cells and is involved in the development of insulin resistance and obesity. Moreover, resistin has been shown to increase pro-inflammatory cytokine production in endothelial cells thereby promoting vascular inflammation and atherosclerosis. Interestingly, resistin was repeatedly shown

to induce VSMC proliferation, migration as well as the production of metalloproteinases (MMP), supporting the dedifferentiated phenotype of VSMC. However, the underlying mechanisms or signaling intermediates in resistin induced VSMC activation have not been fully investigated.

ARNO (**ARF** nucleotide-binding site **o**pener) is a guanine nucleotide exchange factor (GEF), thus activating small GTPases, such as ARF6 and Rac. In this way ARNO has been shown to drive migration of epithelial cells and preadipocytes. However, so far, it is not known, if ARNO additionally has a part in the pathological dedifferentiation of VSMC. Specifically, the impact of ARNO for VSMC migration, adhesion and MMP production has not yet been investigated. Moreover, the therapeutic potential of an inhibition of ARNO activity for the process of pathological VSMC tissue invasion has not yet been explored. Thus, this study aimed to investigate if ARNO influences resistin induced VSMC proliferation, adhesion, migration and MMP-2 expression *in vitro*. Furthermore, the underlying involved signalling pathways were investigated.

Pathological concentrations of resistin (100ng/ml) failed to induce proliferation of porcine aortic VSMC (n=14), as assessed by MTT-assay, but significantly promoted both VSMC adhesion (p<0.05, n=18) and migration, measured by a wound healing assay, (p<0.05, n=5) as well as MMP-2 mRNA expression (p<0.05, n=6). Pharmacological inhibition of ARNO by Secin H3 (15 µM) reduced resistin induced VSMC adhesion (p<0.05, n=18), migration (p<0.05, n=11) and MMP-2 expression (p<0.05, n=11). Moreover, expression of an inactive ARNO (ARNO E156K), by pDNA transfection, significantly prevented resistin induced VSMC migration and MMP-2 expression (p<0,05; n=3) compared to expression of wildtype ARNO (ARNO WT) (p<0.05, n=10). The signalling pathways PI3K/AKT and p38 MAPK were shown to be responsible for resistin induced VSMC migration, as inhibition of these using the PI3K inhibitor LY294002 (10µM) (p<0.05, n=4), AKT-inhibitor (10µM) (p<0.05, n=4) and p38 MAPK inhibitor SB203580 (10µM) (p<0.05, n=4) impaired the VSMC migration into a scratch in the cell layer. Inhibition of the p38 MAPK was also shown to reduce the resistin induced MMP-2 expression (p<0.05, n=10). Interestingly, expression of ARNO E156K reduced the resistin dependent activation of AKT and p38 MAPK (p<0,05, n=6 and p<0,05, n=7, respectively) but not ERK1/2 MAPK (n=4) compared to ARNO WT, as assessed by detection of their phosphorylation by western blot. Finally, PI3K was shown to be important for ARNO function in VSMC, as expression of ARNO with a mutation in the PH-domain (ARNO

R280D) and no longer able to bind to PIP₃, was observed to impair VSMC migration (p<0.05, n=5) and MMP-2 expression (p<0.05, n=10) via an inability to induce activation of AKT (p<0.05, n=6) and p38 MAPK (p<0.05, n=7).

The results obtained here firstly confirm high concentrations of resistin to be pathological to VSMC by inducing migration and MMP-2 expression. Secondly, the obtained data show that the GEF ARNO plays an important role in promoting VSMC adhesion, migration and MMP-2 expression upon resistin activation. Thirdly, ARNO was shown to be a pivotal intermediate signalling protein linking resistin activation to activation of the AKT and p38 MAPK signalling pathways. In conclusion, resistin induced ARNO function strongly influences the phenotypic switch of VSMC and should be further investigated as a potential therapeutic target for cardiovascular disease.

6. Appendix

6.1 Abkürzungen

| | |
|-------------------------------|---|
| AK | Antikörper |
| AKT | Proteinkinase B |
| ANOVA | Analysis of Variance |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| c-Jun | Teil des Transkriptionsfaktor AP-1 |
| DAPI | 4'-6'-Diamidin-2-phenylindol |
| DME | Diabetische Makulaödeme |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DM II | Diabetes Mellitus Typ 2 |
| DNA | desoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure |
| ECM | extrazelluläre Matrix |
| EK | E156K (ARNO Konstrukt mit einer Mutation in der GEF-Domäne) |
| ERK 1/2 | Extracellular Signal Regulated Kinase 1&2 |
| FACS | fluorescence-activated cell sorting |
| FCS | Fetal calf serum |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| h | Stunden |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HBSS | Hank's balanced salt solution |
| HMEC | Humane mikrovaskuläre Endothelzellen |
| IF | Immunfluoreszenz |
| IKK | Inhibitor of Nuclear Factor Kappa-B Kinase |
| JNK | c-Jun N-terminal Kinase |
| MAPK | mitogen activated protein kinase |
| MeOH | Methanol |

| | |
|---------------------------|--|
| min | Minuten |
| MTT | Methylthiazoltetrazolium |
| NFκB | Nuclear Factor Kappa B |
| NOS | NO Synthase |
| p- | Phosphorylierte Gruppe (aktiviert) |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| PDGF | Platelet-Derived Growth Factor |
| PDGF-BB | Platelet-Derived Growth Factor, bestehend aus 2 B Ketten |
| PI | Propidiumiod |
| PNS | peripheres Nervensystem |
| PS | Penicillin-Streptomycin |
| R (+R) | Resistin (mit Resistin) |
| RD | R280D (ARNO Konstrukt mit einer Mutation in der PH-Domäne) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | Reaktive Oxygen species |
| RPM | Umdrehungen pro Minute (Rounds per Minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| qRT-PCR chain reaction | quantitative real-time Reverse transcription polymerase |
| s | Sekunden |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| Src | Sarcoma (Proto-oncogenic Tyrosine Kinases) |
| STAT-1 | Signal transducer and activator of transcription A |
| TEMED | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VGMZ | Vaskuläre glatte Gefäßmuskelzellen |
| WT | Wildtyp |

7. Verwendete Literatur

1. Brandes R. Makrozirkulation. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF, editors. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 223-40.
2. Schiebler TH, Korf H-W. Blutkreislauf und Herz, Lymphgefäße — Allgemeine Organisation. Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. Heidelberg: Steinkopff; 2007. p. 177-98.
3. Schubert R, Brandes R. Regulation des Gesamtkreislaufs. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF, editors. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 257-72.
4. Yiannikouris F, Gupte M, Putnam K, Cassis L. Adipokines and blood pressure control. Current opinion in nephrology and hypertension. 2010;19(2):195-200.
5. Chopra S, Baby C, Jacob JJ. Neuro-endocrine regulation of blood pressure. Indian journal of endocrinology and metabolism. 2011;15 Suppl 4(Suppl4):S281-8.
6. Zhang Y, Wang Y, Wang X, Zhang Y, Eisner GM, Asico LD, et al. Insulin promotes vascular smooth muscle cell proliferation via microRNA-208-mediated downregulation of p21. Journal of hypertension. 2011;29(8):1560-8.
7. Zhang MJ, Zhou Y, Chen L, Wang YQ, Wang X, Pi Y, et al. An overview of potential molecular mechanisms involved in VSMC phenotypic modulation. Histochemistry and cell biology. 2016;145(2):119-30.
8. Aufbau eines arteriellen Gefäßes; https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/05/Anatomy_artery.png .
9. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. Acta physiologica (Oxford, England). 2015;214(1):33-50.
10. Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. Cardiovascular research. 2012;95(2):156-64.
11. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. Circulation research. 2016;118(4):692-702.
12. Willis AI, Pierre-Paul D, Sumpio BE, Gahtan V. Vascular smooth muscle cell migration: current research and clinical implications. Vascular and endovascular surgery. 2004;38(1):11-23.
13. Zhang MJ, Zhou Y, Chen L, Wang X, Pi Y, Long CY, et al. Impaired SIRT1 promotes the migration of vascular smooth muscle cell-derived foam cells. Histochemistry and cell biology. 2016;146(1):33-43.
14. Nguyen EK, Koval OM, Noble P, Broadhurst K, Allamargot C, Wu M, et al. CaMKII (Ca²⁺)/Calmodulin-Dependent Kinase II) in Mitochondria of Smooth Muscle Cells Controls Mitochondrial Mobility, Migration, and Neointima Formation. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2018;38(6):1333-45.
15. Nandy D, Das S, Islam S, Ain R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell phenotype switching by trophoblast cells at the maternal-fetal interface. Placenta. 2020;93:64-73.
16. Zeng Z, Xia L, Fan X, Ostriker AC, Yarovinsky T, Su M, et al. Platelet-derived miR-223 promotes a phenotypic switch in arterial injury repair. The Journal of clinical investigation. 2019;129(3):1372-86.
17. Hayashi K, Shibata K, Morita T, Iwasaki K, Watanabe M, Sobue K. Insulin receptor substrate-1/SHP-2 interaction, a phenotype-dependent switching machinery of insulin-like growth factor-I signaling in vascular smooth muscle cells. The Journal of biological chemistry. 2004;279(39):40807-18.
18. Goetze S, Xi XP, Kawano Y, Kawano H, Fleck E, Hsueh WA, et al. TNF-alpha-induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent. Hypertension (Dallas, Tex : 1979). 1999;33(1 Pt 2):183-9.
19. Ichikawa T, Li J, Dong X, Potts JD, Tang DQ, Li DS, et al. Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase L1 negatively regulates TNFalpha-mediated vascular smooth muscle cell proliferation via suppressing ERK activation. Biochemical and biophysical research communications. 2010;391(1):852-6.
20. Dong X, Wu D, Zhang Y, Jia L, Pan X, Sun J, et al. Cathelicidin Modulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching through ROS/IL-6 Pathway. Antioxidants (Basel, Switzerland). 2020;9(6).

21. Lim WW, Corden B, Ng B, Vanezis K, D'Agostino G, Widjaja AA, et al. Interleukin-11 is important for vascular smooth muscle phenotypic switching and aortic inflammation, fibrosis and remodeling in mouse models. *Scientific reports*. 2020;10(1):17853.
22. Miao CY, Li ZY. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *British journal of pharmacology*. 2012;165(3):643-58.
23. Wang P, Xu TY, Guan YF, Su DF, Fan GR, Miao CY. Perivascular adipose tissue-derived visfatin is a vascular smooth muscle cell growth factor: role of nicotinamide mononucleotide. *Cardiovascular research*. 2009;81(2):370-80.
24. Trovati M, Doronzo G, Barale C, Vaccheris C, Russo I, Cavalot F. Leptin and vascular smooth muscle cells. *Current pharmaceutical design*. 2014;20(4):625-34.
25. Calabro P, Samudio I, Willerson JT, Yeh ET. Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation*. 2004;110(21):3335-40.
26. Ding Q, Chai H, Mahmood N, Tsao J, Mochly-Rosen D, Zhou W. Matrix metalloproteinases modulated by protein kinase Cepsilon mediate resistin-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells. *Journal of vascular surgery*. 2011;53(4):1044-51.
27. Heun Y, Gräff P, Lagara A, Schelhorn R, Mettler R, Pohl U, et al. The GEF Cytohesin-2/ARNO Mediates Resistin induced Phenotypic Switching in Vascular Smooth Muscle Cells. *Scientific reports*. 2020;10(1):3672.
28. Shirley Ayad RB-H, Martin J. Humphries, Karl E. Kadler, C. Adrian Shuttleworth. *The Extracellular Matrix*. 2nd edition ed. London: Academic Press; 1998.
29. Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, et al. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell*. 1986;46(2):271-82.
30. Schor SL. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro. *Journal of cell science*. 1980;41:159-75.
31. Rodriguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1803(1):39-54.
32. Kim YS, Galis ZS, Rachev A, Han HC, Vito RP. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are associated with high stresses predicted using a nonlinear heterogeneous model of arteries. *Journal of biomechanical engineering*. 2009;131(1):011009.
33. Chen F, Eriksson P, Hansson GK, Herzfeld I, Klein M, Hansson LO, et al. Expression of matrix metalloproteinase 9 and its regulators in the unstable coronary atherosclerotic plaque. *International journal of molecular medicine*. 2005;15(1):57-65.
34. Titus MA, Goodson HV. An evolutionary perspective on cell migration: Digging for the roots of amoeboid motility. *The Journal of cell biology*. 2017;216(6):1509-11.
35. Jacquemet G, Hamidi H, Ivaska J. Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. *Current opinion in cell biology*. 2015;36:23-31.
36. Fogelstrand P, Féral CC, Zargham R, Ginsberg MH. Dependence of proliferative vascular smooth muscle cells on CD98hc (4F2hc, SLC3A2). *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(11):2397-406.
37. Smith SA, Newby AC, Bond M. Ending Restenosis: Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by cAMP. *Cells*. 2019;8(11).
38. Dong X, Hu H, Fang Z, Cui J, Liu F. CTRP6 inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;103:844-50.
39. Li K, Wang Y, Zhang A, Liu B, Jia L. miR-379 Inhibits Cell Proliferation, Invasion, and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells by Targeting Insulin-Like Factor-1. *Yonsei medical journal*. 2017;58(1):234-40.

40. Selzman CH, Shames BD, Whitehill TA, Harken AH, McIntyre RC, Jr. Class II cytokine receptor ligands inhibit human vascular smooth muscle proliferation. *Surgery*. 1998;124(2):318-26; discussion 26-7.
41. Bernstein LR, Antoniadou H, Zetter BR. Migration of cultured vascular cells in response to plasma and platelet-derived factors. *Journal of cell science*. 1982;56:71-82.
42. White FC, Carroll SM, Kamps MP. VEGF mRNA is reversibly stabilized by hypoxia and persistently stabilized in VEGF-overexpressing human tumor cell lines. *Growth factors (Chur, Switzerland)*. 1995;12(4):289-301.
43. Holycross BJ, Blank RS, Thompson MM, Peach MJ, Owens GK. Platelet-derived growth factor-BB-induced suppression of smooth muscle cell differentiation. *Circulation research*. 1992;71(6):1525-32.
44. Gao W, Liu H, Yuan J, Wu C, Huang D, Ma Y, et al. Exosomes derived from mature dendritic cells increase endothelial inflammation and atherosclerosis via membrane TNF- α mediated NF- κ B pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2016;20(12):2318-27.
45. Hartman J, Frishman WH. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiology in review*. 2014;22(3):147-51.
46. Heino J. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2000;19(4):319-23.
47. Chen Z, Wu Q, Yan C, Du J. COL6A1 knockdown suppresses cell proliferation and migration in human aortic vascular smooth muscle cells. *Experimental and therapeutic medicine*. 2019;18(3):1977-84.
48. fKassem MM, Muqri F, Dacosta M, Bruch D, Gahtan V, Maier KG. Inhibition of heat shock protein 90 attenuates post-angioplasty intimal hyperplasia. *Molecular medicine reports*. 2020;21(4):1959-64.
49. Janakidevi K, Fisher MA, Del Vecchio PJ, Tirupathi C, Figge J, Malik AB. Endothelin-1 stimulates DNA synthesis and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *The American journal of physiology*. 1992;263(6 Pt 1):C1295-301.
50. Althoff TF, Offermanns S. G-protein-mediated signaling in vascular smooth muscle cells - implications for vascular disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2015;93(9):973-81.
51. Liu JF, Chen PC, Chang TM, Hou CH. Monocyte Chemoattractant Protein-1 promotes cancer cell migration via c-Raf/MAPK/AP-1 pathway and MMP-9 production in osteosarcoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2020;39(1):254.
52. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Progress in molecular biology and translational science*. 2017;147:1-73.
53. Hanna S, El-Sibai M. Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cellular signalling*. 2013;25(10):1955-61.
54. Afewerki T, Ahmed S, Warren D. Emerging regulators of vascular smooth muscle cell migration. *J Muscle Res Cell Motil*. 2019;40(2):185-96.
55. Machesky LM, Hall A. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *The Journal of cell biology*. 1997;138(4):913-26.
56. Mackay DJ, Hall A. Rho GTPases. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(33):20685-8.
57. Tang L, Dai F, Liu Y, Yu X, Huang C, Wang Y, et al. RhoA/ROCK signaling regulates smooth muscle phenotypic modulation and vascular remodeling via the JNK pathway and vimentin cytoskeleton. *Pharmacological research*. 2018;133:201-12.
58. Kiso M, Tanaka S, Saji S, Toi M, Sato F. Long isoform of VEGF stimulates cell migration of breast cancer by filopodia formation via NRP1/ARHGAP17/Cdc42 regulatory network. *International journal of cancer*. 2018;143(11):2905-18.
59. Minamino T, Yoshida T, Tateno K, Miyauchi H, Zou Y, Toko H, et al. Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis. *Circulation*. 2003;108(18):2264-9.
60. Chen YF, Tsai HY, Wu KJ, Siao LR, Wood WG. Pipoxolan ameliorates cerebral ischemia via inhibition of neuronal apoptosis and intimal hyperplasia through attenuation of VSMC migration and

modulation of matrix metalloproteinase-2/9 and Ras/MEK/ERK signaling pathways. *PloS one*. 2013;8(9):e75654.

61. Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(9):1619-33.

62. Yeung YT, Aziz F, Guerrero-Castilla A, Arguelles S. Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies. *Current pharmaceutical design*. 2018;24(14):1449-84.

63. Turner NA, Xia F, Azhar G, Zhang X, Liu L, Wei JY. Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH2-terminal kinase pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1998;30(9):1789-801.

64. Ahn NG, Seger R, Bratlien RL, Krebs EG. Growth factor-stimulated phosphorylation cascades: activation of growth factor-stimulated MAP kinase. *Ciba Foundation symposium*. 1992;164:113-26; discussion 26-31.

65. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, et al. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circulation research*. 1996;79(2):162-73.

66. Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cellular signalling*. 2001;13(11):777-85.

67. Blanc A, Pandey NR, Srivastava AK. Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease (review). *International journal of molecular medicine*. 2003;11(2):229-34.

68. Jacob T, Ascher E, Alapat D, Olevskaia Y, Hingorani A. Activation of p38MAPK signaling cascade in a VSMC injury model: role of p38MAPK inhibitors in limiting VSMC proliferation. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2005;29(5):470-8.

69. Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of receptor and signal transduction research*. 2015;35(6):600-4.

70. Cui Y, Sun YW, Lin HS, Su WM, Fang Y, Zhao Y, et al. Platelet-derived growth factor-BB induces matrix metalloproteinase-2 expression and rat vascular smooth muscle cell migration via ROCK and ERK/p38 MAPK pathways. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014;393(1-2):255-63.

71. Reustle A, Torzewski M. Role of p38 MAPK in Atherosclerosis and Aortic Valve Sclerosis. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(12).

72. Hotamisligil GS, Davis RJ. Cell Signaling and Stress Responses. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2016;8(10).

73. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2011;75(1):50-83.

74. Landry J, Huot J. Modulation of actin dynamics during stress and physiological stimulation by a signaling pathway involving p38 MAP kinase and heat-shock protein 27. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 1995;73(9-10):703-7.

75. Cobb MH, Robbins DJ, Boulton TG. ERKs, extracellular signal-regulated MAP-2 kinases. *Current opinion in cell biology*. 1991;3(6):1025-32.

76. Wang Y, Zhang X, Gao L, Li J, Chen W, Chi J, et al. Cortistatin exerts antiproliferation and antimigration effects in vascular smooth muscle cells stimulated by Ang II through suppressing ERK1/2, p38 MAPK, JNK and ERK5 signaling pathways. *Annals of translational medicine*. 2019;7(20):561.

77. Nikoloudaki G, Brooks S, Peidl AP, Tinney D, Hamilton DW. JNK Signaling as a Key Modulator of Soft Connective Tissue Physiology, Pathology, and Healing. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(3).

78. Wang CC, Gurevich I, Draznin B. Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways. *Diabetes*. 2003;52(10):2562-9.

79. Rieg AD, Suleiman S, Anker C, Verjans E, Rossaint R, Uhlig S, et al. PDGF-BB regulates the pulmonary vascular tone: impact of prostaglandins, calcium, MAPK- and PI3K/AKT/mTOR signalling and actin polymerisation in pulmonary veins of guinea pigs. *Respiratory Research*. 2018;19(1):120.
80. Li D, Sweeney G, Wang Q, Klip A. Participation of PI3K and atypical PKC in Na⁺-K⁺-pump stimulation by IGF-I in VSMC. *The American journal of physiology*. 1999;276(6):H2109-16.
81. Hemmings BA, Restuccia DF. The PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7(4).
82. Zhao Y, Shang F, Shi W, Zhang J, Zhang J, Liu X, et al. Angiotensin II Receptor Type 1 Antagonists Modulate Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration via AMPK/mTOR. *Cardiology*. 2019;143(1):1-10.
83. Dong Y, Chen H, Gao J, Liu Y, Li J, Wang J. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2019;136:27-41.
84. Chiarugi V. PI3K signal and DNA repair: a short commentary. *Pharmacological research*. 1997;35(4):263-5.
85. Chan KC, Wu CH, Huang CN, Lan KP, Chang WC, Wang CJ. Simvastatin inhibits glucose-stimulated vascular smooth muscle cell migration involving increased expression of RhoB and a block of Ras/Akt signal. *Cardiovascular therapeutics*. 2012;30(2):75-84.
86. Campbell M, Allen WE, Sawyer C, Vanhaesebroeck B, Trimble ER. Glucose-potentiated chemotaxis in human vascular smooth muscle is dependent on cross-talk between the PI3K and MAPK signaling pathways. *Circulation research*. 2004;95(4):380-8.
87. Soares-Silva M, Diniz FF, Gomes GN, Bahia D. The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7(183).
88. Simonetto C, Azizova TV, Barjaktarovic Z, Bauersachs J, Jacob P, Kaiser JC, et al. A mechanistic model for atherosclerosis and its application to the cohort of Mayak workers. *PloS one*. 2017;12(4):e0175386.
89. Fry RE, Fry WJ. Renovascular hypertension in the patient with severe atherosclerosis. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 1982;117(7):938-41.
90. Lee KB, Lee JY, Choi N, Yoon JE, Shin DW, Kim JS, et al. Association between insufficient medication of antihypertensives and the severity of acute ischemic stroke. *Clinical hypertension*. 2015;22:11.
91. Damm K, Runge C, Zeymer U, Graf von der Schulenburg J-M. Krankheitskosten des akuten Koronarsyndroms in Deutschland. *Der Kardiologe*. 2011;5(2):122-8.
92. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *The American journal of pathology*. 1977;86(3):675-84.
93. Ross R, Glomset JA. The Pathogenesis of Atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*. 1976;295(7):369-77.
94. Souilhol C, Serbanovic-Canic J, Fragiadaki M, Chico TJ, Ridger V, Roddie H, et al. Endothelial responses to shear stress in atherosclerosis: a novel role for developmental genes. *Nature reviews Cardiology*. 2020;17(1):52-63.
95. Lu D, Kassab GS. Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. *Journal of the Royal Society, Interface*. 2011;8(63):1379-85.
96. Bohmer RM, Scharf E, Assoian RK. Cytoskeletal integrity is required throughout the mitogen stimulation phase of the cell cycle and mediates the anchorage-dependent expression of cyclin D1. *Molecular biology of the cell*. 1996;7(1):101-11.
97. Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013;417:80-4.
98. Costantini S, Capone F, Guerriero E, Marfella R, Sorice A, Maio P, et al. Cytokine profile of patients with type 2 diabetes and/or chronic hepatitis C infection. *PloS one*. 2012;7(6):e39486.
99. Opitz F, Schenke-Layland K, Cohnert TU, Stock UA. Phenotypical plasticity of vascular smooth muscle cells-effect of in vitro and in vivo shear stress for tissue engineering of blood vessels. *Tissue engineering*. 2007;13(10):2505-14.

100. Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013;424:245-52.
101. Shapiro MD, Fazio S. From Lipids to Inflammation: New Approaches to Reducing Atherosclerotic Risk. *Circulation research*. 2016;118(4):732-49.
102. Arnett DK, Boland LL, Evans GW, Riley W, Barnes R, Tyroler HA, et al. Hypertension and arterial stiffness: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. ARIC Investigators. *American journal of hypertension*. 2000;13(4 Pt 1):317-23.
103. Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(4):715-23.
104. Taylor BA, Thompson PD. Muscle-related side-effects of statins: from mechanisms to evidence-based solutions. *Current opinion in lipidology*. 2015;26(3):221-7.
105. Castagné B, Viprey M, Martin J, Schott A-M, Cucherat M, Soubrier M. Cardiovascular safety of tocilizumab: A systematic review and network meta-analysis. *PloS one*. 2019;14(8):e0220178.
106. Abbate A, Van Tassell BW, Biondi-Zoccai G, Kontos MC, Grizzard JD, Spillman DW, et al. Effects of interleukin-1 blockade with anakinra on adverse cardiac remodeling and heart failure after acute myocardial infarction [from the Virginia Commonwealth University-Anakinra Remodeling Trial (2) (VCU-ART2) pilot study]. *The American journal of cardiology*. 2013;111(10):1394-400.
107. Serio B, Paolino S, Sulli A, Fasciolo D, Cutolo M. Effects of anti-TNF-alpha treatment on lipid profile in patients with active rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1069:414-9.
108. Bamias G, Stamatelopoulos K, Zampeli E, Protogerou A, Sigala F, Papamichael C, et al. Circulating levels of TNF-like cytokine 1A correlate with the progression of atheromatous lesions in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2013;147(2):144-50.
109. Tardif JC, Tanguay JF, Wright SR, Duchatelle V, Petroni T, Grégoire JC, et al. Effects of the P-selectin antagonist inlacumab on myocardial damage after percutaneous coronary intervention for non-ST-segment elevation myocardial infarction: results of the SELECT-ACS trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;61(20):2048-55.
110. Kumphune S, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Role of p38 inhibition in cardiac ischemia/reperfusion injury. *European journal of clinical pharmacology*. 2012;68(5):513-24.
111. Fisk M, Gajendragadkar PR, Mäki-Petäjä KM, Wilkinson IB, Cheriyan J. Therapeutic potential of p38 MAP kinase inhibition in the management of cardiovascular disease. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*. 2014;14(3):155-65.
112. Park H, Ahn JM, Kang DY, Lee JB, Park S, Ko E, et al. Optimal Stenting Technique for Complex Coronary Lesions: Intracoronary Imaging-Guided Pre-Dilation, Stent Sizing, and Post-Dilation. *JACC Cardiovascular interventions*. 2020;13(12):1403-13.
113. Lee JJ, Zhang WY, Yi H, Kim Y, Kim IS, Shen GN, et al. Anti-proliferative actions of 2-decylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;411(1):213-8.
114. Scott S, O'Sullivan M, Hafizi S, Shapiro LM, Bennett MR. Human vascular smooth muscle cells from restenosis or in-stent stenosis sites demonstrate enhanced responses to p53: implications for brachytherapy and drug treatment for restenosis. *Circulation research*. 2002;90(4):398-404.
115. Farah S, Domb AJ. Crystalline paclitaxel coated DES with bioactive protective layer development. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2018;271:107-17.
116. Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(2):502-6.
117. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409(6818):307-12.
118. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *British journal of pharmacology*. 2012;165(3):622-32.

119. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;300(2):472-6.
120. Aruna B, Ghosh S, Singh AK, Mande SC, Srinivas V, Chauhan R, et al. Human recombinant resistin protein displays a tendency to aggregate by forming intermolecular disulfide linkages. *Biochemistry*. 2003;42(36):10554-9.
121. Gerber M, Boettner A, Seidel B, Lammert A, Bär J, Schuster E, et al. Serum resistin levels of obese and lean children and adolescents: biochemical analysis and clinical relevance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(8):4503-9.
122. Zhao CW, Gao YH, Song WX, Liu B, Ding L, Dong N, et al. An Update on the Emerging Role of Resistin on the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators of inflammation*. 2019;2019:1532164.
123. Lee S, Lee HC, Kwon YW, Lee SE, Cho Y, Kim J, et al. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. *Cell metabolism*. 2014;19(3):484-97.
124. Tarkowski A, Bjersing J, Shestakov A, Bokarewa MI. Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(6b):1419-31.
125. Park HK, Kwak MK, Kim HJ, Ahima RS. Linking resistin, inflammation, and cardiometabolic diseases. *The Korean journal of internal medicine*. 2017;32(2):239-47.
126. Lankin VZ, Tikhaze AK. Role of Oxidative Stress in the Genesis of Atherosclerosis and Diabetes Mellitus: A Personal Look Back on 50 Years of Research. *Current aging science*. 2017;10(1):18-25.
127. Schwartz DR, Lazar MA. Human resistin: found in translation from mouse to man. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2011;22(7):259-65.
128. Neeland IJ, Turer AT, Ayers CR, Powell-Wiley TM, Vega GL, Farzaneh-Far R, et al. Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults. *Jama*. 2012;308(11):1150-9.
129. Nagaev I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;285(2):561-4.
130. Payab M, Hasani-Ranjbar S, Merati Y, Esteghamati A, Qorbani M, Hematabadi M, et al. The Prevalence of Metabolic Syndrome and Different Obesity Phenotype in Iranian Male Military Personnel. *American journal of men's health*. 2017;11(2):404-13.
131. Schrover IM, van der Graaf Y, Spiering W, Visseren FL. The relation between body fat distribution, plasma concentrations of adipokines and the metabolic syndrome in patients with clinically manifest vascular disease. *European journal of preventive cardiology*. 2018;25(14):1548-57.
132. Stenholm S, Koster A, Alley DE, Visser M, Maggio M, Harris TB, et al. Adipocytokines and the metabolic syndrome among older persons with and without obesity: the InCHIANTI study. *Clinical endocrinology*. 2010;73(1):55-65.
133. Menzaghi C, Bacci S, Salvemini L, Mendonca C, Palladino G, Fontana A, et al. Serum resistin, cardiovascular disease and all-cause mortality in patients with type 2 diabetes. *PloS one*. 2014;8(6):e64729.
134. La Cava A. Leptin in inflammation and autoimmunity. *Cytokine*. 2017;98:51-8.
135. Cisternas P, Martinez M, Ahima RS, William Wong G, Inestrosa NC. Modulation of Glucose Metabolism in Hippocampal Neurons by Adiponectin and Resistin. *Molecular neurobiology*. 2019;56(4):3024-37.
136. Kumari R, Kumar S, Kant R. An update on metabolic syndrome: Metabolic risk markers and adipokines in the development of metabolic syndrome. *Diabetes & metabolic syndrome*. 2019;13(4):2409-17.
137. Mostafazadeh M, Haiaty S, Rastqar A, Keshvari M. Correlation Between Resistin Level and Metabolic Syndrome Component: A Review. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2018;50(7):521-36.
138. Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;174(9):5789-95.

139. Hsu WY, Chao YW, Tsai YL, Lien CC, Chang CF, Deng MC, et al. Resistin induces monocyte-endothelial cell adhesion by increasing ICAM-1 and VCAM-1 expression in endothelial cells via p38MAPK-dependent pathway. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(8):2181-8.
140. Fleischmann-Struzek C, Mikolajetz A, Schwarzkopf D, Cohen J, Hartog CS, Pletz M, et al. Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between National Health Systems: secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany. *Intensive care medicine*. 2018;44(11):1826-35.
141. Miller L, Singbartl K, Chroneos ZC, Ruiz-Velasco V, Lang CH, Bonavia A. Resistin directly inhibits bacterial killing in neutrophils. *Intensive care medicine experimental*. 2019;7(1):30.
142. Hillenbrand A, Xu P, Zhou S, Blatz A, Weiss M, Hafner S, et al. Circulating adipokine levels and prognostic value in septic patients. *Journal of inflammation (London, England)*. 2016;13(1):30.
143. Saboktakin L, Bilan N, Ghalehgalab Behbahan A, Poorebrahim S. Relationship Between Resistin Levels and Sepsis Among Children Under 12 Years of Age: A Case Control Study. *Frontiers in pediatrics*. 2019;7:355.
144. Aliefendioglu D, Gursoy T, Caglayan O, Aktas A, Ovali F. Can resistin be a new indicator of neonatal sepsis? *Pediatrics and neonatology*. 2014;55(1):53-7.
145. Zhang Y, Li Y, Yu L, Zhou L. Association between serum resistin concentration and hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(25):41529-37.
146. Jiang Y, Lu L, Hu Y, Li Q, An C, Yu X, et al. Resistin Induces Hypertension and Insulin Resistance in Mice via a TLR4-Dependent Pathway. *Scientific reports*. 2016;6:22193.
147. Gao J, Chang Chua C, Chen Z, Wang H, Xu X, R CH, et al. Resistin, an adipocytokine, offers protection against acute myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2007;43(5):601-9.
148. Hu K, Duan D, Li GR, Nattel S. Protein kinase C activates ATP-sensitive K⁺ current in human and rabbit ventricular myocytes. *Circulation research*. 1996;78(3):492-8.
149. Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, et al. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;314(2):415-9.
150. Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation*. 2003;108(6):736-40.
151. Jamaluddin MS, Yan S, Lü J, Liang Z, Yao Q, Chen C. Resistin increases monolayer permeability of human coronary artery endothelial cells. *PloS one*. 2013;8(12):e84576.
152. Jiang C, Zhang H, Zhang W, Kong W, Zhu Y, Zhang H, et al. Homocysteine promotes vascular smooth muscle cell migration by induction of the adipokine resistin. *American journal of physiology Cell physiology*. 2009;297(6):C1466-76.
153. Raghuraman G, Zuniga MC, Yuan H, Zhou W. PKCepsilon mediates resistin-induced NADPH oxidase activation and inflammation leading to smooth muscle cell dysfunction and intimal hyperplasia. *Atherosclerosis*. 2016;253:29-37.
154. Salem JC, Reviriego-Mendoza MM, Santy LC. ARF-GEF cytohesin-2/ARNO regulates R-Ras and α 5-integrin recycling through an EHD1-positive compartment. *Molecular biology of the cell*. 2015;26(23):4265-79.
155. Ishida M, M EO, Fukuda M. Multiple Types of Guanine Nucleotide Exchange Factors (GEFs) for Rab Small GTPases. *Cell structure and function*. 2016;41(2):61-79.
156. Kolanus W, Nagel W, Schiller B, Zeitlmann L, Godar S, Stockinger H, et al. Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell*. 1996;86(2):233-42.
157. Ogasawara M, Kim SC, Adamik R, Togawa A, Ferrans VJ, Takeda K, et al. Similarities in function and gene structure of cytohesin-4 and cytohesin-1, guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(5):3221-30.
158. Stanley RJ, Thomas GM. Activation of G Proteins by Guanine Nucleotide Exchange Factors Relies on GTPase Activity. *PloS one*. 2016;11(3):e0151861.

159. Venkateswarlu K. Interaction protein for cytohesin exchange factors 1 (IPCEF1) binds cytohesin 2 and modifies its activity. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(44):43460-9.
160. VENKATESWARLU K, GUNN-MOORE F, OATEY PB, TAVARÉ JM, CULLEN PJ. Nerve growth factor- and epidermal growth factor-stimulated translocation of the ADP-ribosylation factor-exchange factor GRP1 to the plasma membrane of PC12 cells requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the GRP1 pleckstrin homology domain. *Biochemical Journal*. 1998;335(1):139-46.
161. Laroche G, Giguere PM, Dupre E, Dupuis G, Parent JL. The N-terminal coiled-coil domain of the cytohesin/ARNO family of guanine nucleotide exchange factors interacts with Galphaq. *Molecular and cellular biochemistry*. 2007;306(1-2):141-52.
162. Kolanus W. Guanine nucleotide exchange factors of the cytohesin family and their roles in signal transduction. *Immunological reviews*. 2007;218:102-13.
163. Frank S, Upender S, Hansen SH, Casanova JE. ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(1):23-7.
164. Turner CE, Brown MC. Cell motility: ARNO and ARF6 at the cutting edge. *Current biology : CB*. 2001;11(21):R875-7.
165. Balch WE, Kahn RA, Schwaninger R. ADP-ribosylation factor is required for vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and the cis-Golgi compartment. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(18):13053-61.
166. Theis MG, Knorre A, Kellersch B, Moelleken J, Wieland F, Kolanus W, et al. Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(31):11221-6.
167. Frank SR, Hatfield JC, Casanova JE. Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Molecular biology of the cell*. 1998;9(11):3133-46.
168. Lee SY, Mansour M, Pohajdak B. B2-1, a Sec7- and pleckstrin homology domain-containing protein, localizes to the Golgi complex. *Experimental cell research*. 2000;256(2):515-21.
169. Mannell HK, Pircher J, Chaudhry DI, Alig SK, Koch EG, Mettler R, et al. ARNO regulates VEGF-dependent tissue responses by stabilizing endothelial VEGFR-2 surface expression. *Cardiovasc Res*. 2012;93(1):111-9.
170. Torii T, Ohno N, Miyamoto Y, Kawahara K, Saitoh Y, Nakamura K, et al. Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-2 regulates myelination in nerves. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;460(3):819-25.
171. Zhai J, Zhang L, Mojsilovic-Petrovic J, Jian X, Thomas J, Homma K, et al. Inhibition of Cytohesins Protects against Genetic Models of Motor Neuron Disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2015;35(24):9088-105.
172. van den Bosch MT, Poole AW, Hers I. Cytohesin-2 phosphorylation by protein kinase C relieves the constitutive suppression of platelet dense granule secretion by ADP-ribosylation factor 6. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2014;12(5):726-35.
173. Chen Q, Coffey A, Bourgoin SG, Gadina M. Cytohesin binder and regulator augments T cell receptor-induced nuclear factor of activated T Cells. AP-1 activation through regulation of the JNK pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(29):19985-94.
174. Hafner M, Schmitz A, Grune I, Srivatsan SG, Paul B, Kolanus W, et al. Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature*. 2006;444(7121):941-4.
175. Hafner M, Schmitz A, Grune I, Srivatsan SG, Paul B, Kolanus W, et al. Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature*. 2006;444(7121):941-4.
176. Davis CT, Zhu W, Gibson CC, Bowman-Kirigin JA, Sorensen L, Ling J, et al. ARF6 inhibition stabilizes the vasculature and enhances survival during endotoxic shock. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2014;192(12):6045-52.
177. Maier JA, Malpuech-Brugère C, Zimowska W, Rayssiguier Y, Mazur A. Low magnesium promotes endothelial cell dysfunction: implications for atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1689(1):13-21.

178. Luong P, Hedl M, Yan J, Zuo T, Fu TM, Jiang X, et al. INAVA-ARNO complexes bridge mucosal barrier function with inflammatory signaling. *eLife*. 2018;7.
179. Heib V, Sparber F, Tripp CH, Ortner D, Stoitzner P, Heufler C. Cytip regulates dendritic-cell function in contact hypersensitivity. *European journal of immunology*. 2012;42(3):589-97.
180. Rathel T, Mannell H, Pircher J, Gleich B, Pohl U, Krotz F. Magnetic stents retain nanoparticle-bound antirestenotic drugs transported by lipid microbubbles. *Pharmaceutical research*. 2012;29(5):1295-307.
181. Santy LC, Frank SR, Casanova JE. Expression and analysis of ARNO and ARNO mutants and their effects on ADP-ribosylation factor (ARF)-mediated actin cytoskeletal rearrangements. *Methods in enzymology*. 2001;329:256-64.
182. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
183. Pascua-Maestro R, Corraliza-Gomez M, Diez-Hermano S, Perez-Segurado C, Ganfornina MD, Sanchez D. The MTT-formazan assay: Complementary technical approaches and in vivo validation in *Drosophila* larvae. *Acta histochemica*. 2018;120(3):179-86.
184. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(9):4350-4.
185. . !!! INVALID CITATION !!! .
186. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*. 2001;Appendix 3:Appendix 3B.
187. Crompton T, Peitsch MC, MacDonald HR, Tschopp J. Propidium iodide staining correlates with the extent of DNA degradation in isolated nuclei. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992;183(2):532-7.
188. Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochimica et biophysica acta*. 1992;1133(3):275-85.
189. Wulf E, Deboben A, Bautz FA, Faulstich H, Wieland T. Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(9):4498-502.
190. Alles J, Karaikos N, Praktijnjo SD, Grosswendt S, Wahle P, Ruffault PL, et al. Cell fixation and preservation for droplet-based single-cell transcriptomics. *BMC biology*. 2017;15(1):44.
191. Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-healing assay. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2005;294:23-9.
192. Marmur JD, Poon M, Rossikhina M, Taubman MB. Induction of PDGF-responsive genes in vascular smooth muscle. Implications for the early response to vessel injury. *Circulation*. 1992;86(6 Suppl):lii53-60.
193. Lee S, Wurtzel JG, Goldfinger LE. The RLIP76 N-terminus binds ARNO to regulate PI 3-kinase, Arf6 and Rac signaling, cell spreading and migration. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;454(4):560-5.
194. Wang C, Wen J, Zhou Y, Li L, Cui X, Wang J, et al. Apelin induces vascular smooth muscle cells migration via a PI3K/Akt/FoxO3a/MMP-2 pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2015;69:173-82.
195. Mugabe BE, Yaghini FA, Song CY, Buharalioglu CK, Waters CM, Malik KU. Angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-activated c-Src through spleen tyrosine kinase and epidermal growth factor receptor transactivation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2010;332(1):116-24.
196. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94(6):2493-503.

197. Mantione ME, Lombardi M, Baccellieri D, Ferrara D, Castellano R, Chiesa R, et al. IL-1beta/MMP9 activation in primary human vascular smooth muscle-like cells: Exploring the role of TNFalpha and P2X7. *International journal of cardiology*. 2019;278:202-9.
198. Delbosc S, Glorian M, Le Port AS, Bereziat G, Andreani M, Limon I. The benefit of docosahexanoic acid on the migration of vascular smooth muscle cells is partially dependent on Notch regulation of MMP-2/-9. *The American journal of pathology*. 2008;172(5):1430-40.
199. Kusuhara M, Takahashi E, Peterson TE, Abe J, Ishida M, Han J, et al. p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na⁺/H⁺ exchange and ERK1/2. *Circulation research*. 1998;83(8):824-31.
200. Kang YE, Kim JM, Joung KH, Lee JH, You BR, Choi MJ, et al. The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction. *PLoS one*. 2016;11(4):e0154003.
201. Maurizi G, Della Guardia L, Maurizi A, Poloni A. Adipocytes properties and crosstalk with immune system in obesity-related inflammation. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(1):88-97.
202. Bhatta A, Yao L, Xu Z, Toque HA, Chen J, Atawia RT, et al. Obesity-induced vascular dysfunction and arterial stiffening requires endothelial cell arginase 1. *Cardiovascular research*. 2017;113(13):1664-76.
203. Berezin AE, Berezin AA, Lichtenauer M. Emerging Role of Adipocyte Dysfunction in Inducing Heart Failure Among Obese Patients With Prediabetes and Known Diabetes Mellitus. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2020;7:583175.
204. Koch A, Gressner OA, Sanson E, Tacke F, Trautwein C. Serum resistin levels in critically ill patients are associated with inflammation, organ dysfunction and metabolism and may predict survival of non-septic patients. *Crit Care*. 2009;13(3):R95.
205. Weiss S, Frischknecht K, Greutert H, Payeli S, Steffel J, Lüscher TF, et al. Different migration of vascular smooth muscle cells from human coronary artery bypass vessels. Role of Rho/ROCK pathway. *Journal of vascular research*. 2007;44(2):149-56.
206. Rak A, Drwal E, Wróbel A, Gregoraszczyk E. Resistin is a survival factor for porcine ovarian follicular cells. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2015;150(4):343-55.
207. Kim HJ, Lee YS, Won EH, Chang IH, Kim TH, Park ES, et al. Expression of resistin in the prostate and its stimulatory effect on prostate cancer cell proliferation. *BJU international*. 2011;108(2 Pt 2):E77-83.
208. Wang YQ, Fan CC, Chen BP, Shi J. Resistin-Like Molecule Beta (RELM-β) Regulates Proliferation of Human Diabetic Nephropathy Mesangial Cells via Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) Signaling Pathway. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2017;23:3897-903.
209. Mohammadi M, Hedayati M, Zarghami N, Ghaemmaghani S. RESISTIN EFFECT ON TELOMERASE GENE EXPRESSION IN GASTRIC CANCER CELL LINE AGS. *Acta endocrinologica (Bucharest, Romania : 2005)*. 2016;12(2):145-9.
210. Dong ZX, Su L, Brymora J, Bird C, Xie Q, George J, et al. Resistin mediates the hepatic stellate cell phenotype. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(28):4475-85.
211. Messini CI, Vasilaki A, Korona E, Anifandis G, Georgoulas P, Dafopoulos K, et al. Effect of resistin on estradiol and progesterone secretion from human luteinized granulosa cells in culture. *Systems biology in reproductive medicine*. 2019;65(5):350-6.
212. Weichert H, Blechschmidt I, Schröder S, Ambrosius H. The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing: application to human peripheral blood lymphocytes (PBL). *Allergie und Immunologie*. 1991;37(3-4):139-44.
213. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2017;1601:1-17.
214. McCauley J, Zivanovic A, Skropeta D. Bioassays for anticancer activities. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2013;1055:191-205.

215. Rawal K, Purohit KM, Patel TP, Karont N, Gupta S. Resistin mitigates stemness and metabolic profile of human adipose-derived mesenchymal stem cells via insulin resistance. *Cytokine*. 2021;138:155374.
216. Wang J, Jia Y, Wang L, Li D, Wang L, Zhu Y, et al. Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein: Regulators of Adipokines Resistin and Phenotype Conversion of Epicardial Adipocytes. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2018;24:6010-20.
217. Meng Z, Zhang Y, Wei Z, Liu P, Kang J, Zhang Y, et al. High serum resistin associates with intrahepatic inflammation and necrosis: an index of disease severity for patients with chronic HBV infection. *BMC gastroenterology*. 2017;17(1):6.
218. Szalowska E, Elferink MG, Hoek A, Groothuis GM, Vonk RJ. Resistin is more abundant in liver than adipose tissue and is not up-regulated by lipopolysaccharide. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(8):3051-7.
219. Filková M, Hulejová H, Kuncová K, Pleštilová L, Cerezo LA, Mann H, et al. Resistin in idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(3):R111.
220. Curtis AS. Cell contact and adhesion. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 1962;37:82-129.
221. Torii T, Miyamoto Y, Sanbe A, Nishimura K, Yamauchi J, Tanoue A. Cytohesin-2/ARNO, through its interaction with focal adhesion adaptor protein paxillin, regulates preadipocyte migration via the downstream activation of Arf6. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(31):24270-81.
222. Davies JC, Tamaddon-Jahromi S, Jannoo R, Kanamarlapudi V. Cytohesin 2/ARF6 regulates preadipocyte migration through the activation of ERK1/2. *Biochemical pharmacology*. 2014;92(4):651-60.
223. Reviriego-Mendoza MM, Santy LC. The cytohesin guanosine exchange factors (GEFs) are required to promote HGF-mediated renal recovery after acute kidney injury (AKI) in mice. *Physiological reports*. 2015;3(6).
224. Wurtzel JG, Lee S, Singhal SS, Awasthi S, Ginsberg MH, Goldfinger LE. RLIP76 regulates Arf6-dependent cell spreading and migration by linking ARNO with activated R-Ras at recycling endosomes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;467(4):785-91.
225. Li CC, Chiang TC, Wu TS, Pacheco-Rodriguez G, Moss J, Lee FJ. ARL4D recruits cytohesin-2/ARNO to modulate actin remodeling. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(11):4420-37.
226. Attar MA, Santy LC. The scaffolding protein GRASP/Tamalin directly binds to Dock180 as well as to cytohesins facilitating GTPase crosstalk in epithelial cell migration. *BMC cell biology*. 2013;14:9.
227. Pan T, Sun J, Hu J, Hu Y, Zhou J, Chen Z, et al. Cytohesins/ARNO: the function in colorectal cancer cells. *PLoS one*. 2014;9(3):e90997.
228. Santy LC, Casanova JE. Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *The Journal of cell biology*. 2001;154(3):599-610.
229. Viaud J, Zeghouf M, Barelli H, Zeeh JC, Padilla A, Guibert B, et al. Structure-based discovery of an inhibitor of Arf activation by Sec7 domains through targeting of protein-protein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(25):10370-5.
230. Santy LC, Ravichandran KS, Casanova JE. The DOCK180/Elmo complex couples ARNO-mediated Arf6 activation to the downstream activation of Rac1. *Current biology : CB*. 2005;15(19):1749-54.
231. Wang Y, Shi L, Li J, Li L, Wang H, Yang H. Involvement of p38 MAPK pathway in benzo(a)pyrene-induced human hepatoma cell migration and invasion. *Environmental science and pollution research international*. 2019;26(35):35838-45.
232. Sakalihasan N, Delvenne P, Nusgens BV, Limet R, Lapiere CM. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *Journal of vascular surgery*. 1996;24(1):127-33.
233. DeLeon-Pennell KY, Meschiari CA, Jung M, Lindsey ML. Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure. *Progress in molecular biology and translational science*. 2017;147:75-100.

234. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2013;28(6):391-403.
235. Kadiri M, El Azreq MA, Berrazouane S, Boisvert M, Aoudjit F. Human Th17 Migration in Three-Dimensional Collagen Involves p38 MAPK. *Journal of cellular biochemistry*. 2017;118(9):2819-27.
236. Li L, Zhang J, Zhang Q, Zhang D, Xiang F, Jia J, et al. High Glucose Suppresses Keratinocyte Migration Through the Inhibition of p38 MAPK/Autophagy Pathway. *Frontiers in physiology*. 2019;10:24.
237. Tong X, Zeng H, Gu P, Wang K, Zhang H, Lin X. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the proliferation, migration and differentiation potential of fibroblast-like synoviocytes via the PI3K/P38 cellular signaling pathway. *Molecular medicine reports*. 2020;21(3):1623-32.
238. Ao R, Guan L, Wang Y, Wang JN. Silencing of COL1A2, COL6A3, and THBS2 inhibits gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion while promoting apoptosis through the PI3k-Akt signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry*. 2018;119(6):4420-34.
239. Tsai CH, Tsai HC, Huang HN, Hung CH, Hsu CJ, Fong YC, et al. Resistin promotes tumor metastasis by down-regulation of miR-519d through the AMPK/p38 signaling pathway in human chondrosarcoma cells. *Oncotarget*. 2015;6(1):258-70.
240. Mu H, Ohashi R, Yan S, Chai H, Yang H, Lin P, et al. Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells. *Cardiovascular research*. 2006;70(1):146-57.
241. Wang Y, Zhang Y, Gao X, Qian J, Yang J, Sun W, et al. Resistin-like molecule beta augments phenotypic modulation of human aortic smooth muscle cell triggered by high glucose. *Endocrine journal*. 2021.
242. Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *Journal of virology*. 1969;4(5):549-53.
243. Yamaoka M, Ando T, Terabayashi T, Okamoto M, Takei M, Nishioka T, et al. PI3K regulates endocytosis after insulin secretion by mediating signaling crosstalk between Arf6 and Rab27a. *Journal of cell science*. 2016;129(3):637-49.
244. Yamaoka M, Terabayashi T, Nishioka T, Kaibuchi K, Ishikawa T, Ishizaki T, et al. IRR is involved in glucose-induced endocytosis after insulin secretion. *Journal of pharmacological sciences*. 2019;140(3):300-4.
245. Kim JY, Kim KH, Lee WR, An HJ, Lee SJ, Han SM, et al. Apamin inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration through suppressions of activated Akt and Erk signaling pathway. *Vascular pharmacology*. 2015;70:8-14.
246. Jayaram B, Kowluru A. Phagocytic NADPH oxidase links ARNO-Arf6 signaling pathway in glucose-stimulated insulin secretion from the pancreatic β -cell. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2012;30(6):1351-62.
247. Steiner G. Atherosclerosis, the major complication of diabetes. *Advances in experimental medicine and biology*. 1985;189:277-97.
248. Mrgan M, Funck KL, Gaur S, Ovrehus KA, Dey D, Kusk MW, et al. High burden of coronary atherosclerosis in patients with a new diagnosis of type 2 diabetes. *Diabetes & vascular disease research*. 2017:1479164117728014.
249. Matsuura E, Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Turiel M, Lopez LR, Nurmohamed MT. Is atherosclerosis an autoimmune disease? *BMC medicine*. 2014;12:47.
250. Naruszewicz M, Daniewski M, Nowicka G, Kozłowska-Wojciechowska M. Trans-unsaturated fatty acids and acrylamide in food as potential atherosclerosis progression factors. Based on own studies. *Acta microbiologica Polonica*. 2003;52 Suppl:75-81.
251. Van Gaal LF, Vansant GA, De Leeuw IH. Upper body adiposity and the risk for atherosclerosis. *Journal of the American College of Nutrition*. 1989;8(6):504-14.
252. Walker M. Obesity, insulin resistance, and its link to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental*. 1995;44(9 Suppl 3):18-20.

253. Lee JO, Kim N, Lee HJ, Lee YW, Kim SJ, Park SH, et al. Resistin, a fat-derived secretory factor, promotes metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells through ERM activation. *Scientific reports*. 2016;6:18923.
254. Xiang M, Yang R, Zhang Y, Wu P, Wang L, Gao Z, et al. Effect of crocetin on vascular smooth muscle cells migration induced by advanced glycosylation end products. *Microvascular research*. 2017;112:30-6.
255. Lombardi M, Mantione ME, Baccellieri D, Ferrara D, Castellano R, Chiesa R, et al. P2X7 receptor antagonism modulates IL-1beta and MMP9 in human atherosclerotic vessels. *Scientific reports*. 2017;7(1):4872.
256. Mittal B, Mishra A, Srivastava A, Kumar S, Garg N. Matrix metalloproteinases in coronary artery disease. *Advances in clinical chemistry*. 2014;64:1-72.
257. Kadoglou NP, Daskalopoulou SS, Perrea D, Liapis CD. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiology*. 2005;56(2):173-89.
258. Artinger S, Deiner C, Loddenkemper C, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, Pels K. Complex porcine model of atherosclerosis: induction of early coronary lesions after long-term hyperlipidemia without sustained hyperglycemia. *The Canadian journal of cardiology*. 2009;25(4):e109-14.
259. Pacheco-Rodriguez G, Moss J, Vaughan M. Cytohesin-1: structure, function, and ARF activation. *Methods in enzymology*. 2005;404:184-95.
260. Qi Y, Liang X, Dai F, Guan H, Sun J, Yao W. RhoA/ROCK Pathway Activation is Regulated by AT1 Receptor and Participates in Smooth Muscle Migration and Dedifferentiation via Promoting Actin Cytoskeleton Polymerization. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(15).
261. Gabunia K, Jain S, England RN, Autieri MV. Anti-inflammatory cytokine interleukin-19 inhibits smooth muscle cell migration and activation of cytoskeletal regulators of VSMC motility. *American journal of physiology Cell physiology*. 2011;300(4):C896-906.
262. Mooranian A, Negrulj R, Takechi R, Mamo J, Al-Sallami H, Al-Salami H. The biological effects of the hypolipidaemic drug probucol microcapsules fed daily for 4 weeks, to an insulin-resistant mouse model: potential hypoglycaemic and anti-inflammatory effects. *Drug delivery and translational research*. 2018;8(3):543-51.
263. Shih DM, Xia Y-R, Wang X-P, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, et al. Combined Serum Paraoxonase Knockout/Apolipoprotein E Knockout Mice Exhibit Increased Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis*. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(23):17527-35.

8. Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Hanna Mannell, meiner Doktormutter und Leiterin der Arbeitsgruppe, in deren Rahmen ich diese Arbeit anfertigen durfte. Ihrer mir erwiesenen Geduld, gepaart mit der wissenschaftlichen Expertise, welche nötig ist, um eine Dissertationsschrift wie diese durchführen zu können, verdanke ich diese Arbeit. Sie hatte zu jeder Zeit ein offenes Ohr, Rat und Verständnis für Probleme und Unwägbarkeiten, die während der langen Zeit der Anfertigung dieser Arbeit auftraten. Darüber hinaus sorgte sie zu jedem Zeitpunkt für eine optimale Umgebung durch das Einwerben finanzieller Mittel und Kooperationen mit anderen Laboren, welche unerlässlich sind für die wissenschaftliche Arbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank den weiteren Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe - insbesondere Yvonn Heun für die Geduld und das unermüdliche Pushen in die richtige Richtung, Katharina Gründler und Ramona Mettler für die Hilfe bei Fragen rund um die Versuche, die aktuellen Aufenthaltsorte der einzelnen Chemikalien, und ich danke Raffaella Rotter für die Hilfe bei einigen Versuchen.

Bei den weiteren Mitarbeitern und Mit-Doktoranden der AG Mannell, der AG Walzog und den übrigen Mitarbeitern des Institutes möchte ich mich ferner für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei weiteren Mitwirkenden wie meiner Familie, meinen Freunden und meiner Frau Judith Sonja Elisabeth Weigt-Gräff und deren Familie für die Mithilfe und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Gräff, Pascal

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Phänotypischer Switch der vaskulären glatten Muskelzellen: Die Rolle von ARNO in resistinvermittelter Migration

.....

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Engensen, 30.09.2022

Ort, Datum

Pascal Gräff

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Lebenslauf

Publikationen Pascal Gräff

Erstautorschaften:

Gräff P, Alanazi S, Alazzawi S, Weber-Spickschen S, Krettek C, Dratzidis A, Fleischer-Lueck B, Hawi N, Liodakis E. Screw fixation for syndesmotic injury is stronger and provides more contact area of the joint surface than TightRope®: A biomechanical study. *Technol Health Care*. 2020;28(5):533-539. doi: 10.3233/THC-191638. PMID: 32280069.

Eigene Beteiligung: Durchführung des Versuches, federführende Ausarbeitung des Versuchsaufbaus und Verfassen des Manuskriptes.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in einem internationalen peer-review Journal veröffentlicht:

Heun Y*, **Gräff P***, Lagara A, Schelhorn R, Mettler R, Pohl U and Mannell H. The GEF Cytohesin-2/ARNO Mediates Resistin induced Phenotypic Switching in Vascular Smooth Muscle Cells. *Scientific reports*. 2020;10:3672. JIF₂₀₁₉: 3.998

*Geteilte Erstautorschaft

Eigene Beteiligungen: Durchführung eines Großteils der Versuche, Auswertung der gesamten Daten und Verfassen des Manuskriptes in gleichen Teilen mit Yvonn Heun.

Zweitautorschaften:

Graulich T, Graeff P, Jaiman A, Nicolaidis S, Omar Pacha T, Örgel M, Macke C, Omar M, Krettek C, Liodakis E. Risk factors for dislocation after bipolar hemiarthroplasty: a retrospective case-control study of patients with CT data. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2021 May;31(4):627-633. doi: 10.1007/s00590-020-02819-8. Epub 2020 Oct 23. PMID: 33098004.

Eigene Beteiligung: Datenerhebung und Verfeinern der Auswertung, Manuskriptkorrektur

Graulich TJ, Graeff P, Heidenblut T, Krettek C, Liodakis E. Revision of a Fractured Titanium Modular Revision Hip Stem Without Removal of the Well-Fixed Part of the Stem: A New Approach Using a Cemented Tube. *Arthroplast Today*. 2020 Jun 13;6(3):363-368. doi: 10.1016/j.artd.2020.04.018. PMID: 32566718; PMCID: PMC7298535.

Eigene Beteiligung: Datenerhebung, Auswertung und Manuskripterstellung

Winkelmann M, Clausen JD, Graeff P, Schröter C, Zeckey C, Weber-Spickschen S, Mommsen P. Impact of Accidental Hypothermia on Pulmonary Complications in Multiply Injured Patients With Blunt Chest Trauma - A Matched-pair Analysis. *In Vivo*. 2019 Sep-Oct;33(5):1539-1545. doi: 10.21873/invivo.11634. PMID: 31471402; PMCID: PMC6755018.

Eigene Beteiligung: Datenerhebung und Mitarbeit an der Auswertung und Manuskripterstellung

Graulich T, Graeff P, Nicolaidis S, Haertle M, Omar M, Krettek C, Liodakis E. Acetabular posterior wall morphology. A CT-based method to distinguish two acetabular posterior wall types. *J Orthop*. 2020 Jan 26;20:160-166. doi: 10.1016/j.jor.2020.01.027. PMID: 32025141; PMCID: PMC6997113. Eigene Beteiligung: Datenerhebung und Mitarbeit an der Auswertung sowie der Manuskripterstellung