

**Aus dem  
Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. K. Schrör**

**Freisetzung des basischen Fibroblastenwachstumsfaktors  
aus humanen glatten Gefäßmuskelzellen durch Thrombin und Cholesterin**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Godehard Albert Scholz**

**2009**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Bernhard H. Rauch  
Korreferent: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

**Inhaltsverzeichnis**

<b>0</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	S. 5
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	S. 7
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	S. 13
2.1	Chemikalien und Lösungen sowie Geräte	S. 13
2.2	Zellen	S. 16
2.3	Messung der Deoxyribonucleic Acid-Syntheserate (DNA-Syntheserate)	S. 16
2.4	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	S. 17
2.5	Western-Blotting-Methode	S. 20
2.6	Versuchsprotokolle	S. 21
2.6.1	Einfluss von Thrombin auf die DNA-Syntheserate	S. 22
2.6.2	Einfluss von bFGF auf die DNA-Syntheserate	S. 22
2.6.3	Einfluss von Cholesterin auf die DNA-Syntheserate	S. 22
2.6.4	Zeitverlauf des Anstiegs der Freisetzung von bFGF	S. 23
2.6.5	Beteiligung der PARs an der Freisetzung von bFGF	S. 23
2.6.6	Einfluss von Y-27632 auf die Freisetzung von bFGF	S. 23
2.6.7	Einfluss von Rottlerin auf die Freisetzung von bFGF	S. 23
2.6.8	Einfluss von Cholesterin auf die Freisetzung von bFGF	S. 23
2.6.9	Einfluss von Thrombin und Cholesterin auf die ERK 1/2-Phosphorylierung	S. 24
2.7	Statistische Auswertung	S. 24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	S. 25
3.1	Einfluss von Thrombin auf die DNA-Syntheserate	S. 25
3.2	Einfluss von bFGF auf die DNA-Syntheserate	S. 26
3.3	Einfluss von Cholesterin auf die DNA-Syntheserate	S. 26
3.4	Zeitverlauf des Anstiegs der Freisetzung von bFGF	S. 28
3.5	Beteiligung der PARs an der Freisetzung von bFGF	S. 30
3.6	Einfluss von Y-27632 auf die Freisetzung von bFGF	S. 30
3.7	Einfluss von Rottlerin auf die Freisetzung von bFGF	S. 32
3.8	Einfluss von Cholesterin auf die Freisetzung von bFGF	S. 33

## **Inhaltsverzeichnis**

---

3.9	Einfluss von Thrombin und Cholesterin auf die ERK 1/2-Phosphorylierung	S. 37
3.10	Zusammenfassung der Ergebnisse	S. 38
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	S. 39
4.1	Bedeutung der glatten Gefäßmuskulatur in der Pathogenese der Atherosklerose	S. 39
4.2	Mechanismus der Thrombin-induzierten bFGF-Freisetzung aus glatten Gefäßmuskelzellen	S. 41
4.3	Bedeutung der Hypercholesterinämie in der Pathogenese der Atherosklerose	S. 43
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	S. 48
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	S. 49
<b>7</b>	<b>Publikationen</b>	S. 56
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	S. 57
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	S. 58
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	S. 59
<b>11</b>	<b>Abstract</b>	S. 60

**0 Abkürzungsverzeichnis**

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serum Albumin
Bq	Becquerel
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CaM	Calmodulin
Ci	Curie
CPM	Counts Per Minute
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GPCR	G-Protein Coupled Receptor
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	N-2-Hydroxy-ethyl-piperazin-N'-ethan-sulfonsäure
IC <sub>50</sub>	Inhibitory Concentration 50
IgG	Immunglobulin G
Il	Interleukin
K <sub>i</sub>	inhibitorische Dissoziationskonstante
LDL	Low Density Lipoprotein
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen Activated Protein-Kinase = ERK
MW	Molecular Weight
PAR	Protease Activated Receptor

## 0 Abkürzungsverzeichnis

---

PAR-AP	PAR -Activating Peptide
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rho	Ras homologous
ROCK	Rho-Associated Coiled-Coil Family Kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	TBS Tween-20
TBSTM	TBST, 5 Gew.-% Milchpulver
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumornekrose Faktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
V	Volt
V.	Vena, Venae

### 1 Einleitung

Die Atherosklerose ist für die Bevölkerung der Industrienationen insofern von Bedeutung, als sie in Europa, in den USA und in Japan die Hauptursache von ungefähr 50 % aller Todesfälle ist (Ross, 1993; Braunwald, 1997; Lusis, 2000). Sie ist gemäß Definition der WHO eine variable Kombination von Veränderungen der Gefäßintima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Gefäßmedia (Baretton et al., 2004). Betroffen sind die elastischen sowie die mittleren und großen muskulären Arterien. Als systemische Krankheit kann die Atherosklerose eine Vielzahl von Organen resp. Organsystemen befallen und eine heterogene Symptomatik hervorrufen. Als Folge der jeweiligen Organmanifestation können neben dem Myokardinfarkt und dem Schlaganfall Angina pectoris, Gangrän der Extremitäten und Claudicatio intermittens, mesenteriale Ischämie und Angina abdominalis, Nierenarterienstenosen und arterioembolische Ereignisse auftreten (Gröchenig, 2005). Zudem weisen die Gefäßwände stenosierter venöser Bypass-Gefäße Veränderungen auf, die in ihrer pathomorphologischen Struktur der fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaque entsprechen (Kirklin et al., 1993; Silva et al., 1998). Bei diesen Veränderungen der Bypass-Gefäße spielt der Lipidstoffwechsel eine besondere Rolle. Dies lässt sich nicht zuletzt daraus ersehen, dass bei Patienten, die einer kardiovaskulären Bypass-Operation unterzogen worden sind, die strenge medikamentöse Kontrolle des Cholesterinspiegels die Stenoserate des Bypass-Gefäßes signifikant senkt (Kirklin et al., 1993; Campeau et al., 1984, 1997; Syväne et al., 1998).

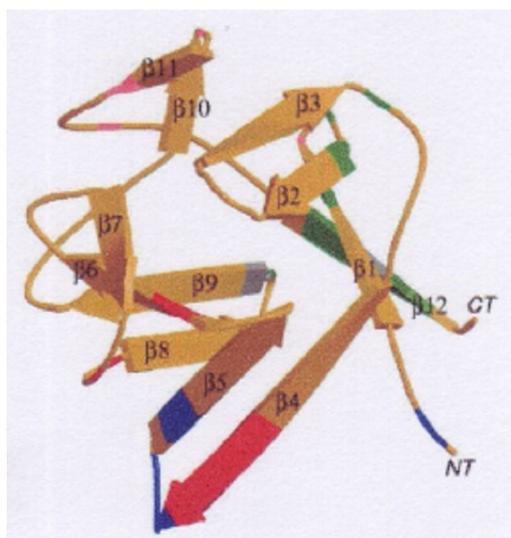
Zur Pathogenese der Atherosklerose werden verschiedene Theorien angeführt, die jeweils auf einen ausgewählten Aspekt fokussieren: die Filtrationstheorie, die Perfusionstheorie, die Endothelläsionstheorie, die monoklonale Theorie und die thrombotische Theorie (Baretton et al., 2004). Eine synoptische Darstellung der ätiologischen und pathogenetischen Vorgänge bietet die „response-to-injury“-Hypothese. Demnach ist der zentrale Ausgangspunkt der Erkrankung eine endotheliale Dysfunktion resp. eine Beeinträchtigung der Endothelintegrität (Ross, 1993; 1999). Es werden fünf nacheinander auftretende und ineinander übergehende Phasen resp. Stadien unterschieden (Ross, 1993; 1999; Baretton et al., 2004): Initiale Phase - Inflammatorische Phase - Schaumzellbildung - Bildung einer fibrösen Plaque - Bildung einer fortgeschrittenen Plaque. Im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose hat die glatte Gefäßmuskulatur insofern eine zentrale Bedeutung, als der Großteil der EZM fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen von glatten Gefäßmuskelzellen synthetisiert wird. Die Bildung

## 1 Einleitung

---

der EZM durch die glatten Gefäßmuskelzellen ist ein kritischer Punkt in der Pathogenese der Atherosklerose, da sie dazu führt, dass anstatt einer einfachen reversiblen subendothelialen Akkumulation von Schaumzellen eine irreversible fibromuskuläre Läsion entsteht. Die daraus resultierende Umwandlung von Fettstreifen („fatty streaks“) in fibröse Läsionen mit einer Vielzahl von glatten Gefäßmuskelzellen und einer reichhaltigen EZM stellt den entscheidenden - irreversiblen - Schritt bei der Ausbildung der fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaque dar. Aus diesem Grund besteht ein zentrales Interesse daran, diejenigen Mechanismen aufzuklären, die die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen triggern und die Ausbildung einer EZM induzieren (Gröchenig, 2005).

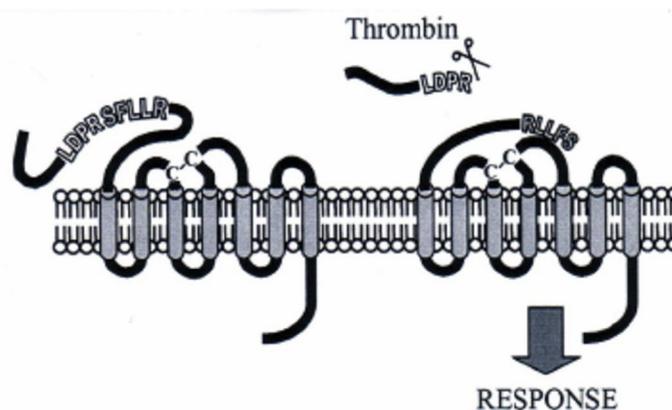
An diesen Triggerungs- und Signalisierungsprozessen sind auch Wachstumsfaktoren wie bFGF beteiligt. Gemeinsam mit FGF1 bildet bFGF - auch als FGF2 bezeichnet - die FGF1-Unterfamilie der FGFs. Ursprünglich wurde bFGF zusammen mit FGF1 im Gehirn und in der Hypophyse als Wachstumsfaktor für Fibroblasten identifiziert. Deswegen und aufgrund der Beobachtung, dass bFGF über basische Aminosäurereste an Heparin binden kann, ergibt sich der Name basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (Ornitz et al., 2001). Über den strukturellen Aufbau von bFGF, dessen Genlokus auf Chromosom 4q27 liegt, ist bekannt, dass der Wachstumsfaktor aus 12 antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen besteht, die Kleeblatt-ähnlich angeordnet sind (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>; s. Abb. 1).



**Abb. 1:** Dreidimensionale Darstellung der Proteinstruktur von bFGF: Die  $\beta$ -Faltblattstrukturen des Proteins sind als Pfeile dargestellt und mit  $\beta 1$  bis  $\beta 12$  bezeichnet. Die beiden Regionen, die an Heparin binden, liegen zwischen  $\beta 1$  und  $\beta 2$  sowie zwischen  $\beta 10$  und  $\beta 11$  und sind violett gekennzeichnet. Regionen, die Kontakt mit dem FGFR haben, sind grün (Ig-Domäne 2), blau (Ig-Domäne 3) und rot (alternativ gesplittete Ig-Domäne 3). Verbindungsregionen sind grau dargestellt. - Quelle: Ornitz et al., 2001

Die  $\beta$ -Stränge 10 und 11 des Proteins beinhalten die basischen Aminosäurereste, über die der Wachstumsfaktor an Heparin binden kann. Die Bindung an FGFRs geschieht über andere Regionen als die Bindung an Heparin (Zhu et al., 1991; Ornitz et al., 2001). Bezüglich der Wirkungen von bFGF ist festzustellen: Neben seiner Funktion bei der Expression neuronaler Proteine reguliert bFGF auch neuronale Steuerungskreise (Itoh et al., 2004; Dono et al., 2002). Im kardiovaskulären System besitzt bFGF eine den Gefäßtonus regulierende Aufgabe (Zhou et al., 1998). Zudem ist bFGF an der Hochdruck-induzierten kardialen Hypertrophie beteiligt (Schultz et al., 1999). Neuere Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass die Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen mit der Serinprotease Thrombin einen Anstieg von bFGF in der EZM dieser glatten Gefäßmuskelzellen bewirkt (Rauch et al., 2004). Der aktuelle Stand des Wissens über die zur Freisetzung von bFGF führenden Mechanismen ist allerdings recht vage (s. Kap. 4.1). Gänzlich unklar sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt die extra- und intrazellulären Mechanismen, die in der EZM glatter Gefäßmuskelzellen nach ihrer Stimulation mit der Serinprotease Thrombin einen Anstieg des Wachstumsfaktors bFGF hervorrufen. Diese sollen daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

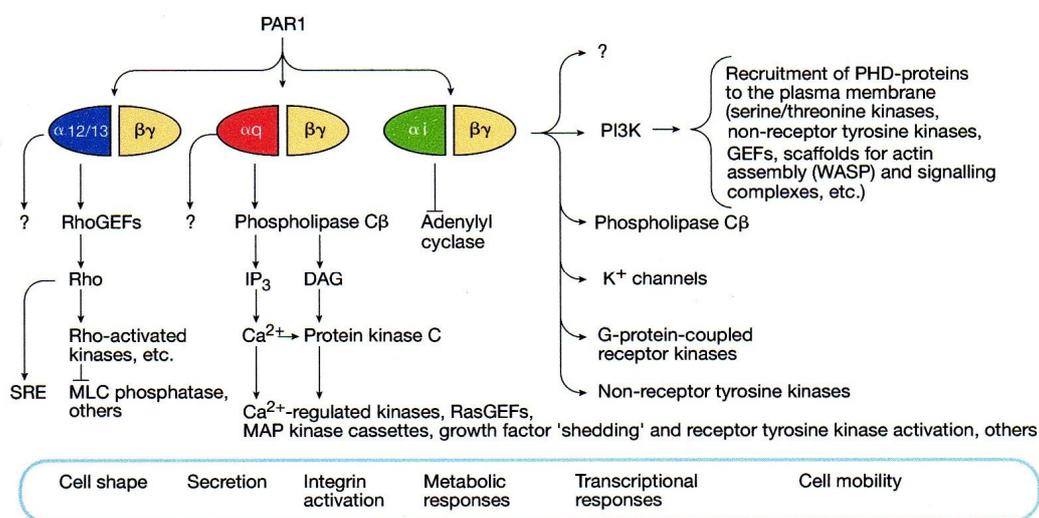
Die Wirkungen, die Thrombin an den Zellen der Gefäßwand entfaltet, werden über spezifische Rezeptoren vermittelt (Glusa et al., 2005). Diese Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs) bilden eine Unterfamilie der GPCRs. Bislang sind vier verschiedene PARs bekannt und an humanen glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen worden - nämlich PAR-1, PAR-2, PAR-3 und PAR-4 (Bretschneider et al., 1999, 2001, 2003; O'Brien et al., 2001). Thrombin aktiviert PAR-1, PAR-3 und PAR-4, nicht aber PAR-2; denn PAR-2 ist ein Rezeptor für andere Proteasen wie den aktivierten Faktor X oder Trypsin (Hollenberg et al., 2002). Der Aktivierungsmechanismus der PARs stellt ein für sie charakteristisches Merkmal dar, wie nachstehend für PAR-1 exemplarisch gezeigt ist (s. Abb. 2):



**Abb. 2:** Rezeptoraktivierung von PAR-1 durch die Serinprotease Thrombin - Quelle: Hollenberg et al., 2002

## 1 Einleitung

Die Rezeptoren besitzen ein verlängertes N-terminales Ende. Der Agonist des Rezeptors - also Thrombin für PAR-1, PAR-3 und PAR-4 - spaltet dieses verlängerte Ende proteolytisch ab. Durch diesen Vorgang entsteht ein neues, verkürztes N-terminales Ende mit einer Aminosäuresequenz, die durch Bindung an eine andere Aminosäuresequenz im Rezeptormolekül die Aktivierung des Rezeptors bewirkt. Die durch die Spaltung freigelegte aktivierende N-terminale Aminosäuresequenz wird als „tethered ligand“ bezeichnet. Die Reihenfolge der Aminosäuren des aktivierenden „tethered ligand“ ist für jeden der vier PARs bekannt (Hollenberg et al., 2002; Hollenberg, 2005). Durch den Einsatz synthetisch hergestellter Aminosäuresequenzen, die die identische Abfolge der Aminosäuren besitzen wie der „tethered ligand“ des jeweiligen PAR, lassen sich die PARs selektiv aktivieren. Die synthetisch hergestellten Aminosäuresequenzen bezeichnet man als PAR-APs. Da es also möglich ist, jeden PAR mit dem für ihn spezifischen PAR-AP selektiv zu aktivieren, ist jede auf die Rezeptoraktivierung folgende messbare Veränderung auf einen dem Rezeptor nachgeschalteten intrazellulären Signaltransduktionsmechanismus zurückzuführen. Bekannt und besonders untersucht sind die dem PAR-1 nachgeschalteten Signalkaskaden (s. Abb. 3).



**Abb. 3:** PAR-1 und die ihm nachgeschalteten intrazellulären Signalkaskaden - Quelle: Coughlin, 2000

Die Beteiligung dieser Signalkaskaden an der Freisetzung von bFGF aus glatten Gefäßmuskelzellen nach Stimulation mit Thrombin kann durch selektive Hemmung untersucht werden. Diesem Vorgehen liegt die folgende Überlegung zugrunde: Werden glatte Gefäßmuskelzellen, bei denen der zur Freisetzung von bFGF führende intrazelluläre Signalweg selek-

tiv gehemmt ist, mit Thrombin stimuliert, dann muss der messbare Anstieg von bFGF in der EZM signifikant geringer sein als bei glatten Gefäßmuskelzellen, die nur mit Thrombin stimuliert werden, ansonsten aber unbehandelt sind. Angesichts dessen sollen im Rahmen dieser Arbeit die dem PAR-1 nachgeschalteten Rho-aktivierten Proteinkinasen, die mit der Substanz Y-27632 selektiv gehemmt werden können, und die PKC, für deren Isoenzym PKC  $\delta$  die Substanz Rottlerin ein selektiver Hemmstoff ist, im Hinblick auf ihre Beteiligung an der Freisetzung von bFGF untersucht werden.

Y-27632 - chemische Formel:  $C_{14}H_{21}N_3O \cdot 2HCl \cdot H_2O$ ; auch ROCK-Inhibitor genannt - hat ein MW von 338,3. Die lichtempfindliche und zellgängige Substanz ist ein starker und selektiver Hemmstoff Rho-assoziiierter Proteinkinasen ( $K_i = 140 \text{ nM}$  für p160<sup>ROCK</sup> und ROCK II). Die Hemmung erfolgt kompetitiv zum ATP. Für das Isoenzym PKC  $\epsilon$  besitzt Y-27632 eine 10fach bis 50fach geringere Affinität als für p160<sup>ROCK</sup>. Auch beim Einsatz höherer Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) hat es keinen Einfluss auf die p21-aktivierte Proteinkinase. Eine weitere Wirkung von Y-27632 ist die Hemmung der nach  $Ca^{2+}$ -Sensitivierung hervorgerufenen Phosphorylierung von Myosin und damit die Hemmung der Kontraktion glatter Muskeln (<http://www.emdbiosciences.com/product/688000>).

Rottlerin - chemische Formel:  $C_{30}H_{28}O_8$ ; auch Mallotoxin genannt - hat ein MW von 516,5. Die lichtempfindliche Substanz ist ein Hemmstoff der PKC und besitzt eine große Selektivität für die Isoenzyme PKC  $\delta$  ( $IC_{50} = 3-6 \mu\text{M}$ ) und PKC  $\theta$ . Signifikant schwächer hingegen hemmt Rottlerin die Isoenzyme PKC  $\alpha$ , PKC  $\beta$ , PKC  $\gamma$  ( $IC_{50} = 30-42 \mu\text{M}$ ) und PKC  $\epsilon$ , PKC  $\eta$ , PKC  $\zeta$  ( $IC_{50} = 80-100 \mu\text{M}$ ). Eine weitere Wirkung von Rottlerin besteht in der Hemmung der CaM-Kinase III ( $IC_{50} = 5,3 \mu\text{M}$ ) (<http://www.emdbiosciences.com/product/557370>).

Zu den Risikofaktoren der Atherosklerose gehört die Hypercholesterinämie (Kirklin et al., 1993; Baretton et al., 2004). Es ist bekannt, dass eine adäquate Einstellung des Cholesterinspiegels das Fortschreiten der Ausbildung atherosklerotischer Läsionen aufhalten resp. bereits ausgebildete Läsionen teilweise rückgängig machen kann (Kirklin et al., 1993; Baretton et al., 2004). Da die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen für die Progression atherosklerotischer Läsionen entscheidend ist, interessiert der Einfluss der Hypercholesterinämie auf diese Proliferation. Im Rahmen dieser Arbeit wird deshalb untersucht, ob und in welchem Umfang eine Vorbehandlung glatter Gefäßmuskelzellen mit Cholesterin eine Freisetzung von bFGF bewirkt, ob Cholesterin über eine Freisetzung von bFGF die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen induziert und dadurch mitogen wirkt und ob es den durch Thrombin hervorgerufenen Anstieg von bFGF in der EZM beeinflusst. Von besonderer Bedeutung

## 1 Einleitung

---

bei den Untersuchungen zur wachstumsstimulierenden Wirkung von Cholesterin sind auch die involvierten Signalwege; insbesondere die Aktivierung des ERK 1/2-Signalweges. Dieser ist ein Weg der intrazellulären Signaltransduktion, über dessen Aktivierung viele Wachstumsfaktoren wie die FGFs Einfluss auf zelluläre Funktionen wie die Proliferation von Zellen nehmen (Cobb et al., 1991). Da die späte Phase der durch Thrombin hervorgerufenen Phosphorylierung von ERK 1/2 in Abhängigkeit von bFGF geschieht, ist zu klären, ob an mit Cholesterin vorbehandelten glatten Gefäßmuskelzellen nach Thrombinstimulation eine signifikant stärkere Phosphorylierung von ERK 1/2 zu beobachten ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden Fragestellungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (i) Welchen Einfluss haben Thrombin, der Wachstumsfaktor bFGF und Cholesterin auf die DNA-Syntheserate glatter Gefäßmuskelzellen?
- (ii) Welche Thrombinrezeptoren sind an der Freisetzung von bFGF aus glatten Gefäßmuskelzellen beteiligt?
- (iii) Welche intrazellulären Signalwege führen zur Freisetzung von bFGF?
- (iv) Löst eine Vorbehandlung glatter Gefäßmuskelzellen mit Cholesterin die Freisetzung von bFGF aus?

### 2 Materialien und Methoden

#### 2.1 Chemikalien und Lösungen sowie Geräte

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien stammten von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & CO.KG (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze) resp. Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim).

Chemikalien und Lösungen:

Aminosäuren, Nicht Essenzielle	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Anti-bFGF	Es handelte sich um aus Kaninchen gewonnene Antikörper. Die Stammlösung mit 60 mg/ml war zu 10 µl aliquotiert.
Antikörper für Western Blots	
Anti-phospho-p44/42-MAPK Antibody	polyklonaler Antikörper, Verdünnung 1:2000 nach Herstellerangabe, Lagerung bei minus 20 Grad Celsius, Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, Massachusetts, USA
Goat anti-rabbit-IgG	polyklonaler Antikörper, Verdünnung 1:4000 nach Herstellerangabe, Lagerung bei plus 4 Grad Celsius, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, USA
APS-Lösung	Carl Roth GmbH & CO.KG, Karlsruhe
bFGF	Die Stammlösung mit 500 µg/ml war zu 2 µl aliquotiert.
bFGF Immunoassay	Quantikine® Human FGF basic Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von bFGF-Konzentrationen in Zellkulturüberständen (Serum oder Plasma), R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
BSA	Lagerung bei plus 2 bis plus 8 Grad Celsius, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cholesterin	Cholesterin zur Verwendung in der Zellkultur, Grundlage: Methyl-β-Cyclodextrin, Lagerung bei minus 20 Grad Celsius, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMEM	Gibco™, Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

## 2 Materialien und Methoden

---

Heparin	Heparin-Natriumsalz, aus intestinaler Schweinemukosa gewonnen, Lagerung bei Raumtemperatur, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Heparin-Waschlösung	10 µg Heparin/ml PBS
Hyperfilm™ ECl	Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
IgG	Das verwendete IgG war ein aus Kaninchen gewonnener unspezifischer Antikörper. Die Stammlösung mit 60 mg/ml war zu 10 µl aliquotiert.
Luminol	Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Methyl-β-Cyclodextrin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methyl-Tritium-Thymidin	PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Rodgau-Jügesheim
Natrium-Pyruvat	Biochrom AG, Berlin
PAR-APs	Die Lagerung der PAR-APs erfolgte bei minus 20 Grad Celsius.
PAR-1-AP (TFFLRN), PAR-3-AP (TFRGAP), PAR-4-AP (AYPGQV)	GL Biochem, Shanghai, China
PAR-2-AP (SLIGKV)	Biosyntan GmbH, Berlin
PBS	Gibco™, Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe
Penicillin G	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Proteinmarker	Biotin-konjugierter hochmolekularer Proteinstandard, Lagerung bei plus 4 Grad Celsius, New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, USA
Puffer	
Blottingpuffer	25 mM Tris / 190 mM Glycin / 20 Vol.-% Methanol
Lysepuffer	25 mM HEPES (pH 7,5) / 150 mM NaCl / 5 mM EDTA / 5 mM EGTA / 0,1 Vol.-% 2-Mercaptoethanol / 1 Vol.-% Triton-X100 / 2 mM PMSF
Laemmlipuffer	125 mM NaHPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer (pH 7,4) / 100 mM DL-Dithio-threitol / 20 Vol.-% Glycerin / 4 Gew.-% SDS / 0,002 Vol.-% Bromphenolblau
Laufpuffer	25 mM Tris / 190 mM Glycin / 0,1 Gew.-% SDS
Sammelgelpuffer	0,5 mM Tris/HCl (pH 6,8)

Trenngelpuffer	1,5 mM Tris/HCl (pH 8,8)
Transferpuffer	25 mM Tris / 0,2 M Glycin / 20 Vol.-% Methanol (pH 8,5)
Waschpuffer	TBS (1x) / 0,1 Vol.-% Tween® 20
PVDF-Membran	Immobilon-P Transfer Membrane, Porengröße: 0,45 µm, Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA
Rottlerin	Die Substanz wurde mit Ethanol verdünnt. Es wurde eine Stoffmenge von 1 µM eingesetzt. Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Szintillationscocktail	Lumasafe™ Plus, Lumac LSC, Groningen, Niederlande
TBS (10x)	100mM Tris/HCl (pH 7,4) / 1,5 M NaCl
TBST	10 mM Tris/HCl (pH 7,4) / 150 mM NaCl / 0,1 Vol.-% Tween® 20
TBSTM	TBST / 5 Gew.-% Milchpulver
Thrombin	Das verwendete Thrombin war gereinigtes menschliches α-Thrombin. Die Stammlösung mit 2000 U/ml war zu 10 µl aliquotiert.
Tween® 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Y-27632	Der Inhibitor Y-27632 wurde in Wasser gelöst, und es wurde eine Stoffmenge von 1 µM eingesetzt. Merck KGaA, Darmstadt
Geräte:	
Blotting-Kammer	SEMI-PHOR™, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, California, USA
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero, Heraeus Holding GmbH, Hanau
Fotometer	Microplate Reader, Model 550, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gel- und Laufkammer	Bio-Rad Mini PROTEAN™ Elektrophorese-Kammer Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Szintillationsgefäße	Packard Bioscience, Groningen, Niederlande
Szintillationszähler	LS6000IC/LS6500 Szintillationszähler, Beckman Coulter, Fullerton, California, USA

### 2.2 Zellen

Die verwendeten Zellen waren arterielle und venöse glatte Gefäßmuskelzellen des Menschen. Diese wurden entweder käuflich erworben oder selbst gezüchtet. Bei den venösen glatten Gefäßmuskelzellen handelte es sich um nicht benötigte Reste von Gefäßpräparaten der V. saphena von Patienten, die an der hiesigen Klinik für Thorax- und Kardiovaskuläre Chirurgie einer kardiovaskulären Bypass-Operation unterzogen wurden. Die Präparation der Zellen erfolgte nach der von Fallier-Becker et al. beschriebenen Methode (Fallier-Becker et al., 1990), und die Kultivierung der Zellen fand bei einer Temperatur von 37 Grad Celsius und einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5 % statt. Das Nährmedium enthielt folgende Komponenten: Aminosäuren, Nicht Essenzielle (100x); DMEM; 15 % FBS; 4,5 g/l Glucose; L-Glutamin (100x); Natrium-Pyruvat (100 mM); Penicillin G (10 000 U/ml); Streptomycin (10 mg/ml) bei einem pH-Wert von 7,4. Alle bei diesen Untersuchungen verwendeten Zellen befanden sich zwischen Passage 4 und Passage 9.

Um aus den aliquotierten Stammlösungen die zur Stimulation benötigten Verdünnungen herzustellen, wurde - soweit nicht anders angegeben - eine Lösung aus PBS, BSA und HCl verwendet. 0,1 g BSA wurden in 100 ml PBS gelöst und mit 100 µl 37 %iger HCl vermischt.

### 2.3 Messung der Deoxyribonucleic Acid-Syntheserate (DNA-Syntheserate)

Die Messung der DNA-Syntheserate wurde durchgeführt, um die mitogene Aktivität von Thrombin, bFGF und Cholesterin zu quantifizieren (s. Kap. 2.6.1 bis 2.6.3 und Kap. 3.1 bis 3.3). Die Quantifizierung der DNA-Syntheserate erfolgt durch die Bestimmung der Einbaurate einer radioaktiv markierten Base, des Thymidins. Als radioaktiver Marker dient das Tritium, das sich am Methylrest des Thymidins befindet. Das Methyl-Tritium-Thymidin wandelt sich beim Einbau in die DNA der Zelle zu Tritium-5-Hydroxymethyl-2'-Desoxyuridin um. Dabei wird  $\beta$ -minus-Strahlung frei, die mittels Szintillationszähler nachgewiesen und gemessen wird. Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden auf 24-Well-Platten aufgebracht und zunächst für 48 Stunden mit serumfreiem Medium inkubiert, um ihren Zellzyklus zu synchronisieren. Das serumfreie Medium wurde nach 24 Stunden erneuert; die Volumina betragen 250 µl pro Well. Danach befanden sich die Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase, und es erfolgte die Stimulation der Zellen. Nach der Stimulation wurden die Zellen für 20 Stunden im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Methyl-Tritium-Thymidin hinzugegeben. Die Stammlösung des verwendeten Methyl-Tritium-Thymidins hatte eine Aktivität von 1 mCi/ml, was einer Radioaktivität von 37,0 MBq/ml entspricht. Es wurde ein Volumen von

10 µl Methyl-Tritium-Thymidin-Lösung mit einer Aktivität von 1 µCi/ml in jedes Well gegeben, so dass in jedem Well eine Aktivität von 0,25 µCi vorhanden war. Danach wurden die Zellen vier Stunden lang weiter inkubiert.

Aufbereitung der glatten Gefäßmuskelzellen:

Hierzu wurde das Medium aus jedem Well abgesaugt und jedes Well zweimal mit 1 ml eiskalter PBS gewaschen. Daraufhin wurden 300 µl eiskalte 0,3 M Perchlorsäure - chemische Formel:  $\text{HClO}_4$  - jedem Well zugesetzt und die Platten 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.  $\text{HClO}_4$  diente zur Auflösung der Zellen und zur Präzipitation der DNA. Anschließend wurde jedes Well einmal mit eiskalter PBS gewaschen, diese wurde dann abgesaugt, und es wurden 300 µl 0,1 M Natronlauge - chemische Formel:  $\text{NaOH}$  - in jedes Well gegeben. Der Zusatz von  $\text{NaOH}$  diente dazu, den durch  $\text{HClO}_4$  abgefallenen pH-Wert wieder anzuheben und die präzipitierte DNA vom Boden der Wells abzulösen. Nach dem Zusatz von  $\text{NaOH}$  wurden die Zellen 45 Minuten lang bei 37 Grad Celsius unter leichtem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss daran wurde der komplette Inhalt eines jeden Wells in ein Szintillationsröhrchen überführt, dieses mit 4,7 ml Szintillationscocktail aufgefüllt und der Inhalt der Röhrchen durchmischt.

Messung der DNA-Syntheserate:

Die Messung erfolgte mittels Flüssigkeitsszintillations-Spektrometrie im Szintillationszähler als Dreifachbestimmung. Die Radioaktivität wurde als Zerfälle pro Minute (CPM) quantifiziert. Die auftretenden Lichtsignale wurden in jedem Szintillationsröhrchen für jeweils 3 Minuten gemessen. Für die Auswertung der Experimente wurde die nicht stimulierte Kontrolle jeweils gleich 1,00 gesetzt, und alle übrigen Messwerte wurden auf diesen Kontrollwert bezogen.

### 2.4 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Die Methode ELISA wurde zum Nachweis und zur Quantifizierung von bFGF herangezogen (s. Kap. 2.6.4 bis 2.6.8 und Kap. 3.4 bis 3.8).

Aufbereitung der glatten Gefäßmuskelzellen:

Nach erfolgter Stimulation wurden das serumfreie Medium (500 µl) und die stimulierende Substanz (5 µl) aus den einzelnen Wells in Eppendorf-Cups (1,5 ml), in denen sich jeweils 10 µl PMSF befanden, überführt. PMSF ist ein Protease-Inhibitor und diente dazu, bFGF vor Zerstörung durch Proteasen zu bewahren. Die Eppendorf-Cups mit dem Medium wurden umgehend bei minus 80 Grad Celsius eingefroren (Medium-Proben). Nach dem Einfrieren

## 2 Materialien und Methoden

---

wurden die Wells mit je 250  $\mu$ l Heparin-Waschlösung, die Raumtemperatur besaß, aufgefüllt. Das Heparin hatte die Aufgabe, den infolge der Stimulation aus den Zellen in die EZM freigesetzten Wachstumsfaktor bFGF durch dessen Bindung aus der Matrix herauszuwaschen. Die Platten mit der Heparin-Waschlösung wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Rüttler leicht in Bewegung gehalten. Nach dieser Zeit wurde die Heparin-Waschlösung in Eppendorf-Cups (1,5 ml), in denen jeweils 5  $\mu$ l PMSF waren, pipettiert, und die Proben wurden umgehend bei minus 80 Grad Celsius eingefroren (Heparin-Proben). Im Anschluss daran erfolgte das Waschen der am Boden der Wells haftenden Zellen mit PBS. Nach dem Waschen wurden die Zellen im Brutschrank bei plus 37 Grad Celsius mit 250  $\mu$ l Trypsin-EDTA inkubiert. Nachdem die Zellen abgelöst waren, wurden in jedes Well zum Trypsin-EDTA 250  $\mu$ l PBS dazugegeben. Diese Lösung wurde dann in Eppendorf-Cups (1,5 ml) pipettiert. Anschließend wurden die Zellen, die sich in jeweils 10  $\mu$ l Volumen befanden, mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die hierbei ermittelte Zellzahl war zum einen der Bezugspunkt bei der Berechnung der von den Zellen aufgrund der Stimulation abgegebenen Menge von bFGF und diente zum anderen der Kontrolle, dass die Zellen nicht zerstört worden waren. Im Falle ihrer Zerstörung hätte sich die Zellzahl unversehrter Zellen vermindert. Nach der Zählung wurden die Eppendorf-Cups mit der darin enthaltenen Zelllösung 30 Sekunden lang bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren entstand am Boden der Eppendorf-Cups ein Pellet, ein kleiner Zellhaufen. Der Überstand wurde abgesaugt, so dass nur noch das Pellet im Eppendorf-Cup übrig blieb. Um es aufzulösen, wurden 250  $\mu$ l Lysepuffer mit 1 % PMSF auf es gegeben. Durch das Auflösen wurden alle intrazellulären Bestandteile freigesetzt. Schließlich wurde der Inhalt der Eppendorf-Cups durch Schütteln gemischt, und die Proben wurden bei minus 80 Grad Celsius eingefroren (Lysat-Proben).

Nachweis und Quantifizierung von bFGF:

Der Nachweis und die Quantifizierung von bFGF, dem zu bestimmenden Antigen, erfolgte mit Quantikine® Human FGF basic Immunoassay bei Raumtemperatur.

Zunächst wurden die Standards für die Eichgerade hergestellt. Dazu wurde FGF basic Standard in 2 ml Calibrator Diluent RD5-14 aufgelöst. Dadurch entstand eine Stammlösung, die 640 pg bFGF/ml Calibrator Diluent RD5-14 enthielt (im Folgenden: pg bFGF/ml Calibrator Diluent RD5-14 = pg/ml). 500  $\mu$ l dieser Stammlösung wurden in ein Eppendorf-Cup, in dem 500  $\mu$ l Calibrator Diluent RD5-14 vorgelegt waren, pipettiert und gründlich gemischt. Durch diesen Verdünnungsschritt entstand eine Lösung von 320 pg/ml. Aus dieser Lösung wurden

500 µl in einem weiteren Eppendorf-Cup mit 500 µl Calibrator Diluent RD5-14 gemischt. Die neue Lösung enthielt 160 pg/ml. Diese Verdünnungen im Verhältnis 1:2 wurden so lange fortgesetzt, bis eine Lösung von 10 pg/ml hergestellt war. Die zur Erstellung der Eichgerade verwendeten Standards enthielten also 10, 20, 40, 80, 160, 320 und 640 pg/ml. Als Nullstandard diente Calibrator Diluent RD5-14. Der nächste Arbeitsschritt bestand darin, in jedes Well, in dem die Standards und Proben gemessen werden sollten, 100 µl Assay Diluent RD1-43 vorzulegen. Danach wurden in die so vorbereiteten Wells die Standards und Proben auf das Assay Diluent RD1-43 pipettiert. Eingesetzt wurden 100 µl der Standards und Proben, bei der Messung der Proben des Zell-Lysats jedoch nur 2 µl. Die im Vergleich zu den anderen Proben in den Wells mit den Proben des Zell-Lysats fehlenden 98 µl wurden durch Calibrator Diluent RD5-14 ausgeglichen. Nach dem Aufbringen der Standards und Proben wurden die Wells für 2 Stunden inkubiert. In dieser Zeit wurde bFGF - sofern in den Proben vorhanden - vom ersten Antikörper gebunden. Nach den 2 Stunden wurden die Wells entleert und mit Waschpuffer gewaschen. Dann wurden 200 µl FGF basic Conjugate - das ist der zweite Antikörper - in jedes Well gefüllt, und es folgte wiederum eine zweistündige Inkubation. Nach dem letzten Waschschrift wurden in jedes Well 200 µl Substrate Solution mit einer Multi-Well-Pipette pipettiert. Die Substrate Solution setzte sich aus gleichen Anteilen von Color Reagent A und Color Reagent B zusammen. Nach Zugabe der Substrate Solution lief die enzymatische Reaktion ab. Nach einer halben Stunde - das Vorhandensein von bFGF wurde durch eine blaue Färbung der in den Wells sich befindenden Substrate Solution angezeigt - wurden in jedes Well 50 µl Stop Solution mit einer Multi-Well-Pipette gegeben. Die Zugabe der Stop Solution beendete den Ablauf der enzymatischen Reaktion und bewirkte einen Wechsel der Färbung von blau nach gelb. Unmittelbar nach Zugabe der Stop Solution wurde die Messung der Extinktion mittels eines Fotometers, an das ein PC mit Bio-Rad-Microplate Software angeschlossen war, durchgeführt. Die fotometrische Bestimmung der Proben erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Das Programm erstellte einen Raw Data Report mit der für jedes Well gemessenen Extinktion und einen Curve Fit Report, der zum einen die erstellte Eichgerade und zum anderen die Werte der Extinktion beinhaltete, von denen jeweils die für das Well des Nullwertes gemessene Extinktion subtrahiert und denen eine Antigenmenge in pg/ml zugeordnet worden war. Da für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde, wurde aus den beiden vom PC-Programm angegebenen Antigenmengen in pg/ml der Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert wurde bei den Medium- und Heparin-Proben der venösen glatten Gefäßmuskelzellen mit dem Faktor 2,5 multipliziert, da

## 2 Materialien und Methoden

---

er die Antigenmenge für 100  $\mu\text{l}$  angab, in jedem Well sich jedoch 250  $\mu\text{l}$  Heparin-Waschlösung befanden, und anschließend durch 4 dividiert, um die Antigenmenge in pg zu erhalten. Der so gewonnene Wert wurde durch die bei der Gewinnung der Proben ermittelte Zellzahl in den einzelnen Wells dividiert und dann mit  $10^6$  multipliziert. So erhält man zunächst das von einer Zelle und dann das von einer Million Zellen abgegebene bFGF in pg.

### 2.5 Western-Blotting-Methode

Die Western-Blotting-Methode wurde herangezogen, um eine Phosphorylierung von ERK 1/2 in mit Cholesterin vorbehandelten und mit Thrombin stimulierten glatten Gefäßmuskelzellen darzustellen und zu quantifizieren (s. Kap. 2.6.9 und Kap. 3.9).

Aufbereitung der glatten Gefäßmuskelzellen:

Nach Stimulation der glatten Gefäßmuskelzellen wurde das serumfreie Medium (500  $\mu\text{l}$ ) aus den Wells abgesaugt, und die einzelnen Wells wurden mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden in jedes Well 40  $\mu\text{l}$  Lysepuffer und 20  $\mu\text{l}$  Laemmli-Puffer (2x) pipettiert. Die beiden Puffer bewirkten eine Zell-Lyse. Das Zell-Lysat wurde mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturplatten abgelöst, in Eppendorf-Cups (1,5 ml) überführt und dann 5 Minuten lang bei plus 95 Grad Celsius erhitzt. Durch das Erhitzen denaturierten die Proteine. Vorhandene Disulfidbrücken wurden reduktiv gespalten, die Proteine linearisiert und negativ aufgeladen. Nach 30-sekündigem Zentrifugieren wurden die Proben bei minus 20 Grad Celsius eingefroren. Vor der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die Proben auf plus 95 Grad Celsius erhitzt.

Elektrophoretische Auftrennung der Proteine:

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach dem Prinzip der Gelelektrophorese (Laemmli 1970). Dazu wurden zwei verschiedene Gele gegossen: Trenngel und Sammelgel. Ein Trenngel enthielt: 1,875 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris), pH 8,8; 3,05 ml Wasser, 2,5 ml 30 %ige Acrylamid-Lösung; 0,075 ml 10 %ige SDS-Lösung; 0,075 ml 10 %ige APS-Lösung; 0,014 ml TEMED. Ein Sammelgel hatte folgende Bestandteile: 0,625 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris), pH 6,8; 1,5375 ml Wasser; 0,3125 ml 30 %ige Acrylamid-Lösung; 0,025 ml 10 %ige SDS-Lösung; 0,025 ml 10 %ige APS-Lösung; 0,0035 ml TEMED. Im elektrischen Feld der Laufkammer erfolgte die Auftrennung der Proteine (Silbey et al., 2005). Zunächst bildete sich im Sammelgel eine als blaue Linie sichtbare Proteinfront. Nach ungefähr 20 Minuten stieß diese Proteinfront auf das Trenngel, in dem die Proteine aufgetrennt wurden.

Nach dem Gellauf waren die aufgetrennten Proteine des Proteinmarkers als bunte Banden im Gel sichtbar.

Proteintransfer:

Die im Trenngel aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran aufgebracht. Diese Membran wurde zunächst 10 Sekunden in Methanol gelegt, danach 10 Sekunden in Wasser geschwenkt und schließlich in Blotting-Puffer resp. Transfer-Puffer getränkt. Der Proteintransfer vom Trenngel auf die Membran erfolgte ca. 50 Minuten lang in einer Blotting-Kammer im Semi-Dry-Verfahren bei einer Spannung von ca. 12 V und einer Stromstärke von 600 mA.

Behandlung der Membranen mit Antikörpern:

Die geblotteten Membranen wurden für eine Stunde in TBSTM gewaschen. Dadurch wurde die Blockade unspezifischer Bindungsstellen bewirkt. Nach Abschütten von TBSTM wurden die Membranen mit dem entsprechend der Herstelleranweisung verdünnten Erstantikörper bei plus 4 Grad Celsius über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Erstantikörper abgeschüttet, und jede Membran wurde dreimal für jeweils 20 Sekunden in TBST(1x) gewaschen. Danach wurde für 45 Minuten der Zweitantikörper, der an den Erstantikörper bindet, aufgetragen. Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde dieser abgeschüttet, und die Membran wurde dreimal für jeweils 20 Minuten in TBST(1x) gewaschen.

Behandlung der Membranen mit Luminol und Belichtung von Fotopapieren:

Auf jede Membran, an die Erst- und Zweitantikörper gebunden waren, wurde 1 ml Luminol aufgetragen, das am Zweitantikörper eine Lichtreaktion hervorrief. Nach 5 Minuten wurden in der Dunkelkammer Fotopapiere durch Auflegen auf die Membranen belichtet, und dann wurden sie entwickelt, gewaschen und fixiert. Die Belichtung erfolgte je nach der Stärke des Lichtsignals in einem Zeitraum von 15 Sekunden bis zu 45 Minuten. Danach waren auf dem Fotopapier Banden sichtbar. Anschließend erfolgte die Auswertung der Banden durch Messung ihrer optischen Dichte und Vergleich der Messwerte mittels Quantity One Software (Version 4.1.1, Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

### 2.6 Versuchsprotokolle

Es folgt die Beschreibung der Experimente zur Messung der DNA-Syntheserate (s. Kap. 2.6.1 bis 2.6.3). Im Anschluss daran werden die Experimente vorgestellt, deren Probenauswertung mittels ELISA erfolgte (s. Kap. 2.6.4 bis 2.6.8). Und schließlich wird auf das Expe-

riment eingegangen, bei dem die Western-Blotting-Methode angewendet wurde (s. Kap. 2.6.9).

### 2.6.1 Einfluss von Thrombin auf die DNA-Syntheserate

Venöse glatte Gefäßmuskelzellen wurden in einer Dichte von 10 000 Zellen/Well auf 24-Well-Platten ausgesät. Waren die Zellen konfluent gewachsen, wurden sie 20 Stunden vor Zugabe von Methyl-Tritium-Thymidin und 24 Stunden vor Messung der DNA-Syntheserate mit den folgenden Substanzen stimuliert: Thrombin (3 U/ml); Thrombin (3 U/ml) + Anti-bFGF (Konzentration: 3, 10, 30 und 100 µg/ml); Thrombin (3 U/ml) + IgG (30 µg/ml); Thrombin (3 U/ml) + Heparin (100 µg/ml); Anti-bFGF (30 µg/ml); IgG (30 µg/ml); Heparin (100 µg/ml).

### 2.6.2 Einfluss von bFGF auf die DNA-Syntheserate

Das Aussäen und die Stimulation der Zellen erfolgten wie für Thrombin beschrieben (s. Kap. 2.6.1). Bezüglich des Einflusses von bFGF auf die DNA-Syntheserate wurde der Effekt folgender Substanzen untersucht: bFGF (1 ng/ml); bFGF (1 ng/ml) + Anti-bFGF (30 µg/ml); bFGF (1 ng/ml) + IgG (30 µg/ml); bFGF (1 ng/ml) + Heparin (100 µg/ml); Anti-bFGF (30 µg/ml); IgG (30 µg/ml); Heparin (100 µg/ml).

### 2.6.3 Einfluss von Cholesterin auf die DNA-Syntheserate

Arterielle glatte Gefäßmuskelzellen wurden in einer Dichte von 10 000 Zellen/Well auf 24-Well-Platten ausgesät. Waren die Zellen konfluent gewachsen, erfolgte ihre Stimulation mit Thrombin (3 U/ml), Anti-bFGF (30 µg/ml) und IgG (30 µg/ml). 24 Stunden vor Stimulation wurden die Zellen in den jeweiligen Wells mit Cholesterin (10 µg/ml) oder mit Methyl-β-Cyclodextrin (10 µg/ml) behandelt. 20 Stunden nach Stimulation und 4 Stunden vor Messung der DNA-Syntheserate wurde Methyl-Tritium-Thymidin in die Wells hinzugegeben. Bezüglich des Einflusses auf die DNA-Syntheserate wurde der Effekt folgender Substanzen untersucht: Cholesterin; Methyl-β-Cyclodextrin; Thrombin; Thrombin + Cholesterin; Thrombin + Methyl-β-Cyclodextrin; Thrombin + Anti-bFGF; Thrombin + Cholesterin + Anti-bFGF; Thrombin + Methyl-β-Cyclodextrin + Anti-bFGF; Thrombin + IgG; Thrombin + Cholesterin + IgG; Thrombin + Methyl-β-Cyclodextrin + IgG; Anti-bFGF; Cholesterin + Anti-bFGF; Methyl-β-Cyclodextrin + Anti-bFGF; IgG; Cholesterin + IgG; Methyl-β-Cyclodextrin + IgG.

### 2.6.4 Zeitverlauf des Anstiegs der Freisetzung von bFGF

Venöse glatte Gefäßmuskelzellen wurden in einer Dichte von 40 000 Zellen/Well auf 12-Well-Platten ausgesät. Waren die Zellen konfluent gewachsen, wurde Thrombin (3 U/ml) in den zeitlichen Abständen von 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten sowie von 1, 2, 4, 8, 16 und 24 Stunden hinzugegeben.

### 2.6.5 Beteiligung der PARs an der Freisetzung von bFGF

Venöse glatte Gefäßmuskelzellen wurden in einer Dichte von 40 000 Zellen/Well auf 12-Well-Platten ausgesät. Waren die Zellen konfluent gewachsen, erfolgte ihre Stimulation mit PAR-1-AP, PAR-2-AP, PAR-3-AP oder PAR-4-AP - und zwar mit jeweils 100  $\mu$ M über einen Zeitraum von je 10 Minuten.

### 2.6.6 Einfluss von Y-27632 auf die Freisetzung von bFGF

Venöse glatte Gefäßmuskelzellen wurden in einer Dichte von 40 000 Zellen/Well auf 12-Well-Platten ausgesät. Waren die Zellen konfluent gewachsen, wurden sie für 10 Minuten mit Thrombin stimuliert. Die Eppendorf-Cups, in denen sich der lichtempfindliche Inhibitor befand, waren mit Alufolie umwickelt. Für die Zeit der Zugabe wurde der Raum abgedunkelt. Und die Zellen wurden 1 Stunde lang mit dem Inhibitor vorbehandelt. Folgende Proben wurden gewonnen: Thrombin (3 U/ml); Thrombin (3 U/ml) + Y-27632 (1  $\mu$ M); Y-27632 (1  $\mu$ M).

### 2.6.7 Einfluss von Rottlerin auf die Freisetzung von bFGF

Das Aussäen und die Stimulation der Zellen wurden wie für Y-27632 beschrieben durchgeführt (s. Kap. 2.6.6). Folgende Proben wurden gewonnen: Thrombin (3 U/ml); Thrombin (3 U/ml) + Rottlerin (1  $\mu$ M); Rottlerin (1  $\mu$ M).

### 2.6.8 Einfluss von Cholesterin auf die Freisetzung von bFGF

Venöse und arterielle glatte Gefäßmuskelzellen wurden in einer Dichte von 40 000 Zellen/Well auf 12-Well-Platten ausgesät. Waren die Zellen konfluent gewachsen, wurden sie 24 Stunden lang mit Cholesterin (10  $\mu$ g/ml) oder Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (10  $\mu$ g/ml) vorbehandelt. Die mit Cholesterin vorbehandelten venösen glatten Gefäßmuskelzellen, bei denen der Einfluss der Inhibitoren Y-27632 (1  $\mu$ M) und Rottlerin (1  $\mu$ M) auf die Freisetzung von bFGF untersucht werden sollte, wurden für 1 Stunde mit den Inhibitoren behandelt und dann

## 2 Materialien und Methoden

---

für 10 Minuten mit Thrombin (3 U/ml) stimuliert. Folgende Proben wurden gewonnen: Thrombin; Cholesterin; Thrombin + Cholesterin; Thrombin + Cholesterin + Y-27632; Thrombin + Cholesterin + Rottlerin; Thrombin + Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin; Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin.

### 2.6.9 Einfluss von Thrombin und Cholesterin auf die ERK 1/2-Phosphorylierung

Venöse glatte Gefäßmuskelzellen wurden in einer Dichte von 40 000 Zellen/Well auf 12-Well-Platten ausgesät. Waren die Zellen konfluent gewachsen, wurden sie für 24 Stunden mit Cholesterin (10  $\mu$ g/ml) oder mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (10  $\mu$ g/ml) inkubiert. Die Stimulation der Zellen mit Thrombin (3 U/ml) erfolgte in zeitlichen Abständen von 5 und 15 Minuten und von 4 Stunden. Folgende Proben wurden gewonnen: Cholesterin; Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin; Thrombin; Thrombin + Cholesterin; Thrombin + Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin.

### 2.7 Statistische Auswertung

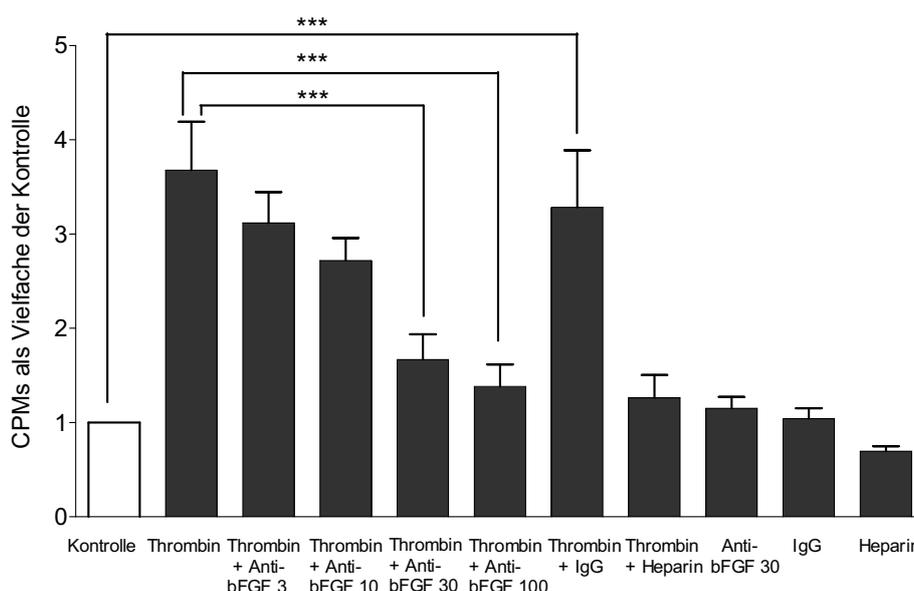
Die im Ergebnisteil (s. Kap. 3) in Balkendiagrammen dargestellten Daten basieren auf mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Messdaten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes der Einzelexperimente (SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau  $p$  für  $\alpha$  ist mindestens 0,05. Die Signifikanzunterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden mittels One Way Analysis of Variance (ANOVA) und anschließenden Bonferroni-Tests überprüft. Die statistische Auswertung der Experimente wurde mit dem Software Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Version 4.0, San Diego, California, USA) vorgenommen.

In den folgenden Abbildungen werden die p-Werte folgendermaßen dargestellt: „n.s.“  $\geq 0,05$ , \*  $< 0,05$ , \*\*  $< 0,01$ , \*\*\*  $< 0,001$ .

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von Thrombin auf die DNA-Syntheserate

Die Stimulation venöser glatter Gefäßmuskelzellen mit Thrombin (3 U/ml) führt zu einer signifikanten Steigerung der DNA-Syntheserate der Zellen. Die Zugabe eines Antikörpers, der gegen den Wachstumsfaktor bFGF gerichtet ist und dessen Wirkung neutralisiert - Anti-bFGF (30 µg/ml, 100 µg/ml) -, senkt die durch Thrombin hervorgerufene Steigerung der DNA-Syntheserate (s. Abb. 4).



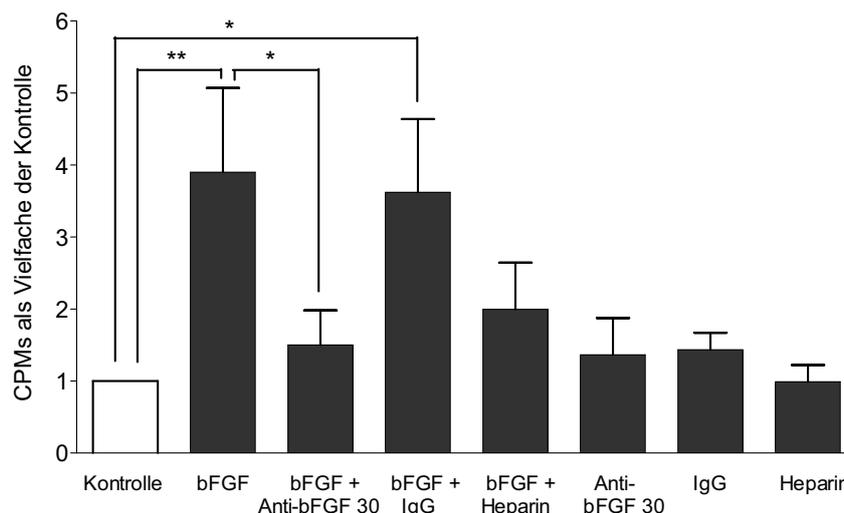
**Abb. 4:** Einfluss von Thrombin (3 U/ml) auf die DNA-Syntheserate venöser glatter Gefäßmuskelzellen. Die Inkubation der glatten Gefäßmuskelzellen mit dem Antikörper Anti-bFGF (30 µg/ml, 100 µg/ml) senkt die Thrombin-induzierte DNA-Syntheserate. Thrombin entfaltet seine mitogene Aktivität durch den Wachstumsfaktor bFGF. n = 4

Die Inkubation der Zellen mit IgG (30 µg/ml), einem unspezifischen Antikörper, hat keinen Einfluss auf die DNA-Syntheserate, da Thrombin diese in An- wie in Abwesenheit von IgG signifikant steigert. Heparin (100 µg/ml), das den Wachstumsfaktor bFGF bindet und durch diese Bindung inaktiviert, verhindert den durch Thrombin ausgelösten Anstieg der DNA-Syntheserate. Die alleinige Inkubation der Zellen mit Anti-bFGF (30 µg/ml), IgG (30 µg/ml) oder Heparin (100 µg/ml) diente zur Kontrolle. Keine dieser Substanzen übt jedoch einen mitogenen Effekt aus.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die von Thrombin hervorgerufene Steigerung der DNA-Syntheserate venöser glatter Gefäßmuskelzellen durch die mitogene Aktivität des Wachstumsfaktors bFGF vermittelt wird.

#### 3.2 Einfluss von bFGF auf die DNA-Syntheserate

Die Stimulation venöser glatter Gefäßmuskelzellen mit bFGF (1 ng/ml) führt zu einer signifikanten Steigerung der DNA-Syntheserate der Zellen. Werden die mit bFGF stimulierten Zellen zusätzlich mit dem Antikörper Anti-bFGF (30 µg/ml), der die Wirkung von bFGF neutralisiert, behandelt, kommt es zu einer signifikanten Senkung der DNA-Syntheserate (s. Abb. 5).

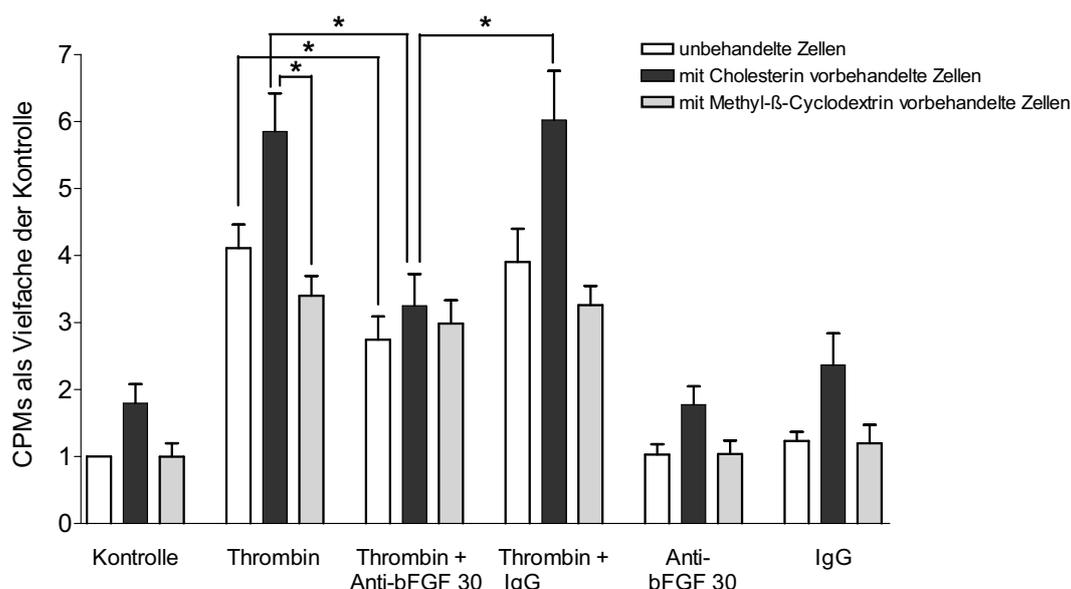


**Abb. 5:** Einfluss von bFGF (1 ng/ml) auf die DNA-Syntheserate venöser glatter Gefäßmuskelzellen. bFGF besitzt eine mitogene Aktivität und steigert die DNA-Syntheserate glatter Gefäßmuskelzellen. n = 4

Die Inkubation der Zellen mit dem unspezifischen Antikörper IgG (30 µg/ml) beeinflusst die mitogene Aktivität der Zellen nach Stimulation mit bFGF (1 ng/ml) nicht. Vielmehr steigert der Wachstumsfaktor bFGF die DNA-Syntheserate in An- wie in Abwesenheit von IgG signifikant. Heparin (100 µg/ml), das bFGF bindet und infolgedessen inaktiviert, hemmt die mitogene Wirkung von bFGF. Die Inkubation der Zellen nur mit dem spezifischen Antikörper Anti-bFGF (30 µg/ml), mit dem unspezifischen Antikörper IgG (30 µg/ml) und mit Heparin (100 µg/ml), die zur Kontrolle eines die Proliferation steigernden Effektes der Substanzen durchgeführt wurden, hat keinen Einfluss auf die DNA-Syntheserate. Diese Ergebnisse belegen, dass der Wachstumsfaktor bFGF die Zellen zur Proliferation anregt.

#### 3.3 Einfluss von Cholesterin auf die DNA-Syntheserate

Werden arterielle glatte Gefäßmuskelzellen für einen Zeitraum von 24 Stunden mit Cholesterin (10 µg/ml) vorbehandelt, so weisen sie im Gegensatz zu nicht vorbehandelten Zellen (Kontrolle) eine leichte Erhöhung der DNA-Syntheserate auf (s. Abb. 6).



**Abb. 6:** Verstärkung der Thrombin-induzierten (3 U/ml) Steigerung der DNA-Syntheserate arterieller glatter Gefäßmuskelzellen durch Cholesterin (10 µg/ml). Cholesterin fördert unter Vermittlung des Wachstumsfaktors bFGF die Thrombin-induzierte Steigerung der DNA-Syntheserate. n = 8

Die Thrombinstimulation (3 U/ml) der mit Cholesterin (10 µg/ml) vorbehandelten Zellen führt zu einer Steigerung der DNA-Syntheserate, die signifikant höher ist als die durch Thrombin (3 U/ml) hervorgerufene Steigerung der DNA-Syntheserate an nicht vorbehandelten Zellen. Werden die Zellen 24 Stunden lang mit Methyl-β-Cyclodextrin (10 µg/ml) vorbehandelt, vermindert sich die durch Stimulation mit Thrombin (3 U/ml) hervorgerufene Steigerung der DNA-Syntheserate leicht. Cholesterin verstärkt also die mitogene Wirkung von Thrombin massiv.

Werden die mit Cholesterin (10 µg/ml) vorbehandelten Zellen zusätzlich mit dem Antikörper Anti-bFGF (30 µg/ml) inkubiert, dann wird die Thrombin-induzierte Steigerung der DNA-Syntheserate signifikant gesenkt. Die gleiche Wirkung von Anti-bFGF (30 µg/ml) lässt sich bei den nicht vorbehandelten Zellen nach deren Stimulation mit Thrombin (3 U/ml) beobachten. Bei den mit Methyl-β-Cyclodextrin (10 µg/ml) vorbehandelten Zellen beeinflusst der spezifische Antikörper Anti-bFGF (30 µg/ml) die DNA-Syntheserate nach Stimulation mit Thrombin (3 U/ml) nicht. Die Verstärkung der Thrombin-induzierten DNA-Syntheserate durch Cholesterin wird also durch den Wachstumsfaktor bFGF bewirkt.

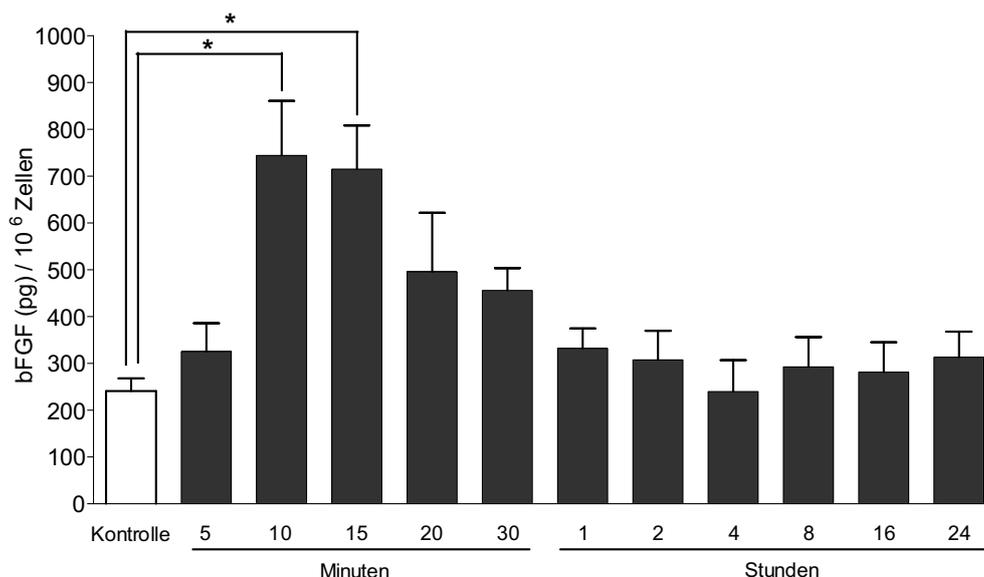
Die Inkubation der Zellen mit dem unspezifischen Antikörper IgG (30 µg/ml) diente zur Kontrolle der spezifischen Wirkung von Anti-bFGF. IgG beeinflusst die Thrombin-induzierte Steigerung der DNA-Syntheserate nicht. Zudem hat weder die alleinige Inkubation der Zellen mit Anti-bFGF (30 µg/ml) noch die mit IgG (30 µg/ml) einen Einfluss auf die

### 3 Ergebnisse

DNA-Syntheserate von entweder unbehandelten oder mit Cholesterin (10 µg/ml) oder mit Methyl-β-Cyclodextrin (10 µg/ml) vorbehandelten Zellen.

#### 3.4 Zeitverlauf des Anstiegs der Freisetzung von bFGF

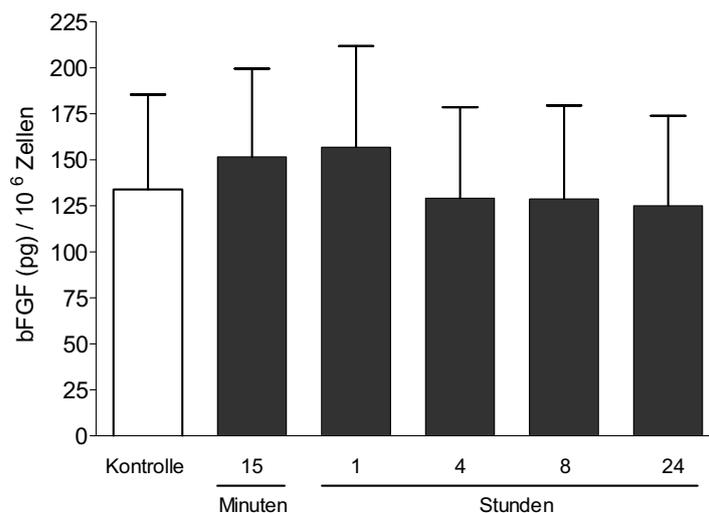
Die in der EZM venöser glatter Gefäßmuskelzellen messbare Menge des Wachstumsfaktors bFGF ist abhängig von der Stimulationsdauer der Zellen mit Thrombin (s. Abb. 7).



**Abb. 7:** Zeitverlauf der Freisetzung von bFGF in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer venöser glatter Gefäßmuskelzellen mit Thrombin (3 U/ml). Die Freisetzung von bFGF ist nach 10- und nach 15-minütiger Thrombinstimulation am höchsten. n = 5

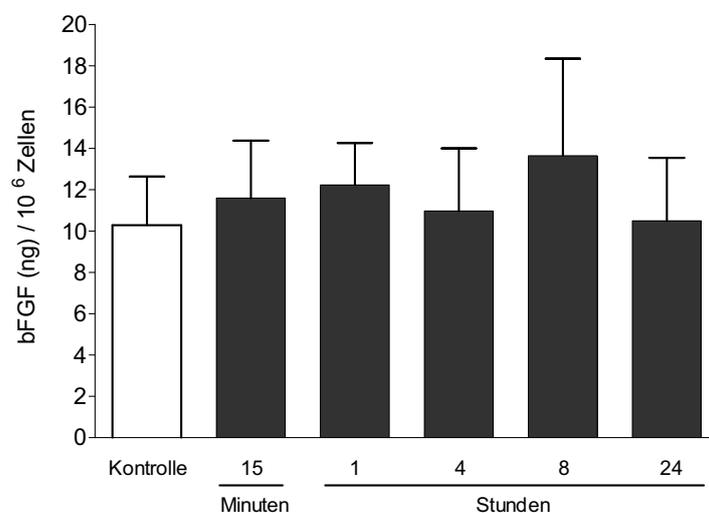
Nach 30-minütiger und 20-minütiger Thrombinstimulation (3 U/ml) steigt die Menge des Wachstumsfaktors bFGF an. Nach 15 Minuten und 10 Minuten ist die Menge von bFGF in der EZM signifikant am höchsten. Deshalb wurde auch das Zeitintervall der Stimulation von 10 Minuten in den folgenden Experimenten beibehalten (s. Kap. 3.5 bis 3.9). Die Stimulation der Zellen über 5 Minuten sowie über längere Zeitintervalle - von 1 Stunde bis zu 24 Stunden - bewirkt keinen signifikanten Anstieg von bFGF in der EZM.

Die im Zellmedium gemessenen Mengen von bFGF sind nach einer Stimulation der venösen glatten Gefäßmuskelzellen mit Thrombin (3 U/ml) von 15 Minuten, 1 Stunde, 4, 8 und 24 Stunden Dauer weitgehend gleich (s. Abb. 8).



**Abb. 8:** Im Zellmedium gemessene Menge von bFGF nach ausgewählten Zeiträumen der Stimulation venöser glatter Gefäßmuskelzellen mit Thrombin (3 U/ml). n = 3

Auch die im Zell-Lysat gemessenen Mengen von bFGF sind nach einer Stimulation der venösen glatten Gefäßmuskelzellen mit Thrombin (3 U/ml) von 15 Minuten, 1 Stunde, 4, 8 und 24 Stunden Dauer weitgehend gleich (s. Abb. 9).



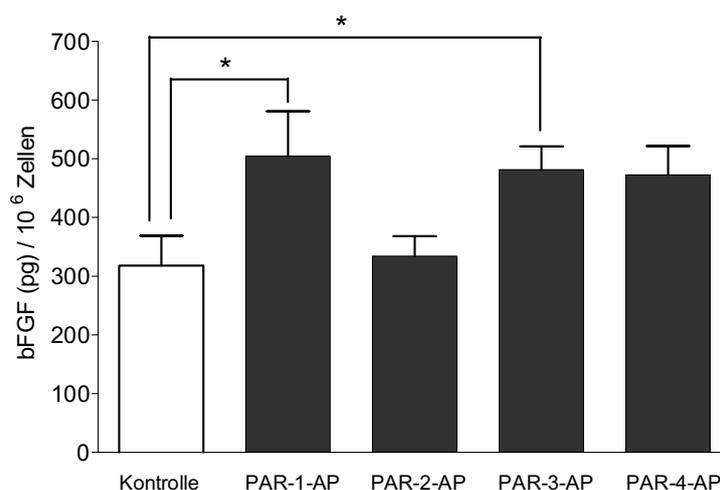
**Abb. 9:** Im Zell-Lysat gemessene Menge von bFGF nach ausgewählten Zeiträumen der Stimulation venöser glatter Gefäßmuskelzellen mit Thrombin (3 U/ml). n = 3

Der Zeitverlauf des Anstiegs der Freisetzung von bFGF venöser glatter Gefäßmuskelzellen ist - qualitativ betrachtet - mit dem von arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen identisch. Arterielle glatte Gefäßmuskelzellen weisen jedoch - quantitativ gesehen - in ihrer EZM größere Mengen des Wachstumsfaktors auf (Rauch et al., 2005).

#### 3.5 Beteiligung der PARs an der Freisetzung von bFGF

Die 10-minütige Stimulation venöser glatter Gefäßmuskelzellen mit PAR-APs führt zu einem signifikanten Anstieg von bFGF. Die Aktivierung von PAR-4 mit 100  $\mu$ M PAR-4-AP führt ebenfalls zu einem Anstieg von bFGF.

Die als Kontrolle durchgeführte Aktivierung von PAR-2 mit 100  $\mu$ M PAR-2-AP bewirkt keinen Anstieg von bFGF in der EZM. Thrombin ist an glatten Gefäßmuskelzellen ein Agonist für PAR-1, PAR-3 und PAR-4 und entfaltet über diese Rezeptoren sein breites Wirkungsspektrum. PAR-2 hingegen ist ein Rezeptor für andere Proteasen. Aus diesem Grund war zu erwarten und hat sich bestätigt, dass die selektive Aktivierung von PAR-2 mit PAR-2-AP keinen Anstieg von bFGF in der EZM hervorruft (s. Abb. 10).



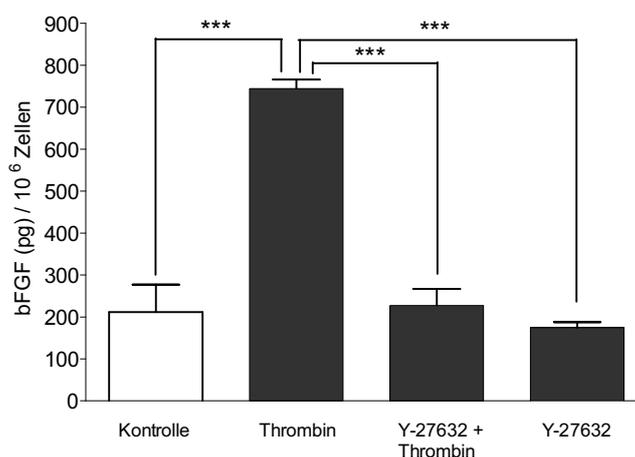
**Abb. 10:** Freisetzung von bFGF durch selektive 10-minütige Stimulation von PAR-1, PAR-3 und PAR-4. Die selektive Aktivierung von PAR-2, der kein Thrombinrezeptor ist, führt nicht zur Freisetzung von bFGF. n = 4

Bestandteil der PAR-1 nachgeschalteten Signaltransduktionskaskade sind mitunter die Rho-assoziierten Proteinkinasen, die mit Y-27632 selektiv gehemmt werden können, und die PKC  $\delta$ , für die Rottlerin ein selektiver Hemmstoff ist. Sollten diese Enzyme an der Freisetzung von bFGF nach Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen mit Thrombin beteiligt sein, müsste sich durch die selektive Hemmung dieser Enzyme die Freisetzung des Wachstumsfaktors unterdrücken lassen (s. Kap. 3.6 und 3.7).

#### 3.6 Einfluss von Y-27632 auf die Freisetzung von bFGF

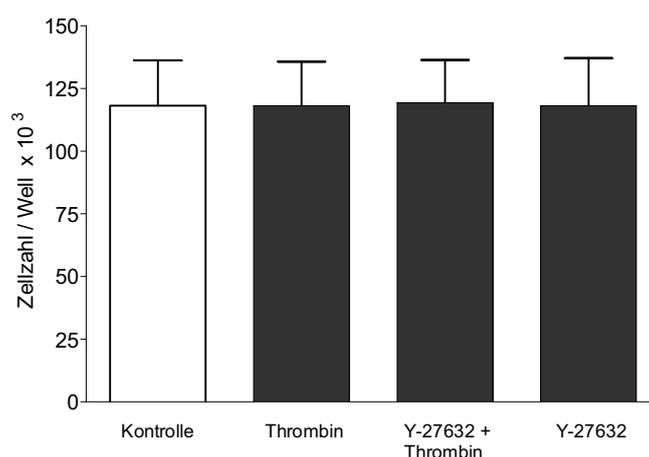
Die 1-stündige Vorbehandlung venöser glatter Gefäßmuskelzellen mit dem selektiven Inhibitor Rho-assoziiierter Proteinkinasen Y-27632 (1  $\mu$ M) hat zur Folge, dass die Thrombin-

induzierte Freisetzung des Wachstumsfaktors bFGF vollständig unterdrückt wird. Die in der EZM der mit Y-27632 vorbehandelten und im Anschluss daran mit Thrombin stimulierten Zellen gemessene Menge von bFGF ist genau so hoch wie die Menge von bFGF in der EZM unbehandelter und nicht stimulierter Zellen (Kontrolle). Die alleinige Vorbehandlung mit Y-27632 verändert die in der EZM zu messende Menge von bFGF nicht (s. Abb. 11).



**Abb. 11:** Hemmung der Thrombin-induzierten Freisetzung von bFGF durch Blockade der Rho-assoziierten Proteinkinasen mit Y-27632 (1  $\mu$ M). n = 4

Um auszuschließen, dass durch eine der eingesetzten Substanzen Zellen geschädigt wurden und dadurch eine Freisetzung von bFGF erfolgte, wurden die Zellen gezählt. Dabei zeigte sich, dass die Zellzahlen in allen Wells gleich geblieben sind (s. Abb.12).

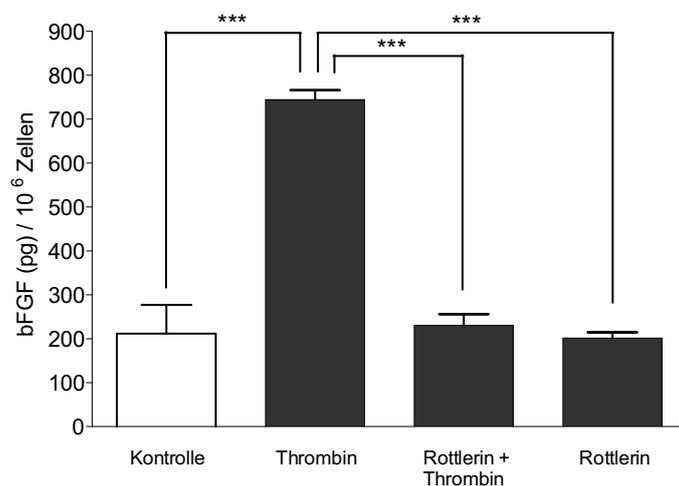


**Abb. 12:** Darstellung der in den einzelnen Wells ermittelten Zellzahlen. n = 4

Wären die Zellen durch die Vorbehandlung oder Stimulation mit einer Substanz - insbesondere mit dem zytotoxischen Inhibitor Y-27632 - geschädigt worden, hätte dies zu einer verminderten Zellzahl in den entsprechenden Wells geführt.

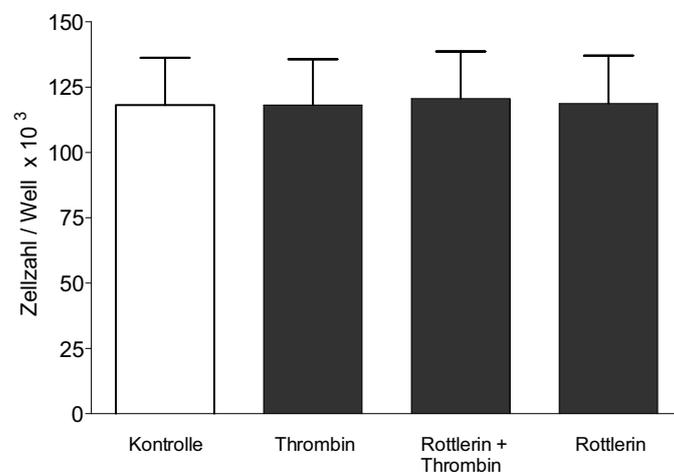
#### 3.7 Einfluss von Rottlerin auf die Freisetzung von bFGF

Werden venöse glatte Gefäßmuskelzellen für 1 Stunde mit dem selektiven Hemmstoff der PKC  $\delta$  Rottlerin (1  $\mu$ M) inkubiert und anschließend für 10 Minuten mit Thrombin (3 U/ml) stimuliert, wird die Thrombin-induzierte Freisetzung von bFGF vollständig unterdrückt (s. Abb. 13).



**Abb. 13:** Hemmung der Thrombin-induzierten Freisetzung von bFGF durch Blockade der PKC  $\delta$  mit Rottlerin (1  $\mu$ M). n = 4

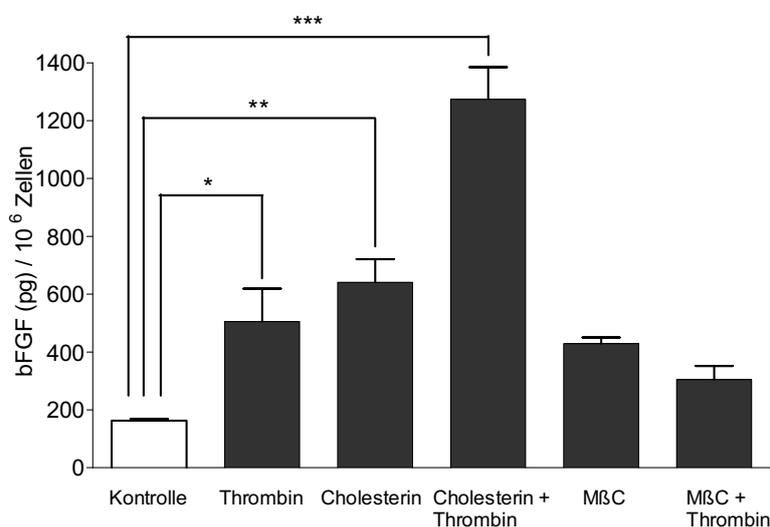
Die in der EZM der mit Rottlerin vorbehandelten und mit Thrombin stimulierten Zellen gemessene Menge des Wachstumsfaktors bFGF ist genau so hoch wie die Menge von bFGF in der EZM un behandelter und nicht stimulierter Zellen (Kontrolle). Die alleinige Vorbehandlung der Zellen mit Rottlerin hat also keinen Einfluss auf die Menge von bFGF in der EZM. Die in den einzelnen Wells ermittelten Zellzahlen sind gleich; mithin sind etwaige Störeinflüsse durch Vorbehandlung und Stimulation der Zellen auszuschließen (s. Abb. 14).



**Abb. 14:** Darstellung der in den einzelnen Wells ermittelten Zellzahlen. n = 4

### 3.8 Einfluss von Cholesterin auf die Freisetzung von bFGF

Werden venöse glatte Gefäßmuskelzellen für 24 Stunden mit Cholesterin (10 µg/ml) vorbehandelt, ist im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle) ein signifikanter Anstieg des Wachstumsfaktors bFGF in der EZM messbar (s. Abb. 15).

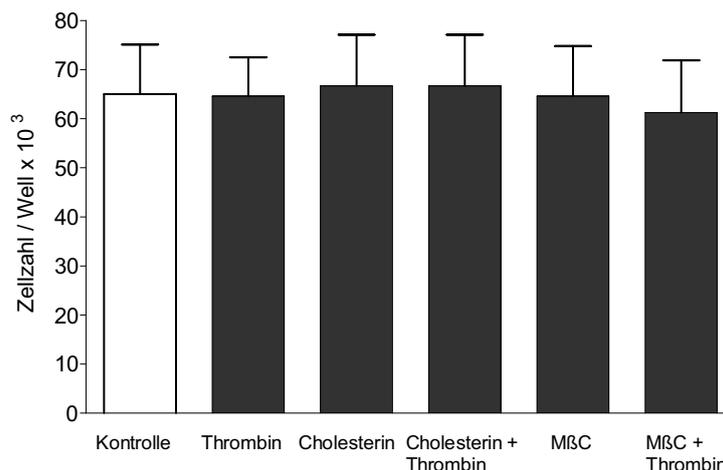


**Abb. 15:** Einfluss von Cholesterin (10 µg/ml) auf die Freisetzung von bFGF aus venösen glatten Gefäßmuskelzellen. Cholesterin setzt den Wachstumsfaktor bFGF frei. Es verstärkt die Thrombin-induzierte bFGF-Freisetzung. Methyl-β-Cyclodextrin (MβC, 10 µg/ml) hat keinen Einfluss auf die bFGF-Freisetzung. n = 3

Durch Stimulation der mit Cholesterin (10 µg/ml) vorbehandelten Zellen mit Thrombin (3 U/ml) für 10 Minuten erhöht sich die Freisetzung von bFGF zusätzlich. Die alleinige Behandlung mit Methyl-β-Cyclodextrin (10 µg/ml) für 24 Stunden verändert die in der EZM gemessene Menge von bFGF in keinem nennenswerten Ausmaß. Nach Vorbehandlung der Zellen mit Methyl-β-Cyclodextrin (10 µg/ml) für 24 Stunden und anschließender Stimulation mit Thrombin (3 U/ml) für 10 Minuten tritt keine Freisetzung des Wachstumsfaktors bFGF in die EZM auf. Cholesterin setzt also den Wachstumsfaktor bFGF aus venösen glatten Gefäßmuskelzellen frei.

Um eine etwaige Zellschädigung durch eine der eingesetzten Substanzen und eine dadurch bedingte Freisetzung von bFGF auszuschließen, wurden bei der Durchführung der Experimente die Zellen in den einzelnen Wells wiederum gezählt (s. Abb. 16).

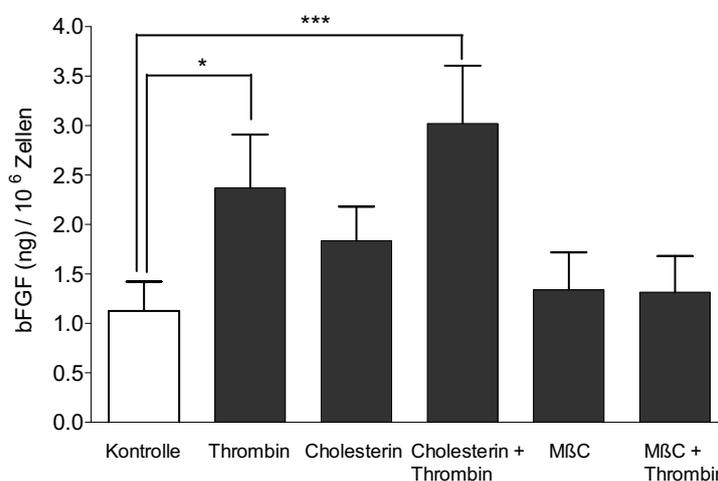
### 3 Ergebnisse



**Abb. 16:** Darstellung der in den einzelnen Wells ermittelten Zellzahlen, MβC = Methyl-β-Cyclodextrin, n = 3

Da die Zellzahlen in den einzelnen Wells gleich geblieben sind, ist zu folgern, dass es zu keiner Zerstörung von Zellen gekommen ist.

Für arterielle glatte Gefäßmuskelnzellen sind ähnliche Ergebnisse zu verzeichnen wie für die venösen glatten Gefäßmuskelnzellen. Auch bei ihnen führt die alleinige Vorbehandlung mit Cholesterin (10 µg/ml) über einen Zeitraum von 24 Stunden zu einem Anstieg von bFGF in der EZM der Zellen (s. Abb. 17).

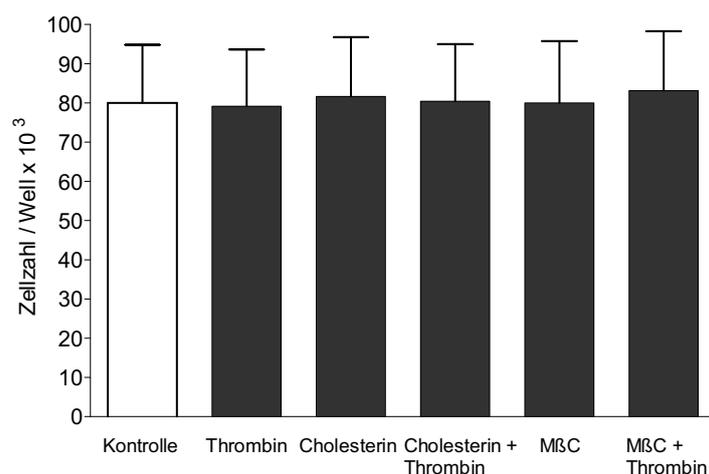


**Abb. 17:** Einfluss von Cholesterin (10 µg/ml) auf die Freisetzung von bFGF aus arteriellen glatten Gefäßmuskelnzellen. Auch an arteriellen glatten Gefäßmuskelnzellen verstärkt Cholesterin die Thrombin-induzierte bFGF-Freisetzung. Methyl-β-Cyclodextrin (MβC, 10 µg/ml) hat keinen Einfluss auf die bFGF-Freisetzung. n = 6

Dieser durch Cholesterin vermittelte Effekt kann durch zusätzliche Stimulation der Zellen mit Thrombin (3 U/ml) von 10 Minuten Dauer gesteigert werden. Eine alleinige Behandlung der Zellen mit Methyl-β-Cyclodextrin (10 µg/ml) von 24 Stunden Dauer verändert die in der

EZM gemessene Menge des Wachstumsfaktors bFGF nicht. Die Vorbehandlung der Zellen mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (10  $\mu\text{g/ml}$ ) über einen Zeitraum von 24 Stunden hebt die auf eine Stimulation mit Thrombin (3 U/ml) von 10 Minuten Dauer folgende Freisetzung von bFGF auf.

Um wiederum eine durch die eingesetzten Substanzen hervorgerufene Zellschädigung auszuschließen, wurden bei der Durchführung der Experimente die Zellen in den einzelnen Wells gezählt (s. Abb. 18).



**Abb. 18:** Darstellung der in den einzelnen Wells ermittelten Zellzahlen, M $\beta$ C = Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin, n = 6

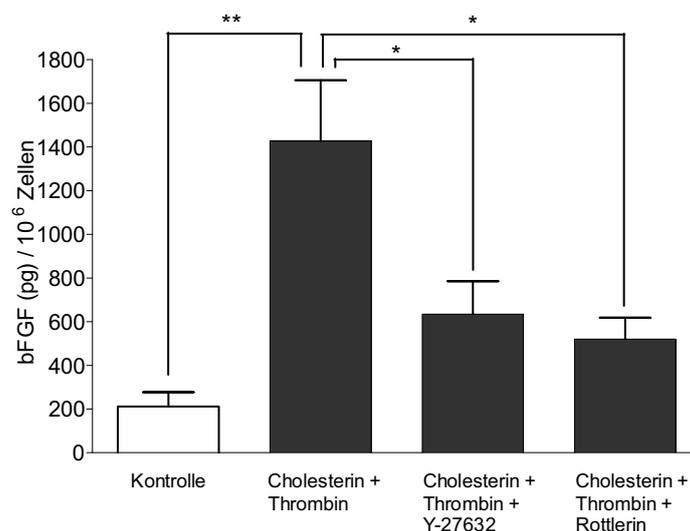
Die einzelnen Zellzahlen sind in allen Wells annähernd gleich geblieben. Insbesondere im Falle der mit Cholesterin vorbehandelten Zellen ist keine Zellschädigung aufgetreten.

Beim Vergleich der für die venösen und für die arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen erhobenen Ergebnisse ist zu beachten, dass die in der EZM der arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen gemessene Menge des Wachstumsfaktors bFGF größer ist als die in der EZM der venösen glatten Gefäßmuskelzellen. Arterielle glatte Gefäßmuskelzellen setzen also größere Mengen des Wachstumsfaktors bFGF in die EZM frei.

Der Einfluss, den der selektive Inhibitor der Rho-assoziierten Proteinkinasen Y-27632 und der selektive Inhibitor der PKC  $\delta$  Rottlerin auf die Freisetzung von bFGF in venösen glatten Gefäßmuskelzellen, die 24 Stunden mit Cholesterin (10  $\mu\text{g/ml}$ ) vorbehandelt wurden, nach Stimulation mit Thrombin (3 U/ml) hat, stellt sich wie folgt dar: Werden venöse glatte Gefäßmuskelzellen nach 24-stündiger Vorbehandlung mit Cholesterin (10  $\mu\text{g/ml}$ ) für 1 Stunde entweder mit dem selektiven Inhibitor Rho-assoziiertes Proteinkinasen Y-27632 (1  $\mu\text{M}$ ) oder mit dem selektiven Inhibitor der PKC  $\delta$  Rottlerin (1  $\mu\text{M}$ ) behandelt und im Anschluss daran für 10 Minuten mit Thrombin (3 U/ml) stimuliert, ist die in der EZM der Zellen gemessene

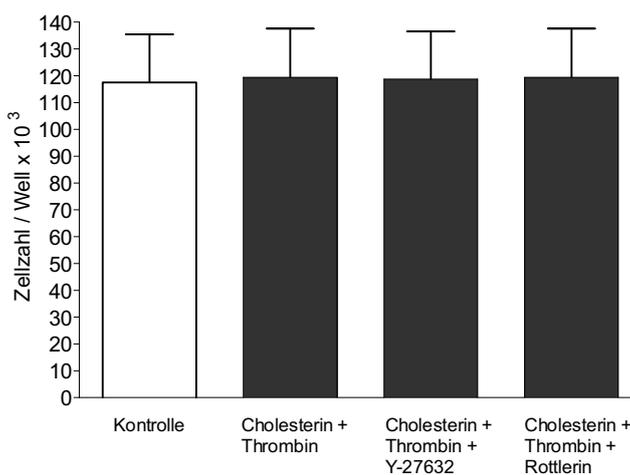
### 3 Ergebnisse

Menge des Wachstumsfaktors bFGF signifikant niedriger als die Menge des Wachstumsfaktors in der EZM von mit Cholesterin (10 µg/ml) vorbehandelten und mit Thrombin (3 U/ml) stimulierten Zellen. Sie ist jedoch höher als die Menge des Wachstumsfaktors bFGF, die in der EZM nicht vorbehandelter und nicht stimulierter Zellen (Kontrolle) gemessen wird (s. Abb. 19).



**Abb. 19:** Einfluss von Thrombin (3 U/ml), Cholesterin (10 µg/ml), Y-27632 (1 µM) und Rottlerin (1 µM) auf die Freisetzung von bFGF. Die Hemmstoffe der Rho-assoziierten Proteinkinasen und der PKC δ senken signifikant die durch Cholesterin verstärkte Thrombin-induzierte bFGF-Freisetzung. n = 4

Zur Kontrolle einer durch die eingesetzten Substanzen verursachten Zellschädigung diente wiederum die Zählung der Zellen in den einzelnen Wells (s. Abb. 20).



**Abb. 20:** Darstellung der in den einzelnen Wells ermittelten Zellzahlen. n = 4

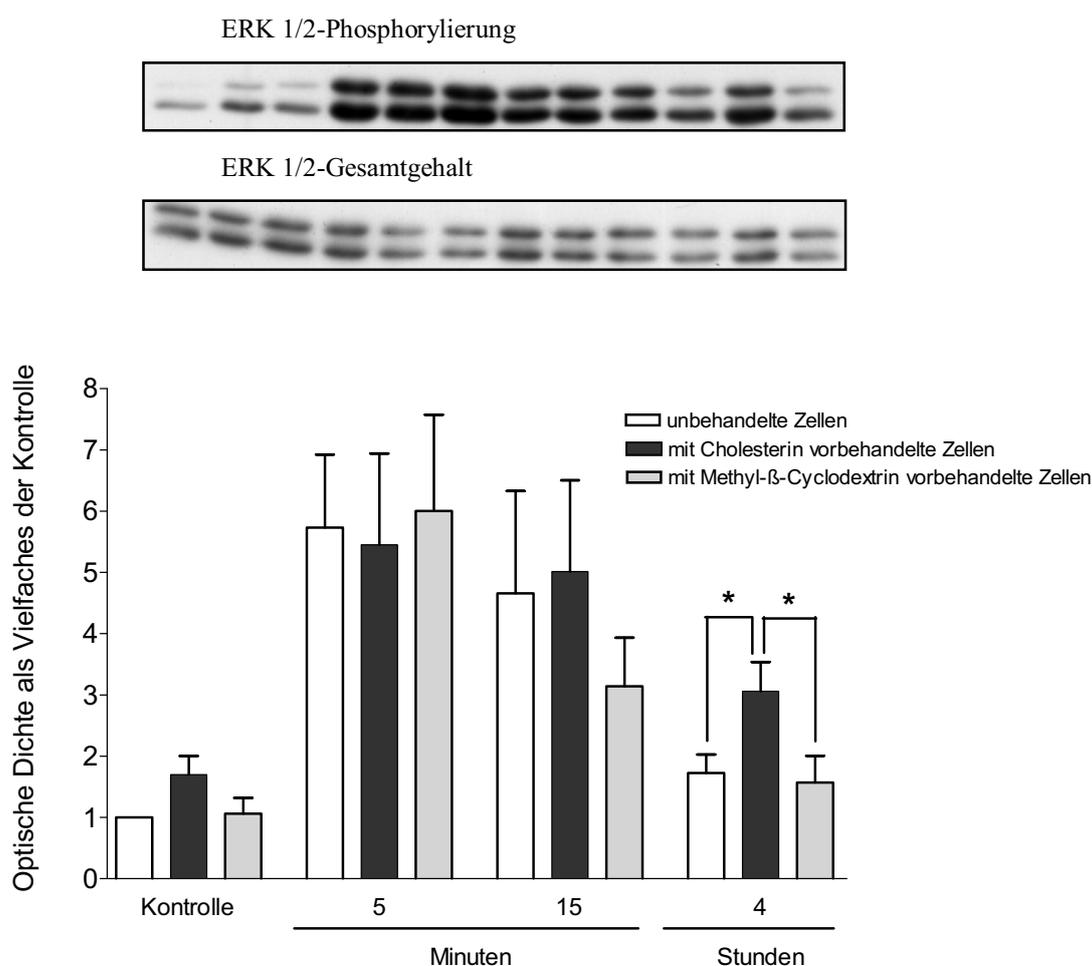
Das Ergebnis zeigt, dass die Zellzahlen in den einzelnen Wells gleich geblieben sind. Eine Schädigung der Zellen ist also nicht aufgetreten.

### 3.9 Einfluss von Thrombin und Cholesterin auf die ERK 1/2-Phosphorylierung

Der Einfluss von Thrombin und Cholesterin auf die ERK 1/2-Phosphorylierung stellt sich wie folgt dar:

Werden venöse glatte Gefäßmuskelzellen entweder unbehandelt belassen (Kontrolle) oder über einen Zeitraum von 24 Stunden mit Cholesterin (10 µg/ml) oder mit Methyl-β-Cyclodextrin (10 µg/ml) vorbehandelt, zeigt sich nach einer Stimulation der Zellen mit Thrombin von 5 Minuten und von 15 Minuten Dauer kein Unterschied zwischen diesen drei Versuchsgruppen in der Phosphorylierung von ERK 1/2.

Nach 4-stündiger Stimulation der Zellen mit Thrombin (3 U/ml) allerdings ist die Phosphorylierung von ERK 1/2 in mit Cholesterin (10 µg/ml) vorbehandelten Zellen signifikant stärker als in nicht vorbehandelten oder mit Methyl-β-Cyclodextrin (10 µg/ml) vorbehandelten Zellen (s. Abb. 21).



**Abb. 21:** ERK 1/2-Phosphorylierung in venösen glatten Gefäßmuskelzellen nach 24-stündiger Vorbehandlung mit Cholesterin (10 µg/ml) und anschließender 4-stündiger Stimulation mit Thrombin (3 U/ml). n = 6

### 3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Thrombin-induzierte Steigerung der DNA-Synthese glatter Gefäßmuskelzellen beruht auch auf der mitogenen Wirkung des Wachstumsfaktors bFGF. Thrombin setzt bFGF durch Aktivierung der zellulären Thrombinrezeptoren frei. An der intrazellulären Signalkaskade dieser Freisetzung sind die Rho-assoziierten Proteinkinasen und die PKC  $\delta$  beteiligt.

Cholesterin verstärkt die mitogene Wirkung von Thrombin. Für diesen Effekt ist der Wachstumsfaktor bFGF verantwortlich, dessen Freisetzung Cholesterin bewirkt. Die Cholesterinbedingte Freisetzung von bFGF findet unter Vermittlung von ERK 1/2 als Bestandteil der intrazellulären Signalkaskade statt.

## 4 Diskussion

Schlüsselfaktoren in der Pathogenese der Atherosklerose sind die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen. Diese Prozesse tragen zur Verdickung der Gefäßwand bei und treiben den Krankheitsprozess voran. Die Aufklärung der Mechanismen, welche die Proliferation und Migration kontrollieren, ist daher von großem klinischem Interesse (Ross, 1999; Rauch et al., 2007). Erhöhte Cholesterinspiegel sind als ein bedeutender Risikofaktor für die Ausbildung der Atherosklerose bekannt. Ob erhöhtes zelluläres Cholesterin auch direkte Effekte auf das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen hat oder ob es die Wirkungen entweder von Wachstumsfaktoren oder auch von Thrombin, das die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen fördert, beeinflusst, ist hingegen wenig untersucht. Angesichts dessen wurde in der vorliegenden Arbeit das Zusammenspiel zwischen glatter Gefäßmuskulatur sowie Thrombin, Cholesterin und dem Wachstumsfaktor bFGF untersucht. Zunächst ging es um die Aufklärung der extra- und intrazellulären Mechanismen, die an der Freisetzung von bFGF aus glatten Gefäßmuskelzellen nach ihrer Stimulation mit Thrombin beteiligt sind. Sodann wurde der Einfluss, den Cholesterin auf die Freisetzung von bFGF und somit auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen ausübt, ins Blickfeld gerückt. Die gewonnenen Ergebnisse werden im Folgenden so diskutiert, dass zum einen die Bedeutung der glatten Gefäßmuskulatur und zum anderen die der Hypercholesterinämie in der Pathogenese der Atherosklerose in ihren zentralen Aspekten betrachtet wird. Dabei wird darauf abgestellt, was die gewonnenen Ergebnisse zum derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnisstand Neues beitragen und welche Konsequenzen sich daraus in pharmakologischer und klinischer Hinsicht ergeben.

### 4.1 Bedeutung der glatten Gefäßmuskulatur in der Pathogenese der Atherosklerose

Das genauere Verständnis der vaskulären Zellantwort auf inflammatorische Stimuli führte zur Entwicklung eines Pathogenesemodells, das die Atherosklerose als chronischen Entzündungsprozess beschreibt (Ross, 1993, 1999). Dieser ist das Resultat einer komplexen Interaktion von Plasmaproteinen, Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen, die von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und vasoregulatorischen Molekülen vermittelt wird (Fan et al., 2003). Kann die inflammatorische Reaktion nicht ausreichend neutralisiert werden, besteht sie kontinuierlich fort. Infolgedessen werden mitunter glatte Gefäßmuskelzellen zur Migration in das Entzündungsareal angeregt, proliferieren dort, produzieren eine EZM und nehmen so an der Entstehung der fibromuskulären Plaque teil (Ross, 1999). Die fortgeschrittene atherosklerotische Plaque ist also das Ergebnis

einer exzessiven inflammatorischen und fibroproliferativen Antwort auf die Irritation der Gefäßwand. Das Ausmaß und die Reversibilität der atherosklerotischen Plaque werden maßgeblich durch die glatten Gefäßmuskelzellen und die von ihnen produzierte EZM bestimmt. Dieser Sachverhalt wird auch daran deutlich, dass glatte Gefäßmuskelzellen zwar bereits in den frühen „fatty streaks“ zu finden sind, aber erst dann zum vorherrschenden Zelltyp werden, wenn sich die „fatty streaks“ zur fibromuskulären Plaque weiterentwickeln (Raines et al., 1993; Stary et al., 1995). Zudem sind Akkumulation und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen entscheidend für die klinischen Konsequenzen der Erkrankung, da sie für Größe und Stabilität der atherosklerotischen Plaque ausschlaggebend sind (Raines et al., 1993). Insbesondere das Zusammenspiel von Thrombin, glatter Gefäßmuskulatur und Wachstumsfaktoren verdient Beachtung, da die Thrombozytenadhäsion und die murale Thrombose grundlegende Ereignisse für die Initiation und Progression der Atherosklerose sind (Ross, 1993, 1999). Aktivierte Thrombozyten entleeren ihre Granula, die mitunter Wachstumsfaktoren beinhalten, und tragen gemeinsam mit Thrombin zur Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen bei (Bombeli et al., 1998; Ross, 1999). Die Gefäßwandzellen exprimieren Gene für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, und Wachstumsfaktoren ihrerseits regulieren wiederum Vorgänge wie die gezielte Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie die Synthese von Matrixkomponenten (Raines et al., 1995). Der Wachstumsfaktor bFGF fungiert als Mitogen und Chemoattractant und ist über die Stimulation der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen an der Ausbildung der EZM beteiligt (Raines et al., 1993). Die Wachstumsfaktoren werden in der gesunden Arterienwand kaum exprimiert, in der atherosklerotischen Plaque jedoch ist ihre Expression hochreguliert, und sie sind dort in erhöhter Konzentration zu finden (Raines et al., 1993). Deshalb sind die Mechanismen, die ihre Synthese und Freisetzung regulieren, von großer Bedeutung.

Die zellulären Prozesse, die zur Freisetzung des Wachstumsfaktors bFGF aus glatten Gefäßmuskelzellen führen, sind bislang nur unzureichend charakterisiert. Bekannt ist, dass die Freisetzung von bFGF nicht auf dem klassischen Weg der Proteinsekretion via Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat erfolgt, da dieser Weg am zu sezernierenden Protein eine N-terminale Signalpeptidsequenz voraussetzt, die bFGF nicht besitzt (Mignatti et al., 1991 a, b, 1992; Nickel, 2003). Deshalb wird angenommen, dass bFGF auf einem - allerdings in der Literatur nicht näher spezifizierten - exozytotischen Weg freigesetzt wird, der vom Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat unabhängig ist (Itoh et al., 2004). Eine weitere Annahme besteht darin, dass der in intrazellulären Pools gespeicherte Wachs-

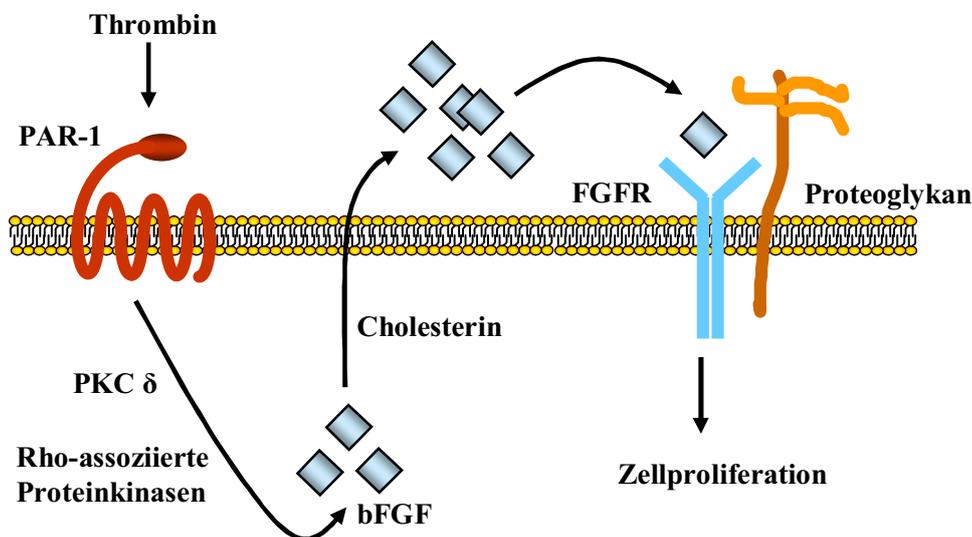
tumsfaktor infolge einer Zellschädigung oder eines Zelluntergangs frei wird (Folkman et al., 1988; Itoh et al., 2004). Dies wäre auch in der atherosklerotischen Plaque möglich, da dieses Areal durch erhöhten Zellumsatz gekennzeichnet ist. Andere Autoren stellen lediglich fest, dass bFGF in Ermangelung der N-terminalen Signalpeptidsequenz nicht effizient aus den produzierenden Zellen freigesetzt werden kann (Ortega et al., 1998). Sie bleiben jedoch eine schlüssige Erklärung für das Vorhandensein hoher extrazellulärer bFGF-Spiegel in vielen Geweben schuldig. Ein weiterer Erklärungsansatz für erhöhte extrazelluläre bFGF-Konzentrationen basiert darauf, dass bFGF an die Basalmembran von Zellen gebunden ist. Daher wird postuliert, dass erhöhte extrazelluläre bFGF-Konzentrationen dadurch zustande kommen, dass Proteinasen und Heparinasen den Wachstumsfaktor aus seiner Bindung herauschneiden (Saksela et al., 1990; Kraemer et al., 1993). Dieser Mechanismus ist durchaus nachvollziehbar und erklärt auch, wie es zu erhöhten Konzentrationen des Wachstumsfaktors in der EZM kommt. Allerdings erföhre man zum einen gern Näheres über die Regulationsvorgänge der Enzyme, die den Wachstumsfaktor freischneiden. Zum andern lässt dieses Modell offen, wie der intrazellulär synthetisierte Wachstumsfaktor seinen extrazellulären Lagerungspool erreicht. Vor diesem Hintergrund führten die im Rahmen dieser Arbeit zur Thrombin-induzierten bFGF-Freisetzung durchgeführten Experimente zur Aufdeckung des im folgenden Abschnitt dargestellten Modells.

### **4.2 Mechanismus der Thrombin-induzierten bFGF-Freisetzung aus glatten Gefäßmuskelnzellen**

Es konnte gezeigt werden, dass die mitogene Wirkung, die Thrombin an glatten Gefäßmuskelnzellen entfaltet, durch die Freisetzung von bFGF vermittelt wird. Hinsichtlich der Beteiligung der PARs an der Freisetzung von bFGF wurde festgestellt, dass die selektive Aktivierung der Thrombinrezeptoren einen Anstieg von bFGF in der EZM der glatten Gefäßmuskelnzellen hervorruft. Infolgedessen sind an der Thrombin-induzierten Freisetzung von bFGF die PARs nachgeschaltete intrazelluläre Wege der Signaltransduktion beteiligt. Des Weiteren ist daraus, dass nach Vorbehandlung der glatten Gefäßmuskelnzellen mit Y-27632 oder mit Rottlerin die Thrombin-induzierte Freisetzung von bFGF vollständig unterbleibt, zu schließen, dass die Rho-assoziierten Proteinkinasen und die PKC  $\delta$  Bestandteile der intrazellulären Signalkaskade sind, die die Thrombin-induzierte Freisetzung von bFGF bewirkt. Zusammenfassend lässt sich daraus das folgende - bislang noch nicht beschriebene - Modell zur

## 4 Diskussion

Freisetzung des Wachstumsfaktors bFGF durch Thrombin aus glatten Gefäßmuskelzellen herleiten (s. Abb. 22):



**Abb. 22:** Darstellung der Thrombin-induzierten bFGF-Freisetzung aus glatten Gefäßmuskelzellen und deren Verstärkung durch Cholesterin: Thrombin aktiviert den Thrombinrezeptor PAR-1. Unter Vermittlung der PKC  $\delta$  und der Rho-assoziierten Proteinkinasen kommt es zur Freisetzung von bFGF. Cholesterin, das die Proteinbiosynthese von bFGF steigert, verstärkt die Thrombin-induzierte bFGF-Sekretion (s. Kap. 4.3). Der Wachstumsfaktor bFGF seinerseits aktiviert über seine spezifischen Rezeptoren Signalwege, die zur Zellproliferation führen.

Die Aktivierung von PAR-1 durch Thrombin löst einen intrazellulären Signalweg aus, an dem die PKC  $\delta$  und die Rho-assoziierten Proteinkinasen maßgeblich beteiligt sind. Diese Signalkaskade führt zur Freisetzung des Wachstumsfaktors bFGF, und bFGF seinerseits steigert die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Dieses bislang nicht beschriebene Modell der Thrombin-induzierten bFGF-Freisetzung erweitert den Wissensstand zur Rolle von Thrombin bei Reparaturprozessen nach Gefäßverletzung (Carney et al., 1992; Fager 1995; Harker et al., 1995; Patterson et al., 2001): Durch die Freisetzung des Wachstumsfaktors bFGF und die konsekutive Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen kommt es in Arealen gestörter Endothelintegrität zur Wiederherstellung der physiologischen Gefäßstruktur. Insofern erfüllen Thrombin und der Wachstumsfaktor bFGF eine gefäßprotektive Aufgabe (Six et al., 2004; Barreintos et al., 2008). Dieser gefäßprotektive Mechanismus wendet sich aber ins Gegenteil, wenn eine in Hinblick auf die Gefäßverletzung zu hohe Thrombin-induzierte bFGF-Freisetzung erfolgt. Dies deshalb, da es infolge des ständigen mitogenen Reizes zu

einer exzessiven Vermehrung glatter Gefäßmuskelzellen und der Ausbildung einer EZM kommt.

Die zellulären Thrombinrezeptoren partizipieren, wie im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, dadurch an der Ausbildung der atherosklerotischen Plaque, dass ihre Aktivierung die Freisetzung von bFGF bewirkt. Es liegt deshalb nahe, Möglichkeiten zur selektiven Antagonisierung der PARs in den Blickpunkt pharmakologischer Forschung zu rücken (Hirano 2007; Martorell et al., 2008). Mit solchen PAR-Antagonisten könnte die Freisetzung von bFGF und die Proliferationsrate glatter Gefäßmuskelzellen gesenkt werden. Ob sich mit solchen PAR-Antagonisten auch andere Wirkungen von Thrombin im Pathogeneseprozess der Atherosklerose ausschalten lassen und sich mit einer entsprechenden Wirkstoffgruppe eine antithrombotische und antiproliferative Therapieoption in der Behandlung der Atherosklerose eröffnet, wäre das Ergebnis weiterer Forschungen. Des Weiteren könnte der Frage nachgegangen werden, welche PAR-3 und PAR-4 nachgeschalteten Signalkaskaden an der Freisetzung von bFGF beteiligt sind. Dadurch würde sich ein zusätzliches Feld pharmakologischer Zielstrukturen in der Therapie der Atherosklerose eröffnen. In Bezug auf die PAR-1 nachgeschalteten Rho-assoziierten Proteinkinasen und die PKC  $\delta$  wäre es denkbar, dass Proteinkinase-Inhibitoren in der Therapie der Atherosklerose zum Einsatz kämen. Durch die selektive Hemmung dieser intrazellulären Signaltransduktionsenzyme wäre es nämlich möglich, die Freisetzung von bFGF zu verhindern. Somit entfielen ein mitogener Stimulus zur Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen innerhalb der atherosklerotischen Plaque. Da PAR-1, PAR-3 und PAR-4 nahezu gleichermaßen die Freisetzung von bFGF vermitteln, wäre auch aufzuklären, wie ihr diesbezügliches Zusammenspiel durch Thrombin reguliert wird und ob sich in Hinblick auf die Freisetzung des Wachstumsfaktors bFGF die Wirkungen von PAR-1, PAR-3 und PAR-4 addieren oder nur nebeneinander bestehen. Schließlich wäre - und damit ist eine weitere offene Frage angesprochen - zu untersuchen, ob und inwieweit Thrombin über den beschriebenen Mechanismus auch die Freisetzung anderer Wachstumsfaktoren hervorruft.

### **4.3 Bedeutung der Hypercholesterinämie in der Pathogenese der Atherosklerose**

In den letzten Jahrzehnten sind an der Entwicklung der Atherosklerose maßgeblich beteiligte Risikofaktoren identifiziert und unter deren Berücksichtigung konkrete Behandlungsstrategien entworfen worden (Frohlich et al., 2002). Zu diesen Risikofaktoren gehört insbesondere die in der erwachsenen Bevölkerung der Industrienationen weit verbreitete Hypercholeste-

rinämie (Choi et al., 2006; Nationale Verzehrsstudie II, 2008). Von besonderem Interesse ist deshalb in der Pathogenese der Atherosklerose das Zusammenspiel von Lipiden und glatter Gefäßmuskulatur. Das wird daran deutlich, dass sich „fatty streaks“ oftmals an Stellen von Ansammlungen glatter Gefäßmuskelzellen bilden (Ross, 1993, 1999). In der Literatur finden sich zudem Belege dafür, dass proatherogene Lipoproteine eine Rolle im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion spielen, während antiatherogene Lipoproteine antiinflammatorische Effekte haben (Glass et al., 2001; Fan et al., 2003). Ferner wurde nachgewiesen, dass in hypercholesterinämischen Ratten T-Lymphozyten in der Diätphase dominieren, was eine Verstärkung der Entzündungsreaktion durch Cholesterin vermuten lässt (Shimokama et al., 1994; Haraoka et al., 1995, 1997; Hansson, 2001).

Angesichts dessen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Interaktion von glatten Gefäßmuskelzellen sowie Cholesterin, Thrombin und bFGF unter experimentellen Bedingungen in der Zellkultur untersucht. Die Beladung der glatten Gefäßmuskelzellen mit Cholesterin erfolgte mittels eines Komplexes aus Cholesterin und Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin. Cholesterin ist nicht wasserlöslich und damit zur alleinigen Verwendung in der Zellkultur ungeeignet.  $\beta$ -Cyclodextrine sind  $\beta$ -glykosidisch verbundene, zyklische Oligosaccharide, deren äußere Oberfläche hydrophil ist. Im Inneren der Moleküle liegen aufgrund der zahlreichen Methylgruppen von Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin lipophile Bedingungen vor, die den Einschluss und Transport ebensolcher Verbindungen ermöglichen. Zudem haben Cyclodextrine eine besondere Affinität zu Sterinen, was sie für den intrazellulären Transport von Cholesterin besonders geeignet macht (Christian et al., 1997). Die Beladung glatter Gefäßmuskelzellen mit Cholesterin führt zur Anreicherung von Cholesterin in den Zellen. Dies hat zur Folge, dass sich die glatten Gefäßmuskelzellen in Schaumzellen umwandeln (Raines et al., 1993; Rong et al., 2003; Rauch et al., 2005; Rauch et al., 2007).

Die durchgeführten Experimente ergaben, dass Cholesterin eine Freisetzung des Wachstumsfaktors bFGF aus glatten Gefäßmuskelzellen bewirkt und die Thrombin-induzierte Freisetzung von bFGF verstärkt. Die Verstärkung der Thrombin-induzierten Freisetzung durch Cholesterin findet unter Vermittlung des ERK 1/2-Signalweges statt. Cholesterin ist also im Zusammenspiel mit Thrombin in der Lage, glatte Gefäßmuskelzellen zur Proliferation anzuregen, und entfaltet über die Freisetzung des Wachstumsfaktors bFGF eine mitogene Aktivität. Aus der Zusammenschau diesbezüglicher Literatur und der experimentell ermittelten Ergebnisse lässt sich im Rahmen des voranstehend vorgestellten Modells zur Freisetzung des Wachstumsfaktors bFGF die Wirkung von Cholesterin nunmehr so beschreiben (s. Abb. 22):

Cholesterin induziert in glatten Gefäßmuskelzellen die Transskription von bFGF und steigert seine Proteinbiosynthese (Kraemer et al., 1993). Zudem ist es in der Lage, bFGF aus glatten Gefäßmuskelzellen freizusetzen, und verstärkt die Thrombin-induzierte Freisetzung von bFGF. Daraus resultiert ein kontinuierlicher mitogener Stimulus für die glatten Gefäßmuskelzellen, wodurch Cholesterin zur Ausbildung der fibromuskulären Plaque beiträgt. Solche Expressions- und Sekretionsvorgänge stellen ein in der Pathogenese der Atherosklerose gängiges Wirkprinzip dar. Ein derartiger Mechanismus wurde bislang für die Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  beschrieben, die aus aktivierten Makrophagen freigesetzt werden, indem die Makrophagen spezifischen Agonisten wie z.B. oxidierten LDLs ausgesetzt wurden (Rosenfeld et al., 1990; Steinbrecher et al., 1990). Hinsichtlich der Freisetzung des Wachstumsfaktors PDGF-BB wurde gezeigt, dass Endothelzellen, die dem Einfluss von IL-1, TNF- $\alpha$  oder TGF- $\beta$  ausgesetzt sind, das Gen von PDGF-BB exprimieren. Diese Agonisten bewirken zudem die Freisetzung von PDGF-BB aus Endothelzellen. Und PDGF-BB seinerseits fördert die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und trägt so zur Ausbildung der fibromuskulären Plaque bei (Ross, 1993).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist die medikamentöse Kontrolle der Hypercholesterinämie einer der wichtigsten präventiven und therapeutischen Ansätze in der Behandlung der Atherosklerose (Keller, 2005). Eine Vielzahl klinischer Studien belegt nämlich, dass die strenge medikamentöse Kontrolle des Cholesterinspiegels die Progression der atherosklerotischen Läsion verhindert resp. zu einer quantitativ signifikanten Regression derselben führt (Brown et al., 1990; Reis et al., 1991; Shepherd et al., 1995; Campeau et al., 1997; Alaupovic et al., 1999; Brophy et al., 2003). Allerdings fehlt in diesen Studien eine kausale Erklärung für dieses klinische Vorgehen. Anhand des im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Modells zur Wirkungsweise von Cholesterin lässt sich nunmehr die medikamentöse Behandlung eines erhöhten Cholesterinspiegels so begründen, dass dessen Senkung über eine Reduzierung der Freisetzung des Wachstumsfaktors bFGF die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen vermindert.

Cholesterin ist jedoch nicht nur an der Ausbildung der fibromuskulären Plaque beteiligt, sondern mit dem beschriebenen Modell lässt sich ihm auch eine entscheidende Rolle beim Umbau der fibromuskulären Plaque zuweisen: Die atherosklerotische Plaque besteht aus einem fettreichen Kern und einer fibromuskulären Kappe (Fan et al., 2003). Vom quantitativen Verhältnis von Kern und Kappe hängt die Stabilität der Plaque ab: Die stabile Plaque hat einen schmalen Lipidkern, der von einer dicken fibromuskulären Kappe bedeckt wird; die

instabile Plaque besitzt einen großen Lipidkern und eine dünne, fragile fibromuskuläre Kappe. Die einzelnen zur Plaqueruptur führenden Mechanismen sind nicht endgültig geklärt. Zum einen sind an diesem Vorgang Matrix-Metalloproteinasen beteiligt, die die EZM der fibromuskulären Plaque abbauen und die Plaque dadurch instabilisieren (Galis et al., 1994, 1995; Matsumoto et al., 1998). Zum anderen werden in der fortgeschrittenen Plaque zahlreiche Blutgefäße gebildet. Die Bildung dieser Vaskularisationen wird durch angiogenetische Moleküle vermittelt, zu denen auch bFGF gehört (Ross, 1993; Auguste et al., 2003). Die durch die Gefäßkanäle hervorgerufene Destabilisierung ist der maßgebliche Auslöser der Plaqueruptur (Ross, 1993; Fuster, 1994; Lee et al., 1997). Diese Vorstellung von der zunehmenden Destabilisierung durch Angiogenese lässt sich mittels des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Modells zur Freisetzung von bFGF insofern ergänzen, als sich so erklären lässt, wie Cholesterin über die Freisetzung des angiogenetischen Moleküls bFGF an der Umwandlung der stabilen zur instabilen Plaque beteiligt ist: Cholesterin setzt stetig den Wachstumsfaktor bFGF frei und erhöht dessen Konzentration innerhalb der Läsion; bFGF seinerseits trägt zur Angiogenese bei, instabilisiert die Plaque und führt letztendlich zur Plaqueruptur.

In Hinblick auf die Freisetzung von bFGF und die Verstärkung der Thrombin-induzierten Freisetzung von bFGF durch Cholesterin ergeben sich allerdings weitere Fragen: Eine ist die danach, welche extrazellulären und - neben ERK 1/2 - intrazellulären Signalkaskaden der Cholesterin-induzierten Freisetzung von bFGF zugrunde liegen. Dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit insofern nachgegangen, als der Einfluss der Inhibitoren Y-27632 und Rottlerin auf die Thrombin-induzierte Freisetzung von bFGF an mit Cholesterin vorbehandelten glatten Gefäßmuskelzellen untersucht wurde. Dabei ergab sich: Zwar bewirken die beiden Inhibitoren eine signifikante Senkung der bFGF-Menge, die bFGF-Menge ist jedoch immer noch größer als die in der EZM gänzlich unbehandelter Zellen. Daraus ist ersichtlich, dass die Verstärkung der Thrombin-induzierten Freisetzung von bFGF durch Cholesterin auf einem von den Rho-assoziierten Proteinkinasen und der PKC  $\delta$  unabhängigen Freisetzungsmechanismus beruht. Die Aufklärung der Signalkaskaden der Cholesterin-induzierten Freisetzung von bFGF würde pharmakologische Zielstrukturen liefern, die einer weiteren selektiven Antagonisierung zugänglich wären. Dadurch ließe sich das Therapiespektrum der Atherosklerose erweitern. Eine andere offene Frage ist die, ob Cholesterin neben der Freisetzung von bFGF auch die Freisetzung anderer Wachstumsfaktoren beeinflusst und dadurch eine zusätzliche mitogene Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen entwickelt. Zudem wäre die Aufklärung weiterer Details darüber wünschenswert, wie Metaboliten des Fettstoffwech-

sels am Atheroskleroseprozess beteiligt sind. Entscheidend ist, dass proatherogene Lipoproteine die Expression und Sekretion von Mediatoren fördern, die ihrerseits durch Stimulation von Zielzellen zu einem Teufelskreis führen, der ein Fortschreiten der atherosklerotischen Läsion bedingt (Fan et al., 2000; Iwasa et al., 2001; Sun et al., 2002; Fan et al., 2003). Im Gegensatz dazu erfüllt HDL, das über den reversen Cholesterintransport eine vor Atherosklerose schützende Wirkung ausübt, eine entgegengesetzte Funktion (Navab et al., 2001). Zu den postulierten protektiven Effekten von HDL, das auch die Expression des Wachstumsfaktors bFGF herunterreguliert, gehört auch die Senkung der Proliferationsrate glatter Gefäßmuskelzellen. Aufgrund dessen ist zu erwarten, dass die Erhöhung von HDL neue Wege einer zukünftigen Atherosklerosetherapie eröffnet (Li et al., 2002; Fan et al., 2003).

### 5 Zusammenfassung

Die glatte Gefäßmuskulatur ist in der Pathogenese der Atherosklerose von zentraler Bedeutung, da die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen zur Verdickung der Gefäßwand beitragen und den Krankheitsverlauf vorantreiben. Daher besteht ein Interesse daran, die Mechanismen, die insbesondere den Prozess der Proliferation steuern, zu identifizieren.

Vor diesem Hintergrund waren folgende Fragestellungen Gegenstand der vorliegenden Arbeit: (i) Welchen Einfluss haben Thrombin, der Wachstumsfaktor bFGF und Cholesterin auf die DNA-Syntheserate glatter Gefäßmuskelzellen? (ii) Welche Thrombinrezeptoren sind an der Freisetzung von bFGF aus glatten Gefäßmuskelzellen beteiligt? (iii) Welche intrazellulären Signalwege führen zur Freisetzung von bFGF? (iv) Löst eine Vorbehandlung glatter Gefäßmuskelzellen mit Cholesterin die Freisetzung von bFGF aus?

Die im Rahmen der Arbeit experimentell ermittelten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: (i) Sowohl Thrombin als auch bFGF regen glatte Gefäßmuskelzellen zur Proliferation an. Die Thrombin-induzierte Steigerung der DNA-Syntheserate wird durch den Wachstumsfaktor bFGF vermittelt. Cholesterin verstärkt die mitogene Wirkung von Thrombin. (ii) Die selektive Aktivierung von PAR-1, PAR-3 und PAR-4 führt zu einer erhöhten Freisetzung von bFGF aus glatten Gefäßmuskelzellen. (iii) Die Vorbehandlung glatter Gefäßmuskelzellen entweder mit dem Inhibitor Rho-assoziiierter Proteinkinasen Y-27632 oder mit dem Inhibitor der PKC  $\delta$  Rottlerin hebt die Thrombin-induzierte Freisetzung von bFGF auf. Daraus ist zu schließen, dass diese beiden PAR-1 nachgeschalteten Enzyme Bestandteil der Signalkaskade sind, die nach Thrombinstimulation zur Freisetzung von bFGF führt. (iv) Die Hypercholesterinämie ist ein wichtiger Risikofaktor für das Auftreten der Atherosklerose. Die Inkubation glatter Gefäßmuskelzellen mit Cholesterin bewirkt eine Freisetzung von bFGF. Insbesondere verstärkt Cholesterin die Thrombin-induzierte bFGF-Freisetzung. Dies führt zu einer verstärkten Aktivierung mitogener Signalwege, beispielsweise der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK 1/2), und zu einem verstärkten Zellwachstum. Cholesterin forciert also im Zusammenspiel mit Thrombin durch die Freisetzung von bFGF die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Insgesamt tragen die gewonnenen Ergebnisse dazu bei, den Mechanismus der Läsionsformation und -progression im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose besser zu verstehen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Alaupovic P, Fesmire JD, Hunnighake D, Domanski M, Forman S, Knatterud GL, Forrester J, Herd JA, Hoogwerf B, Campeau L, Gobel, FL (1999), The effect of aggressive and moderate lowering of LDL-cholesterol and low dose anticoagulation on plasma lipids, apolipoproteins and lipoprotein families in post coronary artery bypass graft trial. *Atherosclerosis* 146:369-379
2. Auguste P, Javerzat S, Bikfalvi A (2003), Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res* 314:157-166
3. Baretton GB, Kirkpatrick CJ, Bültmann BD (2004), Gefäße. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hg.), Pathologie, 3. Auflage, München, Jena, 481-504
4. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M (2008), Growth factors and cytokines in wound healing *Wound Repair Regen* 16:585-601
5. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM (1998), Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1),  $\alpha_v\beta_3$  integrin, and GPIb $\alpha$ . *J Exp Med* 187:329-339
6. Braunwald E (1997), Shattuck Lecture - cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med* 337:1360-1369
7. Bretschneider E, Kaufmann R, Braun M, Wittpoth M, Glusa E, Nowak G, Schrör K (1999), Evidence for proteinase-activated receptor-2 (PAR-2)-mediated mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 126:1735-1740
8. Bretschneider E, Kaufmann R, Braun M, Nowak G, Glusa E, Schrör K (2001), Evidence for functionally active protease-activated receptor-4 (PAR-4) in human vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 132:1441-1446
9. Bretschneider E, Spanbroek R, Lötzer K, Habenicht AJR, Schrör K (2003), Evidence for functionally active protease-activated receptor-3 (PAR-3) in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 90:704-709
10. Brophy JM, Bourgault C, Brassard P (2003), The use of cholesterol-lowering medications after coronary revascularization. *CMAJ* 169:1153-1157
11. Brown BC, Albers JJ, Fisher LD, Schaefer SM, Lin JT, Kaplan C, Zhao XQ, Bisson BD, Fitzpatrick VF, Dodge HAT (1990), Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N Engl J Med* 323:1289-1298
12. Campeau L, Enjalbert M, Lesperance J, Bourassa MG, Kwiterovich P, Wacholder S, Sniderman A (1984), The relation of risk factors to the development of atherosclerosis in saphenous-vein bypass grafts and the progression of disease in the native circula-

- tion. A study 10 years after aortocoronary bypass surgery. *N Engl J Med* 311:1329-1332
13. Campeau L, Knatterud GL, Domanski M, Hunninghake DB, White CW, Geller NL, Rosenberg Y (1997), The effect of aggressive lowering of low-density lipoprotein cholesterol levels and low-dose anticoagulation on obstructive changes in saphenous-vein coronary-artery bypass grafts. *N Engl J Med* 336:153-162
  14. Carney DH, Mann R, Redin WR, Pernia SD, Berry D, Heggors JP, Hayward PG, Robson MC, Christie J, Annable C (1992), Enhancement of incisional wound healing and neovascularization in normal rats by thrombin and synthetic thrombin receptor-activating peptides. *J Clin Invest* 89:1469-1477
  15. Choi BG, Vilahur G, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ (2006), The role of high-density lipoprotein cholesterol in atherothrombosis. *Mt Sinai J Medicine* 73:690-701
  16. Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH (1997), Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res* 38:2264-2272
  17. Cobb MH, Boulton TG, Robbins DJ (1991), Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul* 2:965-978
  18. Coughlin SR (2000), Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407:258-264
  19. Dono R, Faulhaber J, Galli A, Zuniga A, Volk T, Texido G, Zeller R, Ehmke H (2002), FGF2 Signaling Is Required for the Development of Neuronal Circuits Regulating Blood Pressure. *Circ Res* 90:5-10
  20. Fager G (1995), Thrombin and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 77:645-650
  21. Fallier-Becker P, Rupp J, Fingerle J, Betz E (1990), Smooth muscle cells from rabbit aorta. In: Piper HM (ed.), *Cell culture techniques in heart and vessel research*, New York, Berlin, Heidelberg, 247-270
  22. Fan J, Unoki H, Iwasa S, Watanabe T (2000), Role of endothelin-1 in atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 902:84-94
  23. Fan J, Watanabe T (2003), Inflammatory Reactions in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 10:63-71
  24. Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I (1988), A heparin-binding angiogenic protein - basic fibroblast growth factor - is stored within basement membrane. *Am J Pathol* 130:393-400
  25. Frohlich J, Lear SA (2002), Old and new risk factors for atherosclerosis and development of treatment recommendations. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:838-842

26. Fuster V (1994), Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 90:2126-2146
27. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P (1994), Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94:2493-2503
28. Glass CK, Witztum JL (2001), Atherosclerosis - the road ahead. *Cell* 104:503-516
29. Glusa E, Pindur G (2005), Pharmakologie der Hämostase - antithrombotische und blutstillende Therapie. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (Hg.), Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage, München, Jena, 525-552
30. Gröchenig E (2005), Pathogenese der Atherosklerose. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M, Harrisons Innere Medizin, 16. Auflage, Berlin, 1528-1532
31. Hansson G.K (2001), Regulation of immune mechanisms in atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 947:157-165
32. Haraoka S, Shimokama T, Watanabe T (1995), Participation of T lymphocytes in atherogenesis: sequential and quantitative observation of aortic lesions of rats with diet-induced hypercholesterolaemia using en face double immunostaining. *Virchows Arch* 426:307-315
33. Haraoka S, Shimokama T, Watanabe T (1997), Role of T lymphocytes in the pathogenesis of atherosclerosis: animal studies using athymic nude rats. *Ann NY Acad Sci* 811:515-518
34. Harker LA, Hanson SR, Runge MS (1995), Thrombin hypothesis of thrombus generation and vascular lesion formation. *Am J Cardiol* 75:12B-17B
35. Hirano K (2007), The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:27-36
36. Hollenberg MD, Compton SJ (2002), Proteinase-Activated Receptors. *Pharmacol Rev* 54:203-217
37. Hollenberg MD (2005), Physiology and Pathophysiology of Proteinase-Activated Receptors (PARs): Proteinases as Hormone-Like Signal Messengers: PARs and More. *J Pharmacol Sci* 97:8-13
38. Itoh N, Ornitz DM (2004), Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 20:563-569
39. Iwasa S, Fan J, Miyauchi T, Watanabe T (2001), Blockade of endothelin receptors reduces diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Pathobiology* 69:1-10

40. Keller C (2005), Fettstoffwechsel; Lipidanker - Pharmakotherapie bei Fettstoffwechselstörungen. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (Hg.), Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage, München, Jena, 601-616
41. Kirklin JW, Barratt-Boyes BG (1993), Cardiac Surgery: morphology, diagnostic criteria, natural history, techniques, results, and indications, 2nd edition, New York
42. Kraemer R, Pomerantz KB, Joseph-Silverstein J, Hajjar DP (1993), Induction of basic fibroblast growth factor mRNA and protein synthesis in smooth muscle cells by cholesteryl ester enrichment and 25-hydroxycholesterol. *J Biol Chem* 268:8040-8045
43. Laemmli UK (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
44. Lee RT, Libby P (1997), The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1859-1867
45. Li AC, Glass C.K (2002), The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* 8:1235-1242
46. Lusis AJ (2000), Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241
47. Martorell L, Martínez-González J, Rodríguez C, Gentile M, Calvayrac O, Badimon L (2008), Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost* 99:305-315
48. Matsumoto S, Kobayashi T, Katoh M, Saito S, Ikeda Y, Kobori M, Masuho Y, Watanabe T (1998), Expression and localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits: relationship to lesion development. *Am J Pathol* 153:109-119
49. Mignatti P, Rifkin DB (1991 a), Release of basic fibroblast growth factor, an angiogenic factor devoid of secretory signal sequence: a trivial phenomenon or a novel secretion mechanism? *J Cell Biochem* 47:201-207
50. Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB (1991 b), Basic fibroblast growth factor released by single, isolated cells stimulates their migration in an autocrine manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11007-11011
51. Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB (1992), Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol* 151:81-93
52. Nationale Verzehrsstudie II (2008), hrsg. von: Max Rubner-Institut - Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel
53. Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G, Hama S, Lusis AJ, Castellani LW, Reddy S, Shih D, Shi W, Watson AD, Van Lenten BJ, Vora D, Fogelman AM (2001), HDL

- and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:481-488
54. Nickel W (2003), The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem* 270:2109-2119
  55. O'Brien PJ, Molino M, Kahn M, Brass LF (2001), Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene* 20:1570-1581
  56. Ornitz DM, Itoh N (2001), Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2:1-12
  57. Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C (1998), Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Genetics* 95:5672-5677
  58. Patterson C, Stouffer GA, Madamanchi N, Runge MS (2001), New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology. *Circ Res* 88:987-997
  59. Raines EW, Ross R (1993), Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J Suppl* 69:S30-S37
  60. Raines EW, Ross R (1995), Biology of Atherosclerotic Plaque Formation: Possible Role of Growth Factors in Lesion Development and the Potential Impact of Soy. *J Nutr* 125:624S-630S
  61. Rauch BH, Millette E, Kenagy RD, Daum G, Clowes AW (2004), Thrombin- and Factor Xa-Induced DNA Synthesis Is Mediated by Transactivation of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 94:340-345
  62. Rauch BH, Millette E, Kenagy RD, Daum G, Fischer JW, Clowes AW (2005), Syndecan-4 Is Required for Thrombin-induced Migration and Proliferation in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* 280:17507-17511
  63. Rauch BH, Scholz GA, Baumgärtel-Allekotte D, Censarek P, Fischer JW, Weber AA, Schrör K (2007), Cholesterol Enhances Thrombin-Induced Release of Fibroblast Growth Factor-2 in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler ThrombVasc Biol* 27:e20-e27
  64. Reis GJ, Kuntz RE, Silverman DI, Pasternak RC (1991), Effects of serum lipid levels on restenosis after coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 68:1431-1435
  65. Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA (2003), Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13 531-13 536
  66. Rosenfeld ME, Ross R (1990), Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 10:680-687

67. Ross R (1993), The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809
68. Ross R (1999), Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
69. Saksela O, Rifkin DB (1990), Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J Cell Biol* 110:767-775
70. Schrör K (2002), Antithrombotische Pharmaka in der vaskulären Medizin - eine historische Perspektive. In: Schrör K (Hg.), Antithrombotische Pharmaka - Neue therapeutische Strategien zur Thromboseprophylaxe und -therapie, Frechen, 1-25
71. Schultz JEJ, Witt SA, Nieman ML, Reiser PJ, Engle SJ, Zhou M, Pawlowski SA, Lorenz JN, Kimball TR, Doetschman T (1999), Fibroblast growth factor-2 mediates pressure-induced hypertrophic response. *J Clin Invest* 104:709-719
72. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ (1995), Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 333:1301-1307
73. Shimokama T, Haraoka S, Watanabe T (1994), Participation of T lymphocytes and macrophages in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb* 1:S14-S20
74. Silbey RJ, Alberty RA, Bawendi MG (2005), Physical Chemistry, 4. Auflage, Hoboken
75. Silva JA, White CJ, Collins TJ, Ramee SR (1998), Morphologic comparison of atherosclerotic lesions in native coronary arteries and saphenous vein graphs (sic!) with intracoronary angiography in patients with unstable angina. *Am Heart J* 136:156-163
76. Six I, Mouquet F, Corseaux D, Bordet R, Letourneau T, Vallet B, Dosquet CC, Dupuis B, Jude B, Bertrand ME, Bauters C, Van Belle E (2004) Protective effects of basic fibroblast growth factor in early atherosclerosis *Growth Factors* 22:157-167
77. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995), A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation* 92:1355-1374
78. Steinbrecher UP, Zhang HF, Loughheed M (1990), Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 9:155-168
79. Sun H, Unoki H, Wang X, Liang J, Ichikawa T, Arai Y, Shiomi M, Marcovina SM, Watanabe T, Fan J (2002), Lipoprotein (a) enhances advanced atherosclerosis and vascular calcification in WHHL transgenic rabbits expressing human apolipoprotein (a). *J Biol Chem* 277:47 486-47 492

80. Syväne M, Nieminen MS, Frick MH, Kauma H, Majahalme S, Virtanen V, Kesäniemi YA, Pasternack A, Ehnholm C, Taskinen MR (1998), Associations between lipoproteins and the progression of coronary and vein-graft atherosclerosis in a controlled trial with gemfibrozil in men with low baseline levels of HDL cholesterol. *Circulation* 98:1993-1999
81. Zhou M, Sutliff RL, Paul RJ, Lorenz JN, Hoying JB, Haudenschild CC, Yin M, Coffin JD, Kong L, Kranias EG (1998), Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. *Nat Med* 4:201-207
82. Zhu X, Komiya H, Chirino A, Faham S, Fox GM, Arakawa T, Hsu BT, Rees DC (1991) Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science* 251:90-93

### Verzeichnis der Internetadressen

<http://www.emdbiosciences.com/product/688000>; Datum des Downloads: 15.08.2005

<http://www.emdbiosciences.com/product/557370>; Datum des Downloads: 15.08.2005

<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>; Datum des Downloads: 10.11.2006

### 7 Publikationen

1. **Scholz GA**, Baumgärtel-Allekotte D, Weber AA, Schrör K, Rauch BH (2006), Intracellular mechanisms of Thrombin-induced release of basic fibroblast growth factor and its modification by cholesterol. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372 Suppl. 1
2. **Scholz GA**, Baumgärtel-Allekotte D, Weber AA, Schrör K, Rauch BH (2006), Thrombin-induced release of basic fibroblast growth factor depends on the rho kinase pathway and is enhanced in cholesterol-enriched human vascular smooth muscle cells. *Hämostaseologie* 26:A22
3. Rauch BH, **Scholz GA**, Baumgärtel-Allekotte D, Fischer JW, Weber AA, Schrör K (2006), Release of basic fibroblast growth factor by thrombin depends on the rho kinase pathway and is enhanced in cholesterol-enriched human vascular smooth muscle cells. *Vasc Pharmacol* 5:e129-e130
4. Rauch BH, Baumgärtel-Allekotte D, Wingendorf K, **Scholz GA**, Fischer JW, Weber AA, Schrör K (2006), Thrombin Induces Release of Fibroblast Growth Factor-2 via the Rho Pathway which is Enhanced in Cholesterol-enriched Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation* 114:70
5. Rauch BH, **Scholz GA**, Baumgärtel-Allekotte D, Censarek, Fischer JW, Weber AA, Schrör K (2007), Cholesterol Enhances Thrombin-Induced Release of Fibroblast Growth Factor-2 in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:e20-e25

### 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Univ.-Prof. Dr. K. Schrör für die Möglichkeit, meine Arbeit am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie anfertigen zu dürfen, sowie für die kritische Begleitung insbesondere in der Phase der schriftlichen Abfassung der Arbeit,

Herrn Priv.-Doz. Dr. B.H. Rauch für meine Einbindung in ein Forschungsprojekt, für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel, für die fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, für die umsichtige Betreuung und kritische Durchsicht der Arbeit und für die Übernahme des Hauptreferates,

Herrn Prof. Dr. U. Germing für die freundliche Übernahme des Korreferats,

Herrn Prof. Dr. J.W. Fischer, Herrn Prof. Dr. T. Hohlfeld, Herrn Prof. Dr. A.-A. Weber, Frau Priv.-Doz. Dr. J. Meyer-Kirchrath sowie allen wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für die anregenden und weiterführenden Diskussionen im Rahmen der Arbeitsgruppenbesprechungen,

Frau B. Weyrauther für die tatkräftige Unterstützung bei der Arbeit im Zellkulturlabor sowie Frau P. Kuger, Frau K. Freidel, Frau P. Mann, Frau B. Reupert und Frau I. Rüter für ihre ständige Hilfsbereitschaft im Laboralltag,

Frau E. Lohmann und Frau K. Montag für die Organisation des Institutslebens sowie

allen Damen und Herren im Institut für die angenehme Arbeitsatmosphäre und

meinen Eltern für die Unterstützung während des gesamten Studiums.

## **9 Eidesstattliche Versicherung**

---

### **9 Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher noch von keiner medizinischen Fakultät abgelehnt.

Ich bin mir darüber klar, dass der Bruch der obigen eidesstattlichen Versicherung in jedem Fall zur Folge hat, dass die Fakultät die Promotion widerruft.

Düsseldorf, den 06.06.2009

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Godehard Albert Scholz  
Geburtsdatum: 07. September 1981  
Geburtsort: Aachen

### Schullaufbahn

August 1987 bis Juli 1991 Besuch der Städtischen Katholischen Grundschule Hanbrucher Straße in Aachen  
August 1991 bis Juni 1998 Besuch des Couven-Gymnasiums in Aachen  
August 1998 bis Juni 2000 Besuch des Bischöflichen Pius-Gymnasiums in Aachen  
Juni 2000 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

### Zivildienst

Juli 2000 bis April 2001 Ableistung des Zivildienstes im Luisenhospital in Aachen

### Hochschulstudium

Sommersemester 2001 bis Wintersemester 2007 / 2008 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
April 2003 Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung nach alter Approbationsordnung  
Dezember 2007 Bestehen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung nach neuer Approbationsordnung  
27. Dezember 2007 Erteilung der Approbation als Arzt

### Beruflicher Werdegang

Seit dem 1. April 2008 Assistenzarzt am Universitätsklinikum Erlangen in der Medizinischen Klinik 5 - Hämatologie und Internistische Onkologie (Direktor: Prof. Dr. A. Mackensen)

Düsseldorf, den 06.06.2009

### 11 Abstract

Godehard Albert Scholz

#### **Freisetzung des basischen Fibroblastenwachstumsfaktors aus humanen glatten Gefäßmuskelzellen durch Thrombin und Cholesterin**

Die glatte Gefäßmuskulatur ist in der Pathogenese der Atherosklerose von zentraler Bedeutung, da die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen zur Verdickung der Gefäßwand beitragen und den Krankheitsverlauf vorantreiben. Daher besteht ein Interesse daran, die Mechanismen, die insbesondere den Prozess der Proliferation steuern, zu identifizieren.

Vor diesem Hintergrund waren folgende Fragestellungen Gegenstand der vorliegenden Arbeit: (i) Welchen Einfluss haben Thrombin, der Wachstumsfaktor bFGF und Cholesterin auf die DNA-Syntheserate glatter Gefäßmuskelzellen? (ii) Welche Thrombinrezeptoren sind an der Freisetzung von bFGF aus glatten Gefäßmuskelzellen beteiligt? (iii) Welche intrazellulären Signalwege führen zur Freisetzung von bFGF? (iv) Löst eine Vorbehandlung glatter Gefäßmuskelzellen mit Cholesterin die Freisetzung von bFGF aus?

Die im Rahmen der Arbeit experimentell ermittelten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: (i) Sowohl Thrombin als auch bFGF regen glatte Gefäßmuskelzellen zur Proliferation an. Die Thrombin-induzierte Steigerung der DNA-Syntheserate wird durch den Wachstumsfaktor bFGF vermittelt. Cholesterin verstärkt die mitogene Wirkung von Thrombin. (ii) Die selektive Aktivierung von PAR-1, PAR-3 und PAR-4 führt zu einer erhöhten Freisetzung von bFGF aus glatten Gefäßmuskelzellen. (iii) Die Vorbehandlung glatter Gefäßmuskelzellen entweder mit dem Inhibitor Rho-assoziiierter Proteinkinasen Y-27632 oder mit dem Inhibitor der PKC  $\delta$  Rottlerin hebt die Thrombin-induzierte Freisetzung von bFGF auf. Daraus ist zu schließen, dass diese beiden PAR-1 nachgeschalteten Enzyme Bestandteil der Signalkaskade sind, die nach Thrombinstimulation zur Freisetzung von bFGF führt. (iv) Die Hypercholesterinämie ist ein wichtiger Risikofaktor für das Auftreten der Atherosklerose. Die Inkubation glatter Gefäßmuskelzellen mit Cholesterin bewirkt eine Freisetzung von bFGF. Insbesondere verstärkt Cholesterin die Thrombin-induzierte bFGF-Freisetzung. Dies führt zu einer verstärkten Aktivierung mitogener Signalwege, beispielsweise der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK 1/2), und zu einem verstärkten Zellwachstum. Cholesterin forciert also im Zusammenspiel mit Thrombin durch die Freisetzung von bFGF die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Insgesamt tragen die gewonnenen Ergebnisse dazu bei, den Mechanismus der Läsionsformation und -progression im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose besser zu verstehen.