# Pharmakologische Ansätze einer Proteinkinase A-Aktivierung zur Hemmung der Mitogenese glatter Gefäßmuskelzellen

# Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

von Michael Osinski aus Oberhausen

> Düsseldorf 2000

# Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. K. Schrör

Korreferent: Prof. Dr. H.-D. Höltje

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2000

Inhal	<u>Seite</u>	
1.	Einleitung und Fragestellung	
1.1	Abkürzungsverzeichnis	1
1.2	Restenose und Mitogenese	4
1.3	Über die Funktion zyklischer Nukleotide	8
1.4	Die Proteinkinase A	9
1.5	cAMP-Analoga als Modulatoren der PKA-Aktivität	12
1.6	Trapidil	13
1.7	Phosphodiesterasen und Phosphodiesterase-Inhibitoren	15
1.8	Organische Nitrate	17
1.9	Fragestellung	19
2.	Material und Methoden	
2.1	Zellkultur	21
2.2	DNA-Synthese-Messung	22
2.3	Protein-Bestimmung	23
2.4	Cytotoxizitäts-Test	23
2.5	Western blot	24
2.6	Bestimmung der zyklischen Nukleotide	26
2.7	Bestimmung der PDE-Inhibition durch HPLC	27
2.8	Bestimmung der PKA- und PKG-Aktivität	27
2.9	Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (SPR)	29
2.10	Statistik	30
2.11	Chemikalien	31
2.12	Geräte	33
2.13	Lösungen	34

3.	Ergebnisse				
3.1	Isoform-selektive cAMP-Phosphodiesterase-Hemmer	36			
	3.1.1 Antimitogene Wirkungen				
	3.1.2 Signaltransduktion				
3.2	Sildenafil und organische Nitrate	41			
	3.2.1 Antimitogene Wirkungen				
	3.2.2 Signaltransduktion				
3.3	Trapidil 49				
	3.3.1 Antimitogene Wirkungen				
	3.3.2 Signaltransduktion				
	3.3.3 Molekularer Mechanismus der PKA-Aktivierung				
3.4	Trapidil-Derivate	60			
3.5	Isoform-selektive cAMP-Analoga	68			
3.6	PKA-vermittelte antimitogene Wirkungen in humanen SMC	71			
4.	Diskussion				
4.1	Bedeutung der antimitogenen Wirkung auf SMC	73			
4.2	Wirkung und Signaltransduktion selektiver Inhibitoren der				
	PDE-Isoformen 3 und 4	74			
4.3	Wirkung und Signaltransduktion von Sildenafil, GTN, ISMN	und PETN 77			
4.4	Wirkung und Signaltransduktion von Trapidil und Trapidil-Derivaten				
4.5	Molekularer Mechanismus der direkten PKA-Aktivierung dur	rch Trapidil 84			
5.	Zusammenfassung	86			
6.	Literatur	87			
7.	Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit	100			
8.	Danksagung und Eidesstattliche Erklärung				
9.	Lebenslauf				

#### **Einleitung**

# 1.1 Abkürzungsverzeichnis

ABA 8-(4-Aminobutyl)aminoadenosin-3'-5'-monophosphat

AC Adenylatcyclase

ADP Adenosin 5'-diphosphat

AKAP A-Kinase Ankerprotein

8-AHA-cAMP 8-(6-Aminohexyl)adenosin-3',5'-monophosphat

AMP Adenosin 5'-monophosphat

APS Ammoniumpersulfat

BSA Bovines Serumalbumin

cAMP Zyklisches Adenosin 3',5'-monophosphat

ASS Acetylsalicylsäure

ATP Adenosin 5'-triphosphat

C Katalytische Untereinheit der PKA

cAMP Zyklisches Adenosin- 3',5'-monophosphat

pCPT-cGMP Zyklisches 8-(4-Chlorophenylthio)-guanosin-3',5'-monophosphat

DCI Sp-5,6-dichlorobenzimidazol-1-β-D-ribofuranosyl-monophosphothioat

DMEM Dulbeccos Modified Eagle Medium

DMSO Dimethylsulfoxid

DTT Dithiothreitol

EGTA Ethylenglykol-bis(2-amino-ethylether)-N',N-tetraessigsäure

EDTA Ethylen-diamin-tetraessigsäure

ERK "extracellular signal-regulated kinase"

FCS Fetales Kälberserum

Guaninnukleotid-bindendes Protein mit stimulierender Wirkung auf die

Adenylatcyclase

cGMP Zyklisches Guanosin 3',5'-monophosphat

GTN Glyceroltrinitrat

H89 N-[2-((p-Bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isochinolin-sulfonamid

HEPES N-[2-Hydroxythyl)]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure]

G-Protein Guanylbindendes Protein

GTP Guanintriphosphat

Ham's F12 Synthetisches Zellmedium

HPLC High performance liquid chromatography

IBMX Isobutyl-methyl-xanthin

ISMN Isosorbid-5-nitrat (Isosorbidmononitrat)

KT5823 2,3,9,10,11,12-Hexahydro-10-methoxy-2,9-1-oxo-[9,12-epoxy-

1Hdiindolo[1,2,3-fg:3'2'1'-kl]pyrrolo-[3,4-i][1,6]benzodiazocin-10-

carboxyl]-methylester-[9R-(9 $\alpha$ , 10 $\beta$ , 12 $\alpha$ )]

MAPK Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MB N<sup>6</sup>-Monobutyryadenosin-3'-5'-cyclomonophosphat

MBC N<sup>6</sup>-Mono-t.-butylcarbamoyladenosin-3'-5'-cyclomonophosphat

mM Millimolar (mMol/l)

nm Nanometer

nM Nanomolar (nMol/l)
NO Stickstoffmonoxid

PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS Phosphatgepufferte Salzlösung

PBS-T Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20

PDE Phosphodiesterase

PDGF Platelet-derived growth factor

PETN Pentaerythritoltetranitrat (Pentaerythrityltetranitrat)

PGI<sub>2</sub> Prostazyklin

PKA Proteinkinase A
PKC Proteinkinase C
PKG Proteinkinase G

PKI Peptid-Inhibitor der PKA ("Walsh-Inhibitor")

PKI<sub>myr</sub> Myristoylierte Form des PKI

PMA Phorbol-12-myristat-13-acetat

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid

PTCA Perkutane transluminale Koronarangioplastie

PVDF Polyvinyldifluorid

R Regulatorische Untereinheit der PKA

RU response units

Rp-cAMPS Äquatoriales (RP-) Diastereomer des Adenosin 3',5'-

monophosphorothioates

SMC Glatte Gefäßmuskelzellen

SNAP S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin

SDS Natriumdodecylsulfat

SPR "surface plasmon resonance", Oberflächen-Plasmon-Resonanz

TEAF Triethyl-ammonium-formiat

TEMED N,N,N,N-Tetramethylendiamin

TPD Trapidil

TRIS Tris-Hydroxymethyl-aminomethan

 $TXA_2$  Thromboxan  $A_2$ 

VASP Vasodilator-stimulated phosphoprotein

 $\mu M$  Mikromolar ( $\mu Mol/l$ )

#### 1.2 Restenose und Mitogenese

#### Entstehung der Restenose

Die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) ist gegenwärtig eine der wichtigsten therapeutischen Möglichkeiten zur Eröffnung eines Gefäßes bei drohendem oder bereits statt gefundenem Myokardinfarkt. Die initiale Erfolgsrate ist zwar hoch, doch kommt es bei etwa der Hälfte der behandelten Patienten zu einer Restenose des dilatierten Gefäßes. Im Gegensatz zur atherosklerotisch bedingten Stenose, die erst nach Jahrzehnten fortgesetzter Gefäßschädigung auftritt, entwickelt sich die Restenose nach PTCA innerhalb weniger Monate. Die Ursachen sind vielfältig und in vielen Details noch ungeklärt. Die PTCA führt zu einer Gefäßwandschädigung, die mit dem Verlust des Endothels einhergeht.

Wahrscheinlich in Zusammenhang damit kommt es zu einem Mangel antithrombotischer und vasodilatierender Faktoren aus dem Endothel, zur Expression von Adhäsionsmolekülen (z. B. P-Selektin), zur Anlagerung von Thrombozyten an die freigelegte Intima. Diese sezernieren eine Reihe von Wachstumsfaktoren, darunter wird das PDGF als besonders wichtig angesehen [Dangas und Fuster 1993, Cercek et al. 1991]. Weitere mitogene Faktoren sind Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) und Thrombin [Zucker et al. 1997]. In der Folge der Endothelschädigung verlieren die glatten Muskelzellen der Media ihre kontraktilen Fähigkeiten, exprimieren Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und migrieren in das Gefäßlumen. Dort setzen die Muskelzellen unter Bildung einer Neointima Matrixproteine frei, diese können dann zum Verschluß des Gefäßes führen. Bei der Migration der glatten Muskelzellen von der Media zur Intima, deren Proliferation und Matrixsynthese spielt PDGF eine Schlüsselrolle [Ferns et al. 1991, Reidy et al. 1992, Reines und Ross 1993].

PDGF wird nicht nur von den Thrombozyten freigesetzt, sondern auch von Muskelzellen selbst synthetisiert [Reines und Ross 1993]. Das PDGF-Molekül ist ein 27 – 31 kDa großes Glykoprotein und setzt sich aus zwei Polypeptidketten zusammen. Daraus bilden sich die Isoformen PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB [Bobik et al. 1993]. PDGF, insbesondere die Isoform BB, gilt als eines der hauptsächlich an der Entstehung der Restenose beteiligten Mitogene [Majesky et al. 1990, Ferns et al. 1991, Reines und Ross 1993]. Daher ist in dieser Arbeit die Isoform BB verwendet worden.

#### Mitogene Signaltranduktion

Mitogene Wirkungen von Wachstumsfaktoren wie PDGF werden über Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität vermittelt. Der PDGF-Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, welche die Isoformen αα, αβ und ββ bilden. Die Affinität der PDGF-Isoformen zu den Rezeptor-Isoformen ist unterschiedlich. Die in dieser Arbeit verwendete Isoform PDGF-BB bindet an alle drei Rezeptor-Isoformen [Claesson-Welsh 1994]. Die exprimierten Mengen an PDGF und PDGF-Rezeptoren steigen in kultivierten Zellen und in Zellen mit atherosklerotischer Plaques um ein Vielfaches an [Bobik et al. 1993]. Die Bindung von PDGF an seinen Rezeptor führt zur Dimerisierung zweier Untereinheiten und zu nachfolgender Aktivierung der Rezeptorkinase. Neben der Autophosphorylierung kommt es auch Phosphorylierung spezifischer zytoplasmatischer Rezeptorautophosphorylierung veranlaßt die Bindung verschiedener zellulärer Proteine, die über eine SH2-Domäne (homolog zur Sequenz des c-src-Protoonkogens) verfügen. Dazu gehört auch die Isoform y der Phospholipase C. Ein Teil der involvierten Proteine enthält zusätzlich eine SH3-Domäne, die ebenfalls phosphoryliert wird. Dies trifft auf die Proteine Grb2 und Shc zu, die anschließend als Adapterproteine für den aktivierten PDGF-Rezeptor fungieren. Die Bindung von Grb2 an den Ras-Guaninnukleotid-Austauschfaktor mSOS verbindet die den PDGF-Rezeptor dann mit der Ras-MAPK-Kaskade [Claesson-Welsh 1994, Malarkey et al. 1995]. GTP-gebundenes Ras bindet die Raf-1-Kinase und transferiert diese an die Plasmamembran. Dort setzt sie über weitere, teilweise noch unklare Zwischenschritte die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen, MAPK) in Gang. Diese werden auch als "extracellular signal regulated kinases" (ERKs) bezeichnet. In diesem Zusammenhang haben die p38- und die p42/p44 MAP-Kinasen eine große Bedeutung [Davis 93]. MAP-Kinasen wie die p42/p44 MAP-Kinase sind Bestandteil einer gemeinsamen Endstrecke der mitogenen Signaltranduktion, die nicht nur durch Wachstumsfaktoren mit Tyrosinkinase-Rezeptoren genutzt wird, sondern auch durch Proteinkinase C (PKC)vermittelte mitogene Stimuli wie zum Beispiel Phorbolsäureester. Die PKC ist an der mitogenen Wirkung von PDGF in glatten Gefäßmuskelzellen allerdings nicht beteiligt [Sharma et al. 1993, Bönisch et al. 1998]. Die p42/p44 MAP-Kinasen können auch durch MAP-Kinase-Kinasen (MAPKK oder MEK) phosphoryliert und damit aktiviert werden. Nach Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgt die Translokation in den Zellkern. Dort wird die Aktivierung nuklearer Protoonkogene wie c-jun induziert [Pulverer et al. 1991] und ribosomale S6-Kinasen phosphoryliert werden. Die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NFkB an der Signaltranduktion von PDGF ist nachgewiesen worden, doch der Mechanismus

der NFκB-Aktivierung ist noch unklar [Bretschneider et al. 1997]. Einen vereinfachten Überblick über die mitogene Signaltransduktion zeigt Abb. 1.

## Antimitogene Wirkung der PKA-Aktivierung

Angesichts der enormen Bedeutung der PTCA und des Problems der Restenose sind umfangreiche Anstrengungen unternommen worden, um zu einer wirksamen Prävention der Restenose zu gelangen. Dazu gehörten auch der Einsatz verschiedenster Pharmaka. Leider blieb der Erfolg in den meisten Fällen aus. Zu den wenigen positiven Ausnahmen gehört Trapidil (Rocornal®) und der selektive PDE3-Inhibitor Cilostazol (Pletaal®). Beiden Arzneimitteln ist gemeinsam, daß sie die Proteinkinase A aktivieren. Die antimitogene Wirkung gesteigerter PKA-Aktivierung ist mehrfach gezeigt worden. Die PKA ist in der Lage, die mitogene Signaltransduktionskaskade von PDGF über die Hemmung von raf-1 zu unterbrechen [Cook et al. 1994, Wu et al. 1993, Bornfeldt et al. 1999]. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, eine Aktivierung der PKA in SMC herbeizuführen [Graves et al. 1996]. Dazu zählen die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) mit nachfolgendem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels [Jonzon et al. 1985, Loesberg et al. 1985, Zucker et al. 1997], die direkte PKA-Aktivierung z. B. durch cAMP-Analoga [Southgate et al. 1990] oder die Hemmung der cAMP-metabilisierenden Phosphodiesterasen (PDE's) [Polson und Strada 1996].

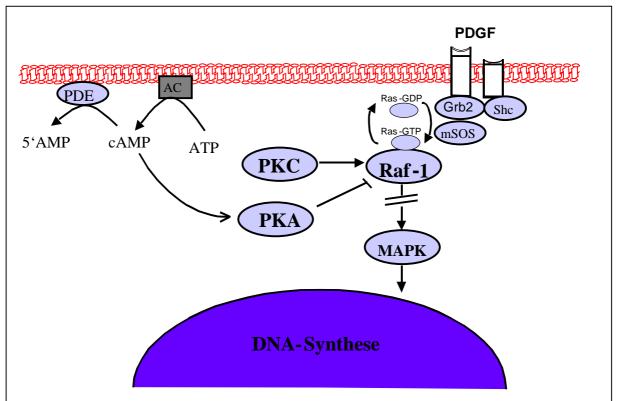


Abbildung 1: Mitogene Signaltranduktion von PDGF über Raf-1-Kinase und MAP-Kinasen sowie die PKA-vermittelte Hemmung der DNA-Synthese in glatten Gefäßmuskelzellen

#### 2.2 Über die Funktion zyklischer Nukleotide

Die meisten Arzneistoffe, Hormone und andere physiologischen Transmitter erfüllen ihre Funktion bereits in sehr geringen Konzentrationen. Dies ist möglich, weil Rezeptoren als Bindungspartner fungieren und das Signal an zelleigene Verstärkersysteme weiterleiten. Der cAMP/PKA- und der cGMP/PKG-Signaltransduktionweg gehören dabei zu den wichtigsten Mechanismen. Wenn ein Ligand an mit einem stimulierenden GTP-bindendes Protein (G<sub>s</sub>-Protein) gekoppelten Rezeptor bindet, kommt es zur Aktivierung der Adenylatcyclase (AC), diese bildet den "second messenger" cAMP. Durch den Anstieg der cAMP-Konzentration wird die cAMP-abhängige Proteinkinase, auch Proteinkinase A (PKA) genannt, aktiviert. Das klassische Beispiel für diesen Signaltransduktionsweg ist das β-adrenerge System mit Katecholaminen als "first messenger".

Für cGMP, welches durch die Guanylatcyclase (GC) gebildet wird, gilt Entsprechendes, allerdings kann die partikuläre GC direkt durch eine Liganden-bindende extrazelluläre Domäne aktiviert werden [Garbers et al. 1989]. Die lösliche Guanylatcyclase wird durch Stickstoffmomoxid (NO) aktiviert [Snyder et al. 1992]. Dies führt anschließend zur Aktivierung der Proteinkinase G (PKG). Bei sehr hohen cGMP-Konzentrationen ist aber auch eine stimulierende Wirkung auf die PKA möglich (Shabb et al. 1991). Zu den Arzneistoffen, die NO freisetzen, zählen die organischen Nitrate (chemisch: Salpetersäureester).

Die Nukleotid-abhängigen Kinasen phosphorylieren weitere Enzyme und nehmen so auf die Zelle Einfluß. Zur Regulation gehört natürlich auch ein Abschaltmechanismus. Diese Funktion nehmen Phosphodiesterasen (PDE) wahr. Diesen bauen zyklische Nukleotide zu AMP bzw. GMP ab. Daneben existieren noch weitere Regulationsmöglichkeiten, so kann die Rezeptorpopulation auf der Zelloberfläche geändert werden oder es können Phosphodiesterasen gehemmt werden.

#### 2.1 Die Proteinkinase A

Die Proteinkinase A (PKA), auch cAMP-abhängige Proteinkinase (cAPK) genannt, ist ein Heterotetramer aus zwei dimerisierten regulatorischen (R) und zwei monomeren katalytischen (C) Untereinheiten (Krebs und Beavo 1979). Vier Moleküle cAMP binden an das inaktive Holoenzym (R<sub>2</sub>C<sub>2</sub>), welches sich darauf hin in zwei C-Monomere und ein R-Dimer aufspaltet [Scott und Soderling et al. 1992, Ogreid et al. 1982]. Die freigewordenen und damit aktiven C können Serin- und Threoninreste spezifischer Substratproteine phosphorylieren. In Abbildung 2 ist der Mechanismus der PKA-Aktivierung durch cAMP dargestellt.

Es sind drei Isoformen der katalytischen ( $C\alpha$ ,  $C,\beta$  und  $C\gamma$ ) und vier Isoformen der regulatorischen ( $RI\alpha$ ,  $RI\beta$ ,  $RII\alpha$  und  $RII\beta$ ) Untereinheit bekannt. Sie werden in unterschiedlichen Verhältnissen in verschiedenen Säugerzellen exprimiert und verbinden sich entsprechend ihrer regulatorischen Untereinheiten zu Typ I oder Typ II Holoenzymen. Die Subformen der katalytischen Untereinheiten zeigen keine bevorzugte Bindung an RI oder RII [Maronde 1993, Taylor et al. 1989].

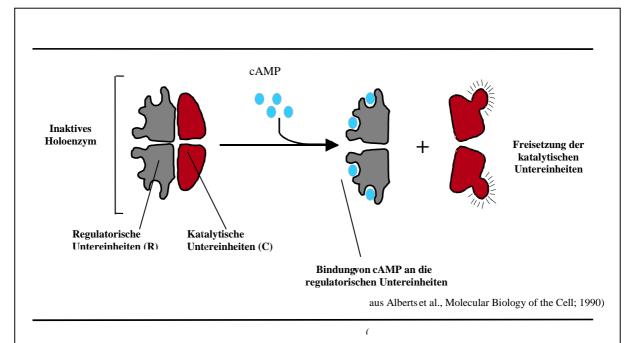


Abb. 2: Aktivierung der PKA durch Bindung von cAMP an die Bindungsstellen der beiden R mit anschließender Aufspaltung des inaktiven Holoenzyms und Freisetzung der beiden C.

In neuronalen und testikulären Geweben werden überwiegend die β-Formen der jeweiligen Untereinheiten exprimiert, in den anderen sind es bevorzugt die \alpha-Formen [Scott und Soderling 1992]. Die katalytischen Untereinheiten enthalten Substratprotein- und MgATP-Bindungsstellen. Außerdem befindet sich eine Proteinkinase-Inhibitor (PKI)-Bindungsstelle außerhalb der Substratbindungsstellen [Knighton et al. 1991] bei  $C_{\alpha}$  und  $C_{\beta}$ , nicht aber bei  $C_{\gamma}$ . Die katalytisch aktive Region der C enthält Aminosäuresequenzen, die in allen Proteinkinasen zu finden sind. Darunter befinden sich besonders die Strukturelemente, die an der ATP-Bindung, der Protein/Peptidbindung und an der Phosphotransferase-Funktion beteiligt sind [Scott und Soderling 1992]. Auch im Bereich der regulatorischen Untereinheiten finden sich Gemeinsamkeiten zu anderen Proteinkinasen. So besitzt an der Amino-terminalen Seite sowohl die RII als auch die PKG eine Autophosphorylierungsstelle, bei der RI findet sich an der entsprechenden Stelle eine "Pseudosubstrat-Bindungsstelle" [Knighton 1991]. Die Autophosphorylierungssequenz der RII kann an Serin 97 phosphoryliert werden [Rosen und Erlichmann 1975]. Bei RI ist an der entsprechenden Stelle das Serin durch das nicht phosphorylierbare Alanin ersetzt. Es kommt aber dort zu einer hochaffinen Bindung von MgATP [Hofmann et al. 1975, Durgerian et al. 1989]. Diese homologen Regionen der RI und RII werden auch als "hinge"-Region bezeichnet [Taylor et al. 1989]. Die genaue Funktion dieser Region ist nicht bekannt, allerdings ist die dephosphorylierte Form der PKA erst bei höheren cAMP-Konzentrationen zu aktivieren [Hofmann et al. 1975].

Das Dimer der beiden regulatorischen Untereinheiten (R) verfügt über je zwei cAMP-Bindungsstellen, die als A und B bezeichnet werden. Beide befinden sich in der Carboxyterminalen Region der R-Monomere [Titani et al. 1984]. Ausgehend von der Rate des <sup>3</sup>[H]cAMP-Austausches [Rannels und Corbin 1981, Ogreid et al. 1982 und Doskeland et al. 1984] und den <sup>3</sup>[H]cAMP-Assoziations-und Dissoziationsraten [Ogreid und Doskeland 1982, Taylor et al. 1989] konnte gezeigt werden, daß die beiden Bindungsstellen nicht identisch sind. Die schnell austauschende A-Bindungsstelle liegt näher am Amino-terminalen Ende [Taylor et al. 1989]. Die cAMP-Bindung findet zunächst an der B-Bindungsstelle statt. Dieser Komplex ist katalytisch noch inaktiv, es findet jedoch eine Konformationsänderung statt, die zur Exposition der beiden A-sites führt. Dadurch erhöht sich die Affinität der A-site zu cAMP. Zwischen den beiden cAMP-Bindungsstellen existiert daher eine Kooperativität. Dies hat zur Konsequenz, daß bereits relativ geringe Anstiege der intrazellulären cAMP-Konzentration zu einer erheblichen Steigerung der PKA-Aktivität führen können. Erst die Besetzung beider Bindungsstellen führt zur Freisetzung der katalytischen Untereinheiten, diese stellen nach heutiger Auffassung die aktive Form der PKA dar [Ogreid und Doskeland

83, Neitzel et al. 1991]. Unter Umständen ebenfalls aktive, sogenannte trimere Formen mit  $R_xC_x$ cAMP sind inaktiv oder so kurzlebig, daß von ihnen unter physiologischen Bedingungen keine nennenswerte Aktivität ausgeht. Eine Ausnahme bildet die PKAII aus Rattenherz [Jiang und Corbin 1991].

#### 2.4 cAMP-Analoga als Modulatoren der PKA-Aktivität

Analoga der physiologischen zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP spielen eine wichtige Rolle bei Untersuchungen zur PKA bzw PKG innerhalb und außerhalb lebender Zellen. Die verschiedenen cAMP-Analoga unterscheiden sich in folgenden Eigenschaften:

- Stabilität gegen Phosphodiesterasen (gilt für fast alle cAMP-Analoga)
- Bevorzugung einer bestimmten cAMP-Bindungsstelle
- Verbesserte Zellgängigkeit gegenüber cAMP
- Hemmung der Kinase-Aktivität anstelle einer stimulierenden Wirkung

Durch die Verwendung von cAMP-Analoga können PKA-Isoenzyme und auch bestimmte die einzelnen cAMP-Bindungsstellen (A und B) gezielt aktiviert bzw. gehemmt werden. Dabei sind bestimmte Regeln bei den Struktur-Wirkungs-Beziehungen festgestellt worden. So bevorzugen C8-substituierte Analoge im allgemeinen die B-site, während C2-und N6-substituierte Analoga die A-site bevorzugen [Ogreid et al. 1989, Yokozaki et al. 1992, Maronde 1993].

Der Mechanismus, auf Grund dessen Rp-cAMPS und andere PKA-Inhibitoren an R binden ohne zu aktivieren, ist bisher nicht genau geklärt. Sowohl Rp-cAMPS als auch anderen PKA-Inhibitoren besitzen auch eine partialagonistische Wirkung, die unter bestimmten Bedingungen sogar zu einer vollen Aktivierung der PKA führen kann. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen Analoga um langsame Aktivatoren der PKA, die zwar cAMP aus cAMP-Bindungsstellen verdrängen können aber selber die den aktivierende Konformationsänderung der PKA nur sehr langsam auslösen [Maronde 1993, Genieser, pers. Mitteilung]. Besonders problematisch ist die Kombination site-selektiver aktivierender mit inhibierenden cAMP-Analoga. Die inhibierende Komponente kann hier die Wirkung des Agonisten sogar noch verstärken. Auch hier ist der Mechanismus nicht genau bekannt. Dies war der entscheidende Grund, warum in der vorliegenden Arbeit zur Klärung des Wirkmechanismus von Trapidil auf die Verwendung selektiver PKA-Inhibitoren verzichtet wurde.

#### 1.6 Trapidil

Das Triazolopyrimidin Trapidil (5-Methyl-7-diethylamino-s-triazolo  $(1,5\alpha)$  pyrimidin) ist in Deutschland zur Behandlung der ischämischen Herzkrankheit zugelassen (Rocornal<sup>©</sup>). In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, daß Trapidil vielfältige Wirkungen auf das kardiovaskuläre System ausübt. Dazu gehören Vasodilatation mit Steigerung des koronaren Blutflusses [Füller et al. 1971, Noguchi et al. 1981], Hemmung der Thrombozytenaktivierung [Ohnishi et al. 1982, Mest et al. 1990], Hemmung der Proliferation "PDGF"- stimulierter Zellen in vivo und in vitro [Ohnishi et al. 1982, Tiell et al. 1983, Giessler et al. 1987, Cercek et al. 1993]. Allerdings erwiesen sich bei diesen Untersuchungen nur sehr hohe, meist Die millimolare Trapidilkonzentrationen als wirksam. maximal erreichbare Plasmakonzentrationen nach Einnahme therapeutischer Dosen Trapidil liegt aber bei 10 µM [Harder et al. 1996]. In letzter Zeit ist besonders die antimitogene Wirkung von Trapidil auf Interesse gestoßen, weil sich damit die Hoffnung auf eine Verminderung der Restenoserate nach PTCA verbindet. In der STARC-Studie [Maresta et al. 1994], einer kontrollierten randomisierten Doppelblindstudie, wurde die Restenoserate gegenüber Acetylsalicylsäure (ASS) signifikant vermindert. Innerhalb des Behandlungszeitraumes von sechs Monaten waren 40 % der ASS-Gruppe, aber nur 24 % der Trapidilgruppe von einer Restenose betroffen. Einige andere klinische Studien brachten ebenfalls ein positives Ergebnis für Trapidil [Nishikawa et al. 1992, Okamato et al. 1992]. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die gute Verträglichkeit von Trapidil.

Über den Wirkmechanismus von Trapidil gab es in der Vergangenheit sehr unterschiedliche Auffassungen. In der Regel wurde die Trapidilwirkung auf eine Hemmung der Phosphodiesterasen zurückgeführt, doch bei einer Konzentration von bis zu  $10~\mu M$  konnte in keiner experimentellen Untersuchung eine Inhibition der Phosphodiesterasen bzw. eine Erhöhung der Konzentrationen an zyklischen Nukleotiden nachgewiesen werden. In einer Arbeit am isolierten Meerschweinchenherzen [Bethke et al. 1991] wurde die Hemmwirkung von Trapidil auf die PDE-Isoformen 1 - 5 untersucht. Dabei zeigte sich eine dem Theophyllin vergleichbare unselektive PDE-Hemmung durch Trapidil. In Abhängigkeit von der untersuchten Isoform lag die  $IC_{50}$  für die PDE-Hemmung zwischen 190 und  $420~\mu M$ . Für den unselektiven, ebenfalls antimitogen wirksamen PDE-Inhibitor IBMX wurden  $IC_{50}$  -Werte zwischen 5 und  $30~\mu M$  nachgewiesen. Als Erklärung für die antimitogene Wirkung von Trapidil wurde in der Vergangenheit von einigen Autoren [Nishikawa et al. 1992, Okamato et al. 1992, Maresta et al. 1994] auch eine antagonistische Wirkung von Trapidil auf den PDGF-

Rezeptor angenommen. Diese Hypothese ist allerdings nie belegt worden. Dagegen spricht auch, daß Trapidil nicht nur die mitogene Wirkung von PDGF, sondern auch anderer Mitogene wie zum Beispiel Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder Lipopolysacchariden hemmen kann [Bönisch et al. 1998]. Eine weiteres Argument gegen einen PDGF-Rezeptorantagonismus von Trapidil lieferte Hoshiya et al. [1998].: glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte konnte die PDGF-induzierte Phosphorylierung des PDGF-Rezeptors und nachgeschalteter Signaltransduktionsproteine durch Trapidil nicht beeinflußt werden. Erst die PDGF-abhängige Phosphorylierung der Kinase raf-1 wird durch Trapidil aufgehoben [Bönisch et al. 1998]. Daher erscheint der von Bönisch [Bönisch 1998] erstmals gefundene Mechanismus einer PKA-Aktivierung durch Trapidil zur Erklärung der antimitogenen Wirkung plausibel: Die PKA-abhängige Inhibition der raf-1 Kinase-Aktivität erklärt die oben aufgeführten Befunde zur antimitogenen Wirkung nicht nur von PDGF, sondern auch bei anderen Mitogenen, weil ein zentraler Schritt der vielen Mitogenen gemeinsamen Signaltransduktion gehemmt wird. Unklar war bisher, wie es zu dieser PKA-Aktivierung kommt. Einen Wirkmechanismus dafür zu finden, war eine wesentliche Aufgabe der vorliegenden Arbeit.

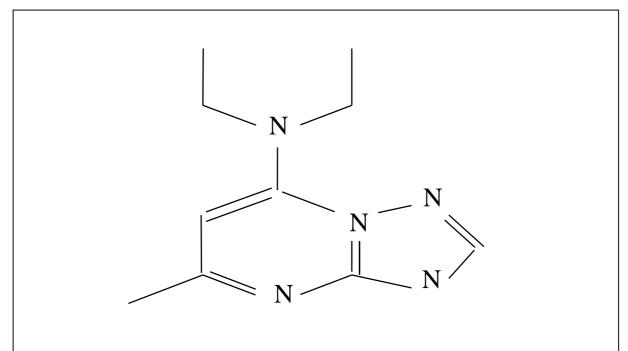


Abb. 3: Strukturformel Trapidil (5-Methyl-7-diethylamino-s-triazolo (1,5α) pyrimidin, MG 204,5)

#### 2.6 Phosphodiesterasen und Phosphodiesterase-Inhibitoren

Die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP gehören zu den wichtigsten intrazellulären Botenstoffen. Sie beeinflussen eine Vielzahl zellulärer Funktionen in allen Geweben. Entsprechend ihrer Bedeutung bei der Signaltransduktion wird ihre intrazelluläre Konzentration durch ein komplexes System cAMP- und cGMP-metabolisierender Phosphodiesterasen kontrolliert. Heute werden 10 Isoformen unterschieden, diese können weiter in Subisoformen unterteilt werden. Die Einteilung erfolgt aufgrund ihrer Proteinstruktur, der Gewebsverteilung, der subzellularen Lokalisation und ihrer Sensitivität gegenüber selektiven Inhibitoren [Manganiello und Degermann 1999, Beavo 1995, Rascon et al. 1992]. Die beiden Klassifizierung der PDE-isoformen begründet sich in der Eigenschaft, cAMP,cGMP oder beide zu metabolisieren sowie ihrer Sensitivität gegenüber physiologischen Regulatoren wie Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die fünf wichtigsten PDE-Isoformen.

		T	
PDE-Isoform	Regulation	Substrat	Selektive Inhibitoren
1	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängig	cAMP > cGMP	Vincopoetine
2	cGMP-stimulierbar	cAMP > cGMP	EHNA
3	cGMP-inhibierbar	cAMP > cGMP	Trequinsin, Quazinone
4		cAMP- spezifisch	Rolipram, Ro 20-1724
5		cGMP- spezifisch	Sildenafil

Tabelle 1: PDE-Isoformen 1 - 5

Der Abbau von cAMP in SMC erfolgt vor allem durch die PDE-Isoformen 3 und 4 [Polson, Rascon]. Die PDE3 ist entsprechend ihrer Regulationsmöglichkeit definiert als cGMP-inhibierbar, die PDE4 gemäß ihrer katalytischen Selektivität als cAMP-spezifisch. Die PDE3 als zweites Zielenzym von cGMP neben der PKG stellt damit eine Verbindung zwischen dem cGMP- und cAMP-Signaltransduktionsweg dar (Abb. 4). Als weitere Besonderheit kann die PDE4 von der PKA als Zielenzym von cAMP phosphoryliert und damit aktiviert werden [Manganiello und Degermann 1999, Polson und Strada 1996]. Dieser Mechanismus ist einer von zahlreichen Rückkopplungsmechanismen im cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Interaktion mit den MAP-Kinasen. Wie

schon erwähnt, kann die p42/p44 MAP-Kinasenphosphorylierung durch cAMP/PKA gehemmt werden. Auf der anderen Seite kann auch die MAP-Kinase den cAMP/PKA-Weg beeinflussen: Die PDE4 als cAMP-metabolisierendes Enzym ist auch Substrat für die MAP-Kinasen, damit entsteht eine komplexe Wechselwirkung zwischen diesen beiden Signaltranduktionssystemen [Hoffmann et al. 1999]. Das Pendant zur PDE4 stellt die PDE5 beim cGMP-Abbau dar. Sie ist cGMP-spezifisch und neben der PDE1 das wichtigste Enzym für die cGMP-Metabolisierung in SMC. Die PDE-Isoformen 1 und 2 sind in SMC nur von untergeordneter Bedeutung [Polson und Strada 1996]. Um in-vitro cAMP- und cGMPabhängige Signalwege zu untersuchen, wurden bei dieser Arbeit selektive Inhibitoren der PDE-Isoformen 3, 4 und 5 benutzt. Dies waren als PDE3-Hemmer Trequinsin (HL 725) [Ruppert] und Quazinone (R-6-chloro-1,5-dihydro-3- methylimidazo -[2,1-b] quinazolin -2[ 3H]-on) sowie die PDE4-Hemmer Ro 20-1724 (4-[(3-butoxy-4-methoxy-phenyl)methyl]-2imidazolidinon, RS) [Leroux et al. 1989] und Rolipram (4-(3'-cyclo-pentyloxy-4'methoxyphenyl)2-pyrrolidinon, 4 RS) [Holck et al. 1994, Schneider et al. 1989]. Als selektiver Hemmstoff der PDE5 wurde Sildenafil (1-{[6,7-Dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl}-4-methylpiperazin) verwendet [Boolell et al. 1996]. Die PDE2 spielt in SMC praktisch keine Rolle [Polson und Strada 1996]. Zur unselektiven Hemmung der PDE's wurde IBMX (Isobutyl-methyl-xanthin) benutzt [Beavo und Reifsnyder 1990, Polson und Strada 1996, Sheppard et al. 1972].

Auch in der Therapie verschiedener Erkrankungen werden PDE-Hemmstoffe eingesetzt. Bekannte Beispiele sind der unselektive PDE-Hemmer Theophyllin bei Asthma und der PDE5-Hemmer Sildenafil bei erektiler Dysfunktion. In der Prophylaxe der Restenose nach PTCA erhofft man sich durch die Verwendung selektiver PDE3-Hemmer Erfolge. So hat sich in diesem Bereich Cilostazol in kleineren klinischen Studien als wirksam erwiesen [Sekiya et al. 1998, Tsuchikane et al. 1999]. Gerade für diese Anwendung werden antimitogene Effekte auf SMC als eine wichtige Wirkkomponente erachtet. Diese sind bei selektiven PDE3-Inhibitoren auch in-vitro mehrfach beobachtet worden [Chini et al. 1997, Polson und Strada 1996, Rascon et al. 1992]. Dagegen sind die Daten zur antimitogenen Wirkung von PDE4-Hemmern recht widersprüchlich. Von einigen Arbeitsgruppen wurde eine antiproliferative Wirkung gezeigt [Pan et al. 1994, Souness et al. 1992], von anderen das Fehlen einer solchen berichtet [Chini et al. 1997]. Daher sollte dieses Problem hier näher untersucht werden.

.

#### 1.8 Organische Nitrate

Endothelial aus L-Arginin gebildetes Stickstoffmonoxid (NO) führt zur Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (GC) in SMC. Als Folge der erhöhten cGMP-Konzentration kommt es zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Atherosklerotische Veränderungen gehen mit der Schädigung und Zerstörung des Endothels in der Gefäßwand einher. Dies führt unter anderem dazu, daß wichtige protektive Faktoren wie PGI<sub>2</sub> und endotheliales NO nicht mehr ausreichend gebildet werden. Unter den zahlreichen Wirkungen ist auch eine Proliferationshemmung von SMC durch NO beschrieben worden [Cornwell et al. 1994, Sciorati et al. 1997]. Allerdings zeigte sich klinisch keine Hemmung der SMC-Proliferation und der Restenose. Der Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse von in-vivo- und invitro-Untersuchungen ist bislang nicht bekannt.

Es gilt heute als sicher, daß NO auch der Wirkungsvermittler organischer Nitrate ist. Diese werden seit langer Zeit zur Therapie der koronaren Herzkrankheit eingesetzt. Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbid-2,5-dinitrat und Pentaerithritoltetranitrat (PETN) gehören heute zu den wichtigsten Arzneistoffen zur akuten und präventiven Behandlung der Myokardischämie. Chemisch handelt es sich bei den genannten Substanzen um Ester der Salpetersäure mit mehrwertigen Alkoholen. Weitere Nitrovasodilatatoren sind Amylnitrit als Ester der salpetrigen Säure und das anorganische Natrium-nitroprussid. Hinzu kommen die experimentell genutzten Nitrosothiole wie das S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP). Über die Aktivierung der löslichen GC kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration in SMC [Murad 93]. Diese Aktivierung durch die Nitrovasodilatatoren ist auch in-vitro möglich [Feelisch, Noack 87, Eur J Pharm, Weber]. Der genaue Mechanismus der NO-Bildung aus organischen Nitraten ist jedoch noch immer nicht geklärt. Die Unterschiede der Nitrovasodilatatoren beinhalten vor allem den Wirkungseintritt und in die Wirkungsdauer. So zählen ISMN und PETN zu den langwirksamen Nitraten mit späten Wirkungseintritt, während GTN nur kurz aber sehr schnell wirkt. Durch diese schlagartige Freisetzung von NO erhöht sich die Gefahr der Bildung von Peroxynitritanionen [Liu et al. 1994, Beckmann et al. 1995] und damit der Belastung der Zellen mit Sauerstoffradikalen. Bei den langsamer freisetzenden NO-Donatoren ist dieser Effekt geringer ausgeprägt.

Die Wirkung der Nitrovasodilatatoren wird zumeist über die cGMP-vermittelte Aktivierung der PKG erklärt. Denkbar ist aber auch die Hemmung der cGMP-inhibierbaren cAMP-Phosphodiesterase (PDE3) mit einem nachfolgenden Anstieg der cAMP-Spiegel und Stimulation der PKA in SMC. In Abb. 4 sind die Signaltransduktionswege der cGMP-

vermittelten antimitogenen Wirkung von NO schematisch dargestellt. Unabhängig von der Frage, ob PKA oder PKG die antimitogenen Wirkungen von NO vermitteln, ist cGMP der gemeinsame Vermittler in der antimitogenen Signaltransduktion. Der Abbau von cGMP in SMC wird vor allem durch die PDE5 katalysiert [Polson und Strada 1996]. Daher wurden in dieser Arbeit die möglichen antimitogenen Wirkungen von Sildenafil als selektiver Hemmstoff der PDE5 untersucht. Auch eine mögliche potenzierende Wirkung der antimitogenen Effekte der organischen Nitrate durch Sildenafil wurde in dieser Arbeit geprüft.

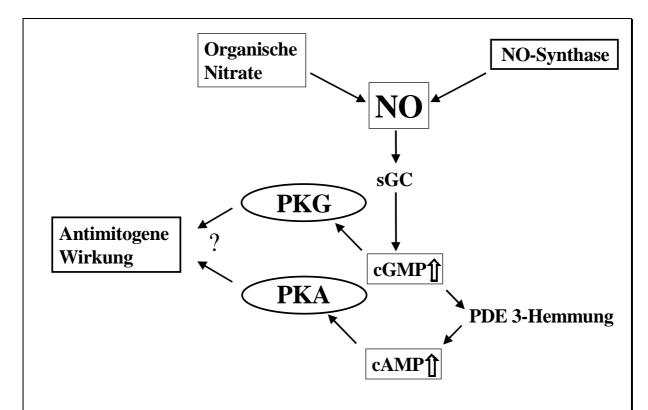


Abb. 4: Antimitogene Wirkungen durch cGMP: Möglliche Vermittlung über PKG (direkt) oder PKA (über Hemmung der PDE3). Steigerung des intrazellulären cGMP-Spiegels ist möglich durch Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) oder durch Hemmung cGMP-metabolisierende PDE5 (z. B. durch Sildenafil)

#### 1.9 Fragestellung

Wirken selektive Inhibitoren der Phosphodiesterasen antimitogen?

Es ist vielfach experimentell gezeigt worden, dass Substanzen, welche den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen und so die PKA aktivieren, antimitogen wirksam sind. Die Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration ist zum Beispiel durch Hemmung cAMP metabolisierende Enzyme (Phosphodiesterasen, PDEs) möglich. In SMC wird cAMP vorrangig durch die PDE-Isoformen 3 und 4 abgebaut. Inwieweit Isoform-selektive PDE-Inhibitoren die Proliferation von SMC hemmen können, ist umstritten. Dies gilt besonders für PDE4-selektive Hemmer. Weil auch die Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels mit antimitogener Aktivität in Verbindung gebracht wird, wurde auch die Auswirkung des selektiven PDE5-Hemmers Sildenafil untersucht. Die PDE5 metabolisiert ausschließlich cGMP, nicht aber cAMP. Daher war es auch ein Ziel der Arbeit, die Signaltransduktion eines möglichen antimitogenen Effektes von Sildenafil zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere geklärt werden, ob die antimitogene Wirkung PKG- oder PKA-vermittelt ist.

Sind organische Nitrate in glatten Gefäßmuskelzellen antimitogen wirksam?

Aus den Ergebnissen zur vorangegangenen Fragestellung zur antimitogenen Aktivität von Sildenafil ergab sich die Frage nach der Wirkung von organischen Nitraten auf die Mitogenese von SMC. Mit GTN, ISMN und PETN wurden drei Vertreter dieser Arzneistoffgruppe untersucht. Dabei wurde auch untersucht, ob Sildenafil als Inhibitor der PDE5 zusammen mit den organischen Nitraten eine synergistische Wirkung hat. Auch hier galt das besondere Interesse der zugrundeliegenden Signaltransduktion. Darüber hinaus wurde nach Hinweisen gesucht, warum organische Nitrate zur Prävention der Restenose klinisch nicht wirksam sind.

Welche Wirkungen haben Trapidil und seine Derivate auf die Mitogenese glatter Gefäßmuskelzellen?

Bönisch et al. [1998] konnten in Untersuchungen zum antimitogenen Wirkmechanismus zeigen, daß Trapidil die mitogene Signaltranduktion von PDGF und anderen Mitogenen über eine Aktivierung der PKA unterbricht. Versuche mit zellgängigen PKA-Inhibitoren wie H89, Rp-cAMPS und dem hochspezifischen, zellgängigen PKI<sub>myr</sub> sollten die PKA-Abhängigkeit der antimitogenen Wirkung weiter untermauern. Darüber hinaus wurde die antimitogene

Wirkung von Trapidilderivaten untersucht. Darunter befanden sich auch solche, deren PDEhemmende Wirkung bereits bekannt war sowie ein Metabolit des Trapidils.

Wie kommt es zur antimitogen wirksamen PKA-Aktivierung durch Trapidil und seine Derivate?

Nachdem eine Aktivierung der PKA durch Trapidil gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus. Neben der Hemmung von Phosphodiesterasen mit nachfolgender Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration ist dies auch durch eine direkte Aktivierung der PKA möglich. Diese Fragestellung wurde auch für die antimitogen wirksamen Trapidil-Derivate untersucht.

#### Welche PKA-Isoform wirkt antimitogen?

Es sind zwei Isoformen der PKA bekannt (siehe Einleitung, 2.2). Daher ergab sich die Frage, welche PKA-Isoform für die antimitogene Wirkung in glatten Gefäßmuskelzellen entscheidend ist. Damit sollten weitere Erkenntnisse über die Kompartimentierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges gewonnen werden.

#### **Material und Methoden**

#### 2.1 Zellkultur

Die verwendeten bovinen SMC entstammen dem Ramus interventricularis der Koronararterie zweijähriger Fersen. Die Präparation erfolgte mittels enzymatischer Disaggregation unter Entfernung der Adventitia und des Endothels. Die Auflösung des Zellverbandes erfolgte durch eine Enzymlösung mit 1 mg/ml Kollagenase, 1.5 mg/ml Elastase in Gegenwart von 1 mg/ml Trypsininhibitor. In dieser Lösung wurden die Gewebestücke zwei Stunden lang bei 37°C geschüttelt. Nach dem Auszählen der Zellen in einer Zählkammer nach Neubauer wurde die Zellsuspension zentrifugiert, die Enzymlösung abgesaugt und das Zellpellet in fetalen Kälberserum (FCS)-haltigem Kulturmeduim resuspendiert. Die Primärkultivierung erfolgte in Kulturflaschen mit einer Zelldichte von ungefähr 10,000 Zellen pro cm² unter Begasung mit Kohlendioxid (5 %) bei 37° C.

In Medium mit 15 % FCS bei 37°C und 5 % Kohlendioxid kultivierte SMC wurden nach Erreichen der Konfluenz mit PBS gewaschen und mit Trypsin (0,05 %) und EDTA (0,5 mM) vom Gefäßboden gelöst. Durch wiederholtes Aufsaugen mit einer Pipette wurde die Zellsuspension in Einzelzellen aufgelöst. Nach Überführen der Zellsuspension in ein 50 ml Falconröhrchen 7 Minuten lang bei 1000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Kulturmedium aufgenommen und auf 6-Loch- und 24-Loch-Platten verteilt oder zur Weiterkultivierung in 150 cm²–Kulturschalen gesplittet. Zweimal pro Woche wurde das Medium ausgetauscht. Drei Tage vor der Stimulation durch PDGF wurde das FCS-haltige Medium gegen serumfreies Medium gewechselt. Das Medium enthielt 80 % HAM's F12, 20 % DMEM, 100 U/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin, 1, 2.85 μg/ml Insulin, 0.2 mg/ml Glutamat, 5 μg/ml Transferrin, und 35.2 μg/ml Ascorbinsäure. Es wurden Zellen der Passagen 4-10 für die Experimente eingesetzt. Alle Arbeiten wurden steril und mit auf 37°C vortemperierten Lösungen durchgeführt.

Die bei den Ergebnissen angegebene n-Zahl für die Versuche entspricht der Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Versuche mit verschiedenen Zelllinien.

#### 2.2 DNA-Synthese-Messung

Gefäßmuskelzellen wurden wie beschrieben passagiert, in 24-Loch Platten ausgesät (5 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Loch) und bis zum Erreichen einer Konfluenz von ca. 50 % unter Standardbedingungen kultiviert. Für die folgenden 72 Stunden wurde das serumhaltige gegen serumfreies Medium ausgetauscht, um den Zellzyklus zu synchronisieren. Bei Verwendung von Proteinkinase-Inhibitoren wie H89, Rp-cAMPS, KT5823 oder PKI wurden diese 10 Minuten vor der Gabe der zu untersuchenden Substanzen (z. B. PDE-Hemmer, organische Nitrate oder Trapidil) zupipettiert. Nach weiteren 10 Minuten wurde dann mit PDGF (10 ng/ml, BB-Isoform) die DNA-Synthese stimuliert. Alle Versuche wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Das Inkubationsvolumen betrug jeweils 500 μl. Wenn die zupipettierten Substanzlösungen nicht-wäßriges Lösungsmittel enthielten, wurde eine entsprechende Lösungsmittelkontrolle durchgeführt um sicherzustellen, daß die verwendete Konzentration an Ethanol, DMSO oder Isopropanol keinen Einfluß auf das Versuchsergebnis hatte. Bei einigen Trapidilderivaten und auch bei Trequinsin wurde die Lösung vorher auf 37° C erwärmt um so die vollständige Lösung der Substanzen zu gewährleisten.

Nach 20 Stunden Inkubation wurde [³H]-markiertes Thymidin (1 µCi/ml) zugefügt. Nach weiteren 4 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurde Perchlorsäure (0.3 M) für einige Minuten auf die Zellen gegeben und erneut mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen mit 0.3 µl NaOH (0.1 M) pro Loch .bei 37° C für 30 Minuten inkubiert. Die [³H]Thymidin-Inkorporation wurde mittels Flüssigkeitsszintillations-Spektroskopie bestimmt. Jede Probe (0.3 µl Volumen) wurde mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und dann vermessen.

Eine Gesamtinkubationszeit von 24 Stunden wurde daher gewählt, weil in dieser Zeit die DNA-Synthese der SMC am höchsten war. Dies wurde durch Versuche ermittelt, in denen innerhalb von 14 bis 28 Stunden nach Stimulation mit PDGF (10 ng/ml) alle 2 Stunden die jeweilige [<sup>3</sup>H]Thymidin-Inkorporation in diesem Zeitraum bestimmt wurde.

#### 2.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach dem Bradford-Protokoll [Bradford 1976]. Dazu wurden 5 μl des Zelllysates in ein Volumen von 1 ml Farbstofflösung (BioRad Coomassie Brilliantblau Farbstoffkonzentrat 1:4 verdünnt) gegeben. Mit Rinderserumalbumin wurde jeweils eine Eichungsmessung durchgeführt. Nach 10 Minuten Inkubation wurde mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm die Absorption bestimmt. Mit der Eichkurve wurde dann die Proteinkonzentration berechnet. Gegen Ende dieser Arbeit erfolgte die Proteinbestimmung mit Hilfe eines ELISA-readers an Stelle des Photometers.

## 2.4 Cytotoxizitäts-Test

Die SMC wurden auf Glas-Objektträger bis zum Erreichen von ca. 50 % Konfluenz kultiviert. Die Behandlung mit den zu testenden Substanzen erfolgte über 24 Stunden. Es wurden alle untersuchten antimitogen wirksamen Substanzen in den bei der DNA-Synthese-Messung jeweils verwendeten Maximalkonzentrationen eingesetzt. Dann wurde nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen und die Farbstoffe entsprechend den Anweisungen des Herstellers auf die Zellen gegeben. Dies entsprach einer Konzentration von 2  $\mu$ M Calcein AM und 4  $\mu$ M EthD-1. Die SMC wurden lichtgeschützt abgedeckt und mit den Farbstoffen eine halbe Stunde inkubiert. Dann wurde die angefärbten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei wurde ein Fluorescein-Filter (485  $\pm$  10 nm) für Calcein und ein Rhodamin-Filter (520  $\pm$  12,5 nm) für EthD-1 verwendet. Das Prinzip der Messung beruht auf der Freisetzung des fluoreszierenden Calcein durch Zellen mit ausreichender Esteraseaktivität aus Calcein AM. EthD-1 steigert seine Fluoreszenz durch Bindung an die Nukleinsäuren im Zellkern. Es kann aber nur in den Kern der Zellen gelangen, wenn die Zellmembranen hinreichend zerstört worden sind.

#### 2.5 Western blot

#### Gewinnung des Zelllysates

Für die Untersuchungen mittels Western-blot wurden die Zellen aus 6-Loch Platten geerntet. Dabei wurde gekühlter (4° C) Laemmlie-Puffer (Siehe 4.12) verwendet. Mit einem Zell-Schaber wurden die Zellen von der Platte gelöst und kurz sonifiziert. Anschließend wurde bei 14,000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde (wenn nicht direkt verwendet) sofort eingefroren (-80 C) oder erst mit Laemmli-Puffer versetzt, erhitzt (siehe unten) und dann eingefroren bis zur Verwendung. Teilweise wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers des VASP-Antikörpers (Santa Cruz) auch direkt mit Laemmli-Puffer lysiert. Die Ergebnisse wurden durch diese Art der Probenaufbereitung nicht beeinflußt.

#### SDS-PAGE

Die Auftrennung und Analyse von Proteinen aus Zelllysaten erfolgte durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Es wurden diskontinuierliche Gele nach der Methode von Fling und Gregorson (1986) verwendet. Hierzu wurde ein Sammelgel (5 % Acrylamid) auf ein Trenngel (8 oder 10 % Acrylamid) gegossen. Für die Untersuchung der Proteine wurden 20 – 100 μg Protein in Probenpuffer (Laemmli UK, 1970) aufgenommen (Verdünnung 1 : 5), 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Dabei denaturieren die Proteine und reagieren mit dem SDS. Die Elektrophorese erfolgte bei 35 mA (konstant) und 150 V (variabel).

#### Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran

Zum Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper wurden diese nach ihrer Auftrennung mittels SDS-PAGE auf eine methanolbenetzte PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, ImmobilonP, Millipore-Sigma, Deisenhofen) übertragen. Der Transfer erfolgte entweder in einer "Semi-dry"-Blotting Apparatur (BioRad, München) bei 100 mA für 1 Stunde oder in einer "Trans-blot Cell" (BioRad, München) bei 400 mA für 3 Stunden. In beiden Fällen wurde der gleiche Transferpuffer (siehe Lösungen) verwendet.

#### Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Mit spezifischen Antikörpern (MAP Kinase, VASP) wurden die auf der PVDF-Membran immobilisierten Proteine detektiert. Der Erstantikörper wurde 1 : 1000, der Zweitantikörper 1:3000 verdünnt. Bei der Bestimmung der MAP Kinasen wurde ein Antikörper gegen die

phosphorylierte Form verwendet. Der VASP-Antikörper dagegen reagierte sowohl mit der unphosphorylierten als auch mit der phosphorylierten Form. Durch die Phosphorylierung kommt es zu einem Shift von 46 auf 50 kDa. Nach folgendem Schema wurde vorgegangen:

- 1. Inkubation der PVDF-Membran in TBS-TM für 1 Stunde. Damit wurden unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran reduziert ("Blocken").
- 2. Inkubation mit der Antikörperlösung (verdünnt in TBS-M, 1:3000) über Nacht im Kühlraum bei 4°C auf einer Laborwippe. Dazu wurde die Membran mit der Antikörperlösung in eine Folie unter Vermeidung von Lufteinschluß eingeschweißt. Die Antikörperlösung wurde mehrfach wiederverwendet.
- 3. Dreimaliges kurzes Abspülen der Membran mit TBS-T
- 4. Dreimaliges Inkubieren der Membran mit TBS-T für je 10 Minuten
- 5. Inkubation des polyklonalen Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers (1:1000 mit TBS-TM) gegen die jeweilige Spezies (Kaninchen oder Maus) des Erstantikörpers für 1 Stunde. Auch hier wurde die Membran mit der Antikörperlösung zusammen eingeschweißt.
- 6. Wiederholung der Schritte 3. und 4.
- 7. Zugabe von ECL-Lösung (enhanced chemoluminescence, Amersham, Buckinghamshire/Großbritannien). Durch die Oxidation von Luminol und der daraus resultierenden Lichtemission wurde die Stellen mit Peroxidaseaktivität auf der Membran nachgewiesen.
- 8. Auflegen eines Röntgenfilmes (Hyperfilm ECL, Amersham, Buckinghamshire/Großbritannien). Nach der Entwicklung werden die Stellen der Antikörperbindung als schwarze Banden sichtbar.

#### Prüfung auf gleichmäßige Proteinbeladung

Nach der Detektion wurde die PVDF-Membran nochmals mit Methanol benetzt und mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran einige Minuten mit einer Amidoschwarzlösung inkubiert. Nach Abwaschen des überschüssigen Farbstoffmenge wurde die Proteinbanden sichtbar und die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung auf der Membran konnte kontrolliert werden.

#### 2.6 Bestimmung der zyklischen Nukleotide

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurden SMC in 6-Loch Platten kultiviert. Zur Messung des cGMP-Spiegels wurde zum Teil mit d-100 Platten gearbeitet, weil SMC weniger cGMP als cAMP enthalten. Nach 120 Stunden Kultivierung unter Standardbedingungen wurde das serumhaltige gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Nach 24 h wurden dann die Zellen zweimal mit 2 ml BSS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden für 10 Minuten PDE-Hemmer (10 mM IBMX, selektive PDE-Hemmer oder organische Nitrate) zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37° C. Dann wurden Adenylatcyclaseaktivierende Substanzen wie Forskolin (100 nM) zugegeben. Nach Ende der weiteren Inkubationszeit von 10 Minuten wurde der Puffer entfernt und 0,5 ml (bei d-100 Platten 2 ml) eiskalter Ethanol 96 % zugegeben. Dieser wurde bei 60° C verdampft. Dann wurde 1 ml RIA-Puffer pro Loch (bzw. Platte bei d-100) zupipettiert. Die Platte wurden über Nacht bei -80° C eingefroren. Durch das Einfrieren und Wiederauftauen wurde die vollständige Lyse der Zellen gewährleistet. Nach dem Auftauen wurde die Flüssigkeit abgenommen und bei 14 000 g zentrifugiert. Der Gehalt an zyklischen Nukleotiden im Überstand wurde dann mittels Radioimmunoassay [Schröder et al. 1993] bestimmt. [<sup>3</sup>H]-markierte zyklische Nukleotide, deren Aktivität vorher szintillationsspektrometrisch gemessen wurde, wurden Standardisierung verwendet. Die Proteinkonzentration wurde mit dem kolorimetrischen Proteinassay nach Bradford bestimmt (siehe 4.3).

#### 2.7 Bestimmung der PDE-Inhibition durch HPLC

Die Eigenschaft von Trapidil, PDE's zu hemmen, wurde durch die HPLC-Methode nach den Angaben von Butt et al.. [Butt und Walter, 1996] untersucht. Dazu wurde cAMP, Trapidil und PDE's aus Rinderherz [Sigma, Deisenhofen] in einem Puffer 5 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde 10 Minuten auf 95°C erhitzt um die PDE's zu inaktivieren. 20 μl der Probelösung wurden dann durch HPLC getrennt. Dazu wurde eine Lichrosorb RP-18-Säule (5 μM, 250 x 4 mm, Merck, Darmstadt) verwendet. Die Säule wurde mit einem linearen Gradienten von 6.5 Acetonitril/10 mM TEAF auf 50 % Acetonitril/10 mM TEAF (innerhalb 15 Minuten) eluiert. Die Detektion der Nukleotide erfolgte über einen UV/Vis -Detektor bei λ = 254 nm. Als Positivkontrolle wurde der unselektive PDE-Inhibitor IBMX verwendet. Guanin (10 μM) diente als interner Standard. Durch die Hemmung der PDE's Metabolisierung von cAMP und cGMP verhindert, die zyklischen Nukleotide wurden dann als getrennte peaks nachgewiesen. Bei fehlender Hemmung der PDE's verschwanden diese Signale zu Gunsten von AMP und GMP. Nach jeder Messung wurde die RP-18- Säule 10 Minuten mit Acetonitril 50 % und anschließender Umkehrung des Gradientenprogramms gespült. Dabei wurden keine weiteren Signale detektiert.

#### 2.8 Bestimmung der PKA- und PKG-Aktivität

Wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, wurden alle PKA- und PKG-Bestimmungen mittels ELISA durchgeführt. Dazu wurde der ELISA-Kit von Calbiochem (Bad Soden) verwendet. Dabei wird ein immobilisiertes PKA-Pseudosubstrat durch eine aktivierte PKA-enthaltende Probe an Serin phosphoryliert. Ein biotinylierter Erstantikörper gegen das phosphorylierte Serin bindet anschließend. An diesem wiederum bindet ein Streptavidin-gekoppelter Antikörper. Durch die Streptavidin-vermittelte Reaktion wird dann aus o-Phenylendiamin ein detektierbarer Farbstoff gebildet. Es wurde mit einigen Modifikationen nach den Vorschriften des Herstellers vorgegangen: Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, statt 5 maliger Wiederholung aller Waschschritte wurden 3-fach-Waschschritte durchgeführt und bei der Bestimmung intrazellulärer PKA-Aktivität wurde mit RIPA-Puffer (an Stelle des angegebenen Puffers) bei 4° C lysiert. Dabei wurden d-100 Platten verwendet, in 500 μl Zellsuspension befanden sich 10<sup>7</sup>Zellen, dies entsprach etwa 500 mg Protein pro ml. Wenn isolierte PKA oder katalytische Untereinheit (C) verwendet wurde, enthielt jede Einzelprobe (130 μl) etwa 20 ng C (entspricht etwa 50 ng PKA). Die PKA-Konzentration wurde abhängig

von Aktivitätszustand des verwendeten Protein bei einigen Versuchen deutlich erhöht (bis zu 10-fach). Versuche, in denen die PKA auch ohne den Stimulus cAMP maximal aktiviert war, wurden nicht gewertet. PKG wurde in einer Konzentration von 0.3 ng/ ml eingesetzt. PKG-Aktivität konnte ebenfalls mit diesem Assay vermessen werden, weil das verwendete Pseudosubstrat mit der Sequenz RFARKGSLRQKNV auch durch PKG phosphorylierbar ist. Zum Teil wurden ergänzend auch zwei verschiedene radioaktive PKA-Assays angewendet, zum einem das Protokoll nach Roskoski [1983], zum anderem das Protokoll nach Wright [Wright et al. 1981]. Als PKA-Substrat wurde Kemptide in einer Konzentration von  $100~\mu M$  eingesetzt.

#### 2.9 Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)-Spektroskopie

Zur näheren Untersuchung der molekularen Wechselwirkung zwischen Trapidil und der PKA wurde die SPR-Spektroskopie angewendet. Durch diese Methode ist die Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen als auch von Nukleotid-Protein-Wechselwirkungen in Echtzeit möglich. Diese Methode nutzt das Prinzip der "Totalen Internen Reflexion" (TIR). Dabei wird polarisiertes Licht in einem genau definierten Winkel auf die Grenzfläche zwischen einem Prisma und einem Goldfilm (50 nm Dicke) eingestrahlt. Wenn das Licht auf die Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices fällt, wird ein Teil des Lichtes von der Seite des größeren refraktären Index zur anderen Seite gebrochen. Ein anderer Teil wird reflektiert. Ab einem bestimmten kritischen Einfallswinkel werden die Wellen nur noch reflektiert und es kommt zur "Totalen inneren Reflexion". In diesem Zustand setzt sich die elektromagnetische Feldkomponente des einstrahlenden Lichtes, die evaneszente Welle, in das optisch weniger dichte Medium fort. Wenn monochromatisches und p-polarisiertes Licht auf eine dünne Goldschicht fällt, absorbieren Elektronenwolken (Plasmonen) der Goldoberfläche durch Resonanzkopplung die Energie der evaneszenten Welle (SPR). Daraus resultiert eine Verminderung der Intensität des reflektierten Lichtes bei bestimmten Einfallswinkel. Das evaneszente Wellenprofil und somit der Ausfallswinkel des reflektierten Lichts, ist abhängig vom refraktären Index des Mediums, in welches es sich fortsetzt. Dieser Brechungsindex wird von Massenänderungen an der Oberfläche bestimmt, die in den Bereich der evaneszenten Welle hineinreichen. Verändert sich der refraktäre Index des Mediums, in das die evaneszente Welle reicht (Sensorseite des chips), verändert sich auch der Winkel des einstrahlenden Lichtes, an dem die totale innere Reflexion eintritt. Bei der SPR-Spektroskopie wird diese Änderung des Winkels durch einen "diode array" – Detektor räumlich zugeordnet. Das detektierte SPR-Signal wird in response units (RU) angegeben. Die evaneszente Welle nimmt exponentiell mit der Entfernung von der Grenzfläche ab und reicht nur etwa 300 nm weit. Wenn alle anderen Faktoren wie das einfallende Licht absolut konstant gehalten werden, ist der Resonanzwinkel ein Maß für Änderungen der optischen Dichte im Bereich unmittelbar auf der Prisma-abgewandten Seite des Goldfilmes als dem Ort der Molekülinteraktionen [Cullen et al. 1987, Liedberg et al. 1995].

Das Umsetzen der Massenänderung auf der Oberfläche des chips (z. B. durch Interaktion eins immobilisierten cAMP-Analogons mit PKA) durch Detektion des refraktären Indes in einem Sensorgramm ermöglicht die Untersuchungen von Kinetiken und Bindungsaffinitäten. Für die

Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde entweder ein cAMP-Analogon oder eine PKA-Untereinheit an die Dextranmatrix eines Sensor-Chips (CM-5 research grade sensor) gekoppelt und die jeweils korrespondierende PKA-Untereinheit über die mobile Phase (Fluß: 5 µl/min) an den Sensorchip gebracht. Auf dem Sensorchip waren vier Flußzellen angeordnet, welche parallel geschaltet worden sind.

#### 2.10 Statistik

Meßdaten als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der jeweiligen Anzahl (n) von Einzelexperimenten überprüft. Das Signifikanzniveau p für α wurde mit 0.05 bestimmt. Die Unterschiede wurden hinsichtlich ihrer Signifikanz mit dem ungepaarten t-Test geprüft. Die statistische Berechnung erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Prism, Version 2.01. Bei allen aufgeführten Einzelergebnissen wurden generell drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Soweit mehr als drei Versuche durchgeführt wurden, ist dies im Ergebnisteil bei den jeweiligen Abbildungen vermerkt. Bei Western blots wurde jeweils ein repräsentativer blot von drei seperaten Versuchen mit ähnlichem Ergebnis dargestellt.

#### **Material**

#### 2.11 Chemikalien

Becton & Dickinson

Heidelberg

Zellkulturmaterial

Biomol Trequinsin, Quazinone, Rolipram, Ro 20-1724,

Hamburg H89, PKI<sub>myr</sub>

Calbiochem PKA-Kit (non-radioactive)

Bad Soden

Dianova Kaninchen-AK (Peroxidase-gekoppelt)

Hamburg

Du Pont de Nemours-NEN

Dreieich

[<sup>3</sup>H]Thymidin

Fluka Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A, PMA

Buchs, Schweiz

Gibco Life Technologies

Eggenstein

Zellkulturmedien

Jacobs Kaffee, gemahlen

Bremen

Luitpold Pharma Indomethacin

Eschwege

Merck Elektrolyte, Glukose, HPLC-Säulen, HPLC-

Darmstadt Fließmittel

Nestle Glücksklee Magermilchpulver

Ludwigsburg

New England Biolabs MAP Kinase AK

Heidelberg

Pfizer Viagra® -Tabletten zur Sildenafil-Extraktion

Karlsruhe

Santa Cruz VASP-AK

Heidelberg

Schwarz Pharma PGE<sub>1</sub>, GTN, PETN, ISMN

Monheim

Sigma Forskolin, Nukleotide, DTT, PDGF-BB, PMSF,

Deisenhofen Maus-AK (Peroxidase-gekoppelt), Guanin

Signal Transduction Heidelberg

VASP-AK

UCB-Chemie Kerpen/Rodleben Trapidil, Trapidilderivate

### 2.12 Geräte

Fluoreszenzmikroskop (BX-50, Olympus, Hamburg)

Blotkammer (BioRad, Trans-Blot, München)

Elektophoresekammer (Hoefer SE 600, Freiburg)

ELISA-Reader (microplate reader 550, BioRad, München)

HPLC.Pumpe mit UV/Vis-Detektor (Merck, Darmstasdt)

Photometer (UV-160, Shimadzu, Tokio, Japan)

Zentrifuge (Biofuge, Heraeus-Sepatech, Christ, Osterode); (13,000 rpm entsprechen 14,000 g)

Semi-Dry-Transferkammer (Biorad, München)

Flüssigkeitsszintillilationszähler (LS 6000 IC, Beckmann, München)

SPR-Spektroskop (Biacore 2000, Biacore, Uppsala/Schweden)

### 2.13 Lösungen

Amidoschwarzlösung 0.1 % (w/v) Amidoschwarz, 25 % Isopropanol,

10 % Essigsäure

BSS-Puffer: 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM

MgCl, 5.5 mM Glucose, HEPES 20 mM, pH 7.3

PBS: 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.3 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

PDGF-Puffer: 4 mM HCl, 0.1 % BSA, steril filtriert

Laemmli-Puffer: 50 mM TRIS, pH 7.0. 50 mM DTT, 2 % SDS, 15 %

Glycerol, 0.03 % Bromphenolblau

Laufpuffer (Elektrophorese): 0.1 % SDS, 25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycin

RIA-Puffer: 50 mM TRIS, 4 mM EDTA

RIPA-Puffer: TRIS 150 mM, NaCl 150 mM, 0.5 % Na-

Desoxycholsäure, 1 % NP-40. 0.1 % SDS, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µM Pepstatin, 10 mM PMSF (unmittelbar

vor Verwendung zugesetzt),

Sammelgel 5 % (SDS-PAGE): 6.8 ml Wasser, 1.7 ml 30 % Acrylamid, 1 M Tris, pH

6.8, 100 µl 10 % SDS, 100 µl 10 % APS, 10 µl TEMED

TBE: 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 8,3 mM Borsäure, 1 mM

**EDTA** 

TBS: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, NaCl 500 mM

TBS-M: TBS mit 5 % Magermilchpulver

TBS-T: TBS mit 0.05 % Tween-20

TBS-TM: TBS-M mit 0.05 % Tween-20

Transferpuffer: 80 % Laufpuffer, 20 % Methanol

Trenngel 8 % (SDS-PAGE): 18,8 ml Wasser, 10.7 ml 30 % Acrylamid, 10 ml 1.5

M Tris, pH 8.8, 400 μL APS, 400 μl 10 % SDS, 20 μl

**TEMED** 

Trenngel 10 % (SDS-PAGE): 15,9 ml Wasser, 13,3 ml, 30 % Acrylamid, 10 ml 1.5 M

Tris, pH 8.8, 400  $\mu$ L 10 % APS, 400  $\mu$ l 10 % SDS, 20  $\mu$ l

**TEMED** 

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma, Fluka oder Boehringer Mannheim bezogen.

#### **Ergebnisse**

#### 3.1 Isoform-selektive cAMP-Phosphodiesterase-Hemmer

# 3.1.1 Antimitogene Wirkungen

Zunächst wurden bereits bekannte antimitogene Wirkungen nicht-selektiver PDE-Inhibitoren durch eigene Untersuchungen bestätigt. Als Modellsubstanz wurde IBMX verwendet. IBMX steigerte die intrazelluläre cAMP-Konzentration und hemmte so die PDGF-stimulierte Mitogenese von SMC. Anschließend wurde die Wirkung selektiver Inhibitoren der PDE3 (Trequinsin, Quazinone) und der PDE4 (Ro 20-1724, Rolipram) auf die Mitogenese glatter Gefäßmuskelzellen untersucht. Das Ergebnis der DNA-Synthesemessungen ist in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt.

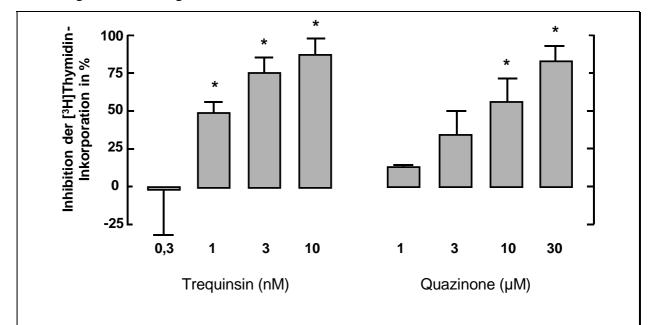


Abb. 5: Inhibition der PDGF-induzierten DNA-Synthese in SMC durch selektive PDE3-Inhibitoren

Sowohl Rolipram als auch Ro 20-1724 (jeweils bis zu 30 µM) führten zu keiner Hemmung der PDGF-induzierten DNA-Synthese. Im Gegensatz zu den selektiven PDE4-Inhibitoren hoben die PDE3-Inhibitoren Trequinsin (bis 30 nM) und Quazinone (bis 10 µM) die PDGF-induzierte DNA-Synthese praktisch vollständig auf. Die Wirkung der PDE-Hemmer auf nicht-stimulierte SMC war vom Kontrollwert nicht signifikant verschieden. Auch beim Einfluß auf die PDGF-induzierte Phosphorylierung der MAPK ergab sich ein ähnliches Ergebnis: Nur die PDE3-Hemmer hoben die PDGF-Wirkung auf die MAPK-

Phosphorylierung auf; Abbildung 9 zeigt die entsprechenden Western blots. Zytotoxische Wirkungen unter Verwendung der in den vorangegangenen Versuchen maximal eingesetzten Konzentrationen wurden nicht festgestellt.

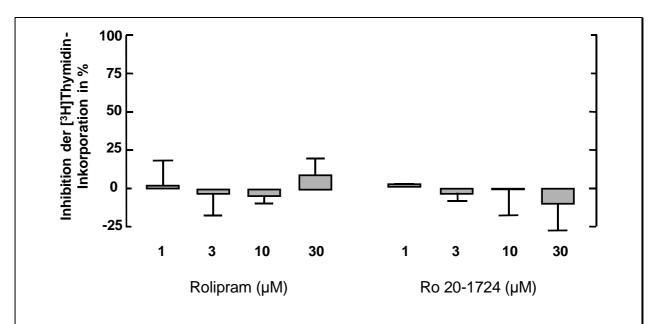


Abb. 6: Einfluß selektiver PDE4-Inhibitoren auf die PDGF-induzierte DNA-Synthese in SMC

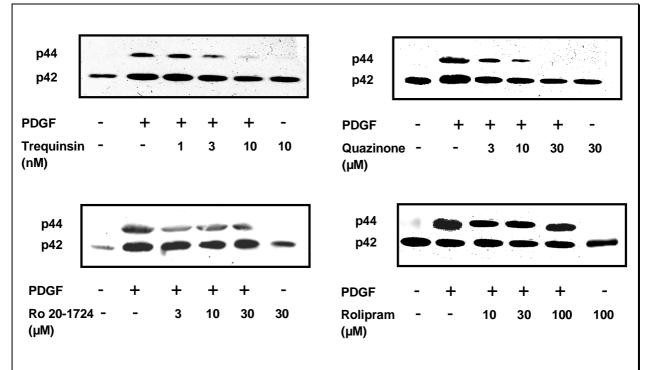


Abb. 7: Einfluß von PDE3- (oben) und PDE4- (unten) Hemmern auf die PDGF- induzierte MAPK-Phosphorylierung

#### 3.1.2 Signaltransduktion

Nachdem gezeigt worden war, daß nur die Hemmung der PDE3, nicht aber der PDE4 zu einer antimitogenen Wirkung in SMC führte, wurde der Einfluß der PDE-Inhibitoren auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration und die nachfolgende PKA-Aktivierung überprüft. Um die Wirkung der PDE-Hemmer auf die cAMP-Konzentration deutlicher werden zu lassen, wurden die Versuche in Gegenwart von 0.1 µM Forskolin durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 10 dargestellt. Beide PDE3-Hemmer erhöhen die intrazellulären cAMP-Spiegel nur geringfügig, während die PDE4-Hemmer Rolipram und Ro 20-1724 zu einer Steigerung um das 13- bzw. 17-fache der Kontrolle führten.

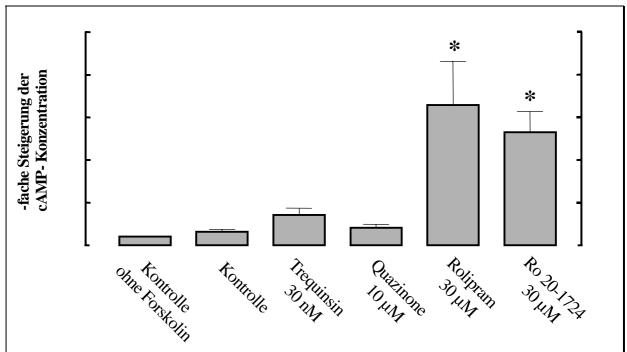
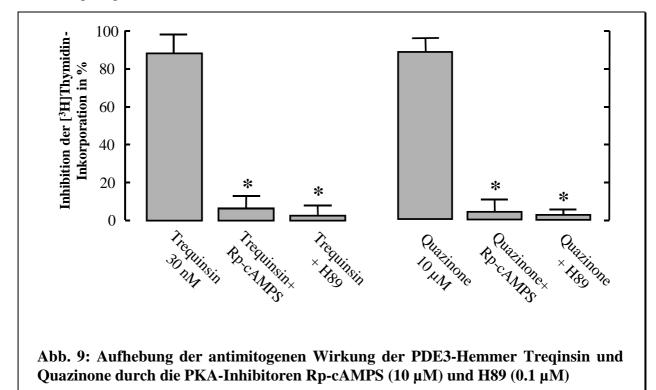


Abb. 8: Einfluß der selektiven PDE-Hemmer auf die Forskolin-induzierte Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (links) und zu Forskolin allein.

Auch ohne Zusatz von Forskolin kam es zu einer deutlichen Steigerung der cAMP-Spiegel durch PDE4-Hemmer in SMC während PDE3-Hemmer nur eine geringfügige, nicht signifikante Wirkung auf die [³H]Thymidin-Inkorporation hatten. Es stellte sich nun die Frage, ob der antimitogene Effekt der PDE3-Hemmer überhaupt über den cAMP/PKA-Weg vermittelt wird. Daher wurde versucht, die antimitogene Wirkung von Trequinsin und Quazinone auf die PDGF-induzierte DNA-Synthese mit Inhibitoren der PKA aufzuheben.

Dazu wurde Rp-cAMPS, (blockiert die cAMP-Bindungsstellen an R) und H89 (Inhibitor der C) verwendet. Durch beide PKA-Inhibitoren wurde die antimitogene Wirkung praktisch vollständig aufgehoben (Abb. 11).



Anschließend wurde bei allen vier PDE-Hemmern geprüft, ob diese in der Lage sind die PKA auch intrazellulär zu aktivieren. Dies sollte der Fall sein, weil Rolipram und Ro 20-1724 zu einer Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration führten und die antimitogene Wirkung von Trequinsin und Quazinone durch PKA-Inhibitoren aufzuheben war. Dazu wurde die PKA-abhängige Phosphorylierung von VASP durch Western blot mit einem spezifischen Antikörper bestimmt, der sowohl die phosphorylierte (p50) als auch die unphosphorylierte (p46) Form erfaßt. Erwartungsgemäß bewirkten alle PDE-Hemmer (Konzentrationen wie in den vorangegangenen Versuchen) diese Phosphorylierung (Abb. 12). Die Wirkung der PDE-Hemmer konnte durch den PKA-Inhibitor H89 aufgehoben werden.

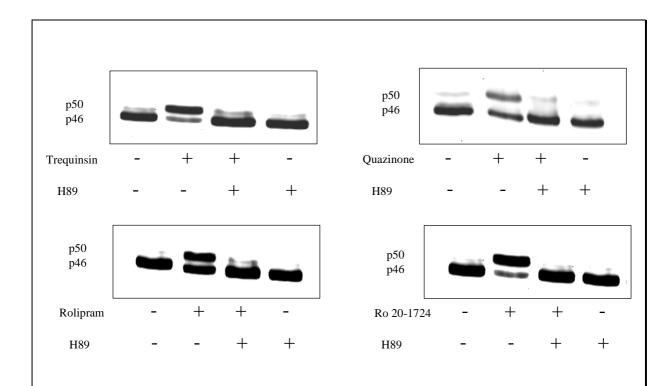


Abb. 10: VASP-Phosphorylierung durch selektive Inhibitoren der PDE3 (oben) und PDE4 (unten). Aufhebung der Wirkung durch den PKA-Inhibitor H89 (0.1  $\mu M$ ).

#### 3.2 Sildenafil und organische Nitrate

# 3.2.1 Antimitogene Wirkungen

Trequinsin und Quazinone als Isoform-selektive Hemmer der PDE3 haben in SMC eine antimitogene Wirkung. Weil die PDE3 als cGMP-inhibierbar definiert ist (Tabelle 1, S. 13, Abb. 4. S. 14), wurde versucht durch eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration die PDGF-induzierte Mitogenese zu hemmen. Die PDE5 katalysiert in SMC den Abbau von cGMP, während organische Nitrate wie GTN, ISMN und PETN über die Aktivierung der löslichen GC den cGMP-Gehalt steigern können. Als PDE5-Hemmer wurde Sildenafil eingesetzt. Abb. 13 zeigt die Wirkung von Sildenafil auf die PDGF-induzierte DNA-Synthese. Mit den langwirksamen organischen Nitraten wurde ein ausgeprägter antimitogener Effekt erzielt: Sowohl ISMN als auch PETN waren in Lage in Kombination mit 1 μM Sildenafil die Stimulation der DNA-Synthese durch PDGF fast vollständig zu hemmen (Abb. 14, 15). Auch ohne Zusatz des PDE5-Hemmers hemmte ISMN die [³H]Thymidin-Inkorporation um fast 50 %, PETN um etwa 30 %. Höhere Konzentrationen ließen sich leider nicht verwenden, da die Löslichkeit beider Nitrate in wäßriger Lösung sehr begrenzt war.

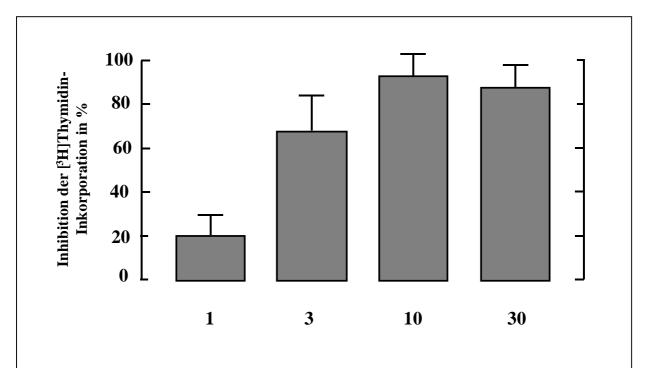


Abb. 11: Konzentrationsabhängige Hemmung der PDGF-induzierten DNA-Synthese durch Sildenafil (n = 6)

10 μM Sildenafil hemmten die PDGF-Wirkung auf die [³H]Thymidin-Inkorporation um etwa 40 %, 30 μM des PDE5-Hemmers hoben den mitogenen Effekt praktisch vollständig auf. Auch organische Nitrate waren antimitogen wirksam. Das kurzwirksame organische Nitrat GTN hatte nur einen sehr geringen, nicht signifikanten Effekt auf die PDGF-induzierte DNA-Synthese. Dieser ließ sich aber durch die Kombination mit 1 μM Sildenafil erheblich steigern (Abb. 14). Diese Konzentration des PDE5-Hemmers hatte in den vorangegangenen Versuchen mit bovinen SMC nur wenig Wirkung. (Abb. 13). In den folgenden Versuchen fiel der antimitogene Effekt von 1 μM Sildenafil auf die PDGF-induzierte DNA-Synthese noch etwas geringer aus (Abb. 14-16).

Zusätzlich zu den Versuchen zur Hemmung der PDGF-induzierten DNA-Synthese durch Sildenafil und den organischen Nitraten wurden Western blots durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Sildenafil, PETN und ISMN auch die PDGF-induzierte Phosphorylierung der MAPK aufheben konnten. Abb. 14 zeigt beispielhaft einen repräsentativen Western blot für Sildenafil.

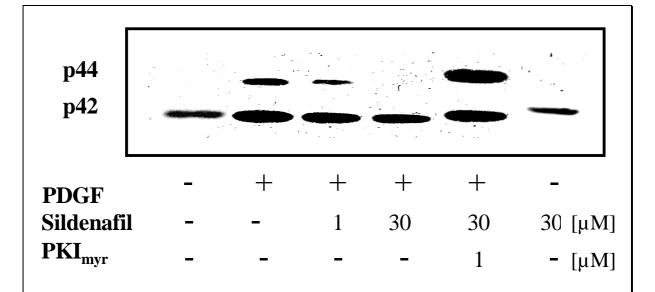


Abb. 12: Inhibition der PDGF-induzierten p42/p44 MAPK durch Sildenafil (30  $\mu$ M), Einfluß des PKA-Inhibitors PKI<sub>myr</sub> auf die Wirkung von Sildenafil

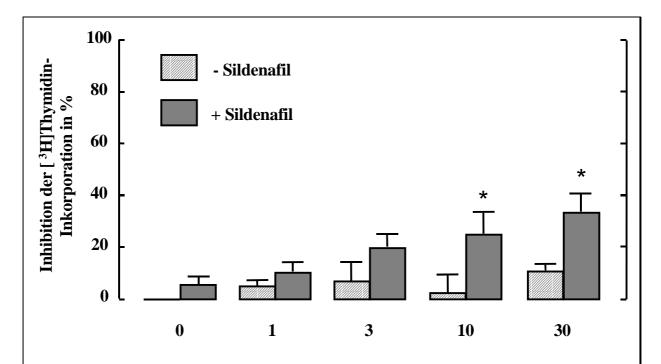


Abb.13: Konzentrationsabhängige Hemmung der PDGF-induzierten DNA-Synthese durch GTN (in  $\mu M$ ) alleine und in Gegenwart von 1  $\mu M$  Sildenafil

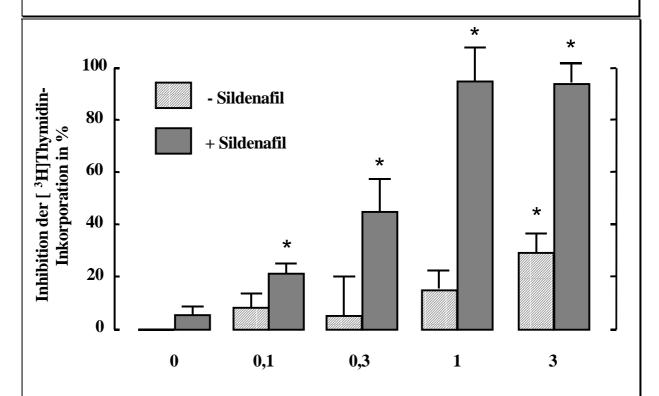


Abb. 14: Konzentrationsabhängige Hemmung der PDGF-induzierten DNA-Synthese durch PETN (in  $\mu M$ ) alleine und in Gegenwart von 1  $\mu M$  Sildenafil

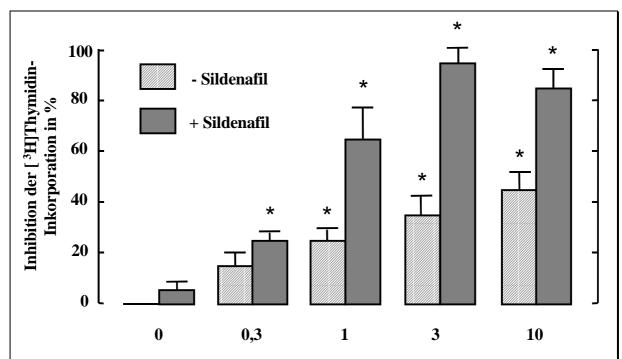


Abb. 15: Konzentrationsabhängige Hemmung der PDGF-induzierten DNA-Synthese durch ISMN (in  $\mu M$ ) alleine und in Gegenwart von 1  $\mu M$  Sildenafil

#### 3.2.2 Signaltransduktion

Um zu klären, ob die antimitogene Wirkung von Sildenafil auf die Aktivierung der PKG oder durch die Hemmung der PDE3 mit nachfolgender PKA-Aktivierung vermittelt wird (beides durch Steigerung der intrazellulären cGMP-Konzentration), wurden Versuche mit selektiven Inhibitoren beider Kinasen durchgeführt. Als PKG-Inhibitor diente KT5823 sowie das cGMP-Analogon Rp-8-pCPT-cGMPS, die PKA wurde hochselektiv mit dem Peptid PKI<sub>myr</sub>, welches durch N-Myristoylierung zellmembrangängig gemacht wurde, gehemmt. Dieses stand erst zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit zur Verfügung, daher wurden für die meisten anderen Versuche noch die PKA-Inhibitoren Rp-cAMPS und H89 verwendet.

Nur PKI $_{myr}$  (0.5  $\mu$ M) hob den antimitogenen Effekt von Sildenafil bei den Versuchen zur PDGF-induzierten DNA-Synthesehemmung auf, dagegen hatte KT5823 (1  $\mu$ M) mit ca. 10 % Inhibition der antimitogenen Sildenafil-Wirkung in denselben Versuchen nur eine geringe Wirkung (Abb. 17). Auch der PKG-Inhibitor Rp-8-pCPT-cGMPS beeinflußte die antimitogenen Effekte von Sildenafil nicht signifikant. Für die organischen Nitrate wurden ebenfalls die entsprechenden Versuche durchgeführt. Dabei wurde jeweils 1  $\mu$ M Sildenafil zugesetzt. Auch hier ergab sich dasselbe Ergebnis: Nur durch Hemmung der PKA mit PKI $_{myr}$  war der antimitogene Effekt aufzuheben. Auch hier blieb KT5823 weitgehend ohne Einfluß (ohne Abb.).

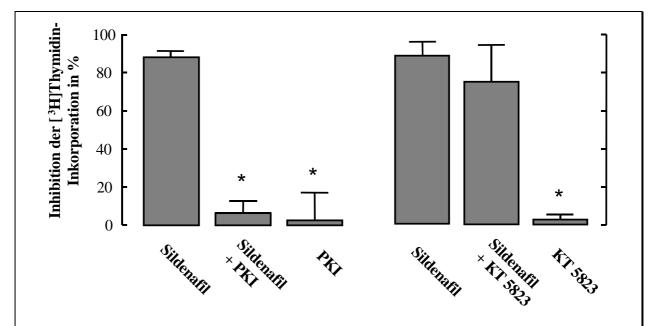


Abb.16: Aufhebung der PDGF-induzierten DNA-Synthese durch Sildenafil (10  $\mu$ M) und Einfluß von Inhibitoren der PKA (links) und PKG (rechts).

Alternativ wurde versucht, die PDGF-induzierte DNA-Synthese mit dem zellmembrangängigen cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP zu hemmen. Dabei handelt es sich um einen selektiven Agonisten der PKG welcher aber keine Wirkung auf die PDE3 hat. Das Ergebnis ist in Abb. 18 dargestellt. Obwohl ein Konzentrationsbereich weit über dem  $EC_{50}$ -Wert 0.5  $\mu$ M [Butt et al. 1992, Smolenski et al. 1998] gewählt wurde, zeigte sich kein antimitogener Effekt in SMC durch 8-pCPT-cGMP.

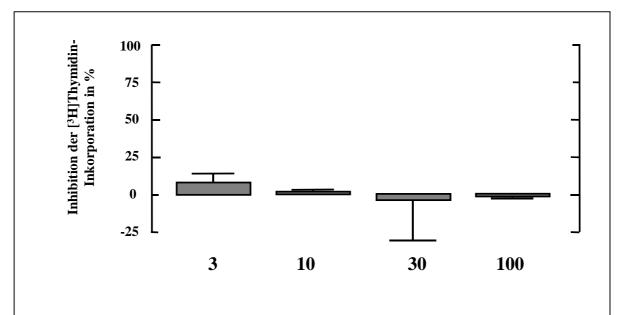


Abb. 17: Einfluß des selektiven PKG-Agonisten 8-pCPT-cGMP (in  $\mu M$ ) auf die PDGF-induzierte DNA-Synthese

Anschließend wurde die intrazelluläre Konzentration der zyklischen Nukleotide gemessen. In Abb. 19 ist der Verlauf der cGMP-Konzentration durch Sildenafil und ISMN dargestellt. Erwartungsgemäß zeigt sich hier ein leicht überadditiver Effekt in der Kombination beider Substanzen. Forskolinzusatz (0.1 µM) hatte hier praktisch keinen Einfluß auf die Wirkung von Sildenafil und ISMN. Beide erhöhten nicht nur den cGMP-Spiegel, sondern steigerten auch die intrazelluläre cAMP-Konzentration zusammen mit Forskolin (Abb. 20). Dies war nicht nur in der Kombination von Sildenafil und ISMN der Fall, sondern auch bei Gabe der Einzelsubstanzen.

Die Versuche mit GTN und PETN führten zu vergleichbaren Ergebnissen und sind hier nicht separat dargestellt.

Ergebnisse

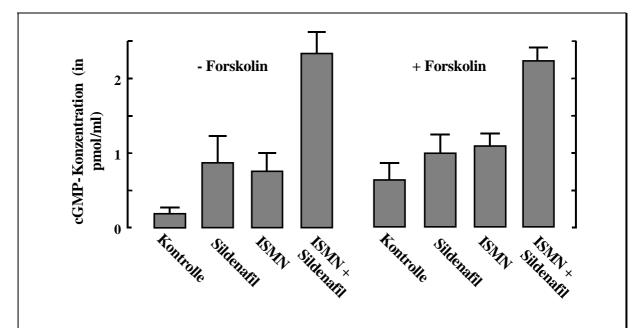


Abb. 18: Steigerung der intrazellulären cGMP-Konzentration in SMC durch Sildenafil (1  $\mu$ M) und ISMN (3  $\mu$ M), mit und ohne Forskolin (0,1  $\mu$ M)

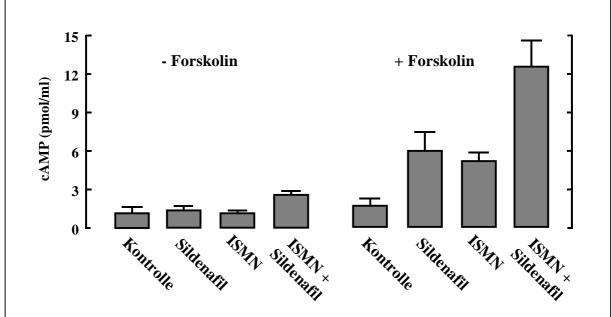


Abb. 19: Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration in SMC durch Sildenafil (1  $\mu$ M) und ISMN (3  $\mu$ M), mit und ohne Forskolin (0,1  $\mu$ M)

Als Kontrollversuche zur Wirksamkeit der verwendeten Agonisten und Antagonisten der PKA und PKG wurden jeweils Bestimmungen der VASP-Phosphorylierung mittels Western blot durchgeführt. Dabei erwiesen sich der PKG-Agonist 8-pCPT-cGMP wie auch der Antagonist Rp-8-pCPT-cGMPS (pCPT) als intrazellulär wirksam. Das Ergebnis für 8-pCPT-cGMP ist in Abb. 22 beispielhaft dargesellt. Während der Agonist 8-pCPT-cGMP eine konzentrationsabhängige Phosphorylierung von VASP bewirkte (ab 0.1 μM), konnte der Antagonist Rp-8-pCPT-cGMPS die Sildenafil-induzierte Phosphorylierung abschwächen. In einem ähnlichen Ausmaß reduzierte der PKA-Hemmer PKI<sub>myr</sub> die Sildenafil-stimulierte VASP-Phosphorylierung. Doch erst durch die Kombination von PKG- und PKA-Hemmer konnte die VASP-Phosphorylierung nahezu vollständig aufgehoben werden. Die Untersuchungen zur intrazellulären Wirksamkeit des PKG-Hemmers KT5823 zeigten ein abweichendes Ergebnis. KT5823 führte selber in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 10 μM zu einer VASP-Phosphorylierung. Daher erscheint die beschriebene Selektivität für die PKG [Wright et al. 1981] zweifelhaft.

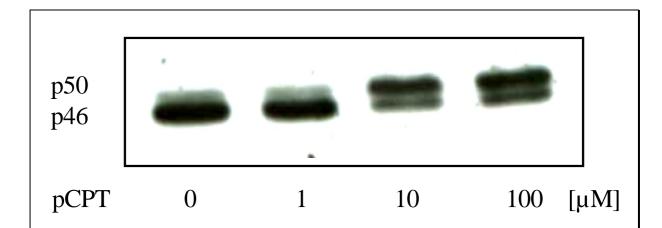


Abb. 20: Phosphorylierungsbedingter Supershift von 46 auf 50 kDa bei VASP durch den PKG-Aktivator 8-pCPT-cGMP (pCPT)

#### 3.3 Trapidil

#### 3.3.1 Antimitogene Wirkungen

Bönisch berichtete über antimitogene Wirkungen des Triazolopyrimidins Trapidil (Strukturformel siehe Seite 14) aufgrund einer PKA-vermittelten Hemmung des Raf-1/MAPK-Signaltranduktionsweges. Dies wurde zunächst durch eigene Untersuchungen bestätigt. Erwartungsgemäß hemmte Trapidil konzentrationsabhängig die PDGF-induzierte DNA-Synthese (Abb. 21).

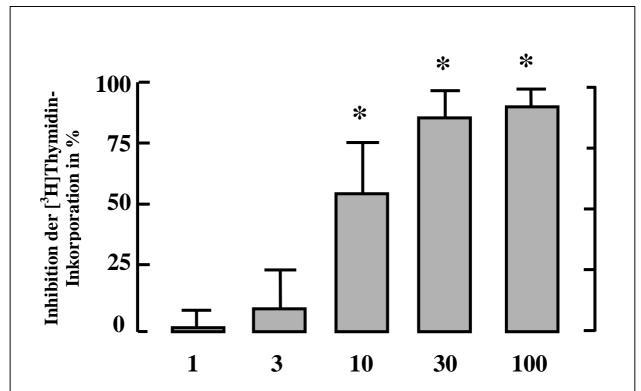


Abb. 21: Konzentrationsabhängige Inhibition der PDGF-induzierten DNA-Synthese durch Trapidil (in  $\mu$ M), n=12

Um zu überprüfen, ob die antimitogene Wirkung von Trapidil PKA-vermittelt ist, wurden PKA-Inhibitoren verwendet. Mit Rp-cAMPS, welches die cAMP-Bindungstellen der PKA blockiert und H89, welches die Kinasefunktion inhibiert, wurde versucht, den Trapidil-Effekt aufzuheben. Doch in Vorversuchen dazu zeigte sich, daß Rp-cAMPS die PDGF-induzierte DNA-Synthese steigerte und H89 die Phosphorylierung der MAPK hemmte. Die beiden PKA-Inhibitoren hatten also einen gegenteiligen Effekt auf die Mitogenese von SMC. H89 hemmte die PDGF-stimulierte MAPK-Phosphorylierung ab einer Konzentration von 0.3 µM. Dies wurde durch Western blot nachgewiesen. Daher wurde in Versuchen mit Trapidil eine Konzentration von 0.1 µM H89 gewählt. Rp-cAMPS wurde in einer Konzentration von 10

μM verwendet. Wie Abbildung 22 zeigt, konnte aber trotz der erwähnten Schwierigkeiten ein aussagekräftiges Ergebnis mit Rp-cAMPS und H89 erzielt werden:

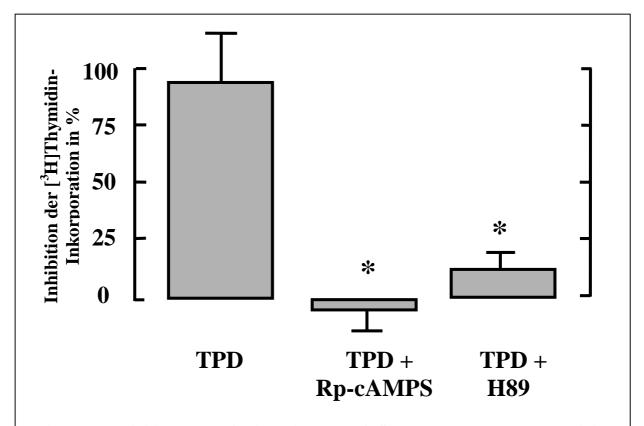
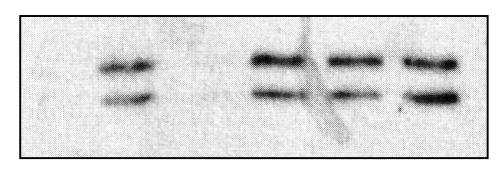


Abb. 22: Inhibition der PDGF-induzierten DNA-Synthese durch 100  $\mu M$  Trapidil (TPD) sowie die Aufhebung der Trapidilwirkung durch 10  $\mu M$  Rp-cAMPS und 0.1  $\mu M$  H89.

Beide PKA-Inhibitoren hoben die antimitogene Wirkung von Trapidil auf. Anschließend wurde die Wirkung auf die PDGF-abhängige Phosphorylierung der p42/p44 MAPK überprüft. Dafür wurden die SMC 10 Minuten mit PDGF (10 ng/ml) inkubiert. Diese Dauer wurde gewählt, weil Vorversuche ergaben, daß die MAPK 10 Minuten nach Stimulation maximal phosphoryliert ist. Bei Koinkubation mit Trapidil wurden SMC 10 Minuten vor PDGF-Zugabe mit Trapidil vorinkubiert. Auch hier hob Trapidil den mitogenen Effekt von PDGF auf (Abb. 23).

Ergebnisse



**PDGF** ++ + ++TPD [µM] 100 100 100 10 100 H89 + + +

Abbb. 23 Hemmung der PDGF-induzierten p24/p44 MAPK durch Trapidil (TPD), Aufhebung der Trapidil-Wirkung durch den PKA-Inhibitor H89 (0.1  $\mu M)$ 

#### 3.3.2 Signaltransduktion

Nachdem die antimitogene Wirkung von Trapidil durch selektive PKA-Inhibitoren aufgehoben werden konnte, sollte der Mechanismus der PKA-Aktivierung geklärt werden. Eine zu untersuchende Möglichkeit war die Hemmung von Phosphodiesterasen. Mit einer HPLC-Methode (modifiziert nach Butt und Walter 1996) wurde überprüft, ob Trapidil in Konzentrationen bis 100 µM die PDE hemmt. Doch weder der Abbau von cAMP noch von cGMP wurde gehemmt. Trapidil wurde dabei in einer Konzentration von 100 µM eingesetzt. Als PDE wurde ein Gemisch verschiedener Isoformen aus Rinderhirn verwendet (ohne Abb.). Auch eine direkte Aktivierung der PKA durch Trapidil wurde geprüft. Als Assay wurde ein ELISA-Verfahren angewendet. Dabei wurde ein immobilisiertes Peptid von der aktivierten PKA phosphoryliert. An diese Phosphorylierung wurde dann ein Antikörper gebunden. Anschließend wurde mit einem enzymgekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Nach dem Waschen wurde als Substrat ortho-Diphenylamin hinzugefügt, die dann stattfindende Reaktion führte zur Bildung des gelbgefärbten Oxidationsproduktes. Dieses wurde photometrisch mit einem ELISA-reader bei einer Wellenlänge von 495 nM ausgemessen. In den meisten Versuchen wurden cAMP und Trapidil in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Beide Substanzen bewirkten eine Aktivierung der PKA [Abb. 24]. Es wurde PKA aus verschiedenen Quellen verwendet, soweit nicht anders vermerkt handelt es sich um die PKA aus Rinderherz der Firma Sigma. Auch mit der freundlicherweise von Prof. Dr. U. Walter (Institut für Biochemie und Pathobiochemie, Maximilians-Universität Würzburg) zur Verfügung gestellte PKA ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Der wesentliche Unterschied lag in einem niedrigeren Ausgangswert bei der unbehandelten Kontrolle und dementsprechend einer noch größeren relativen Steigerung der Aktivität des Enzyms durch Trapidil oder cAMP. In beiden Fällen verlief die Stimulation der PKA konzentrationsabhängig. Wenn gleichzeitig die Konzentrationen sowohl an PKA als auch an cAMP bzw. Trapidil verringert wurden zeigten sich praktisch identische Ergebnisse. Allerdings ging dies mit höheren Standardabweichungen einher, so daß die ursprünglich verwendeten Konzentrationen wie oben angegeben beibehalten wurden. Es wurden 200 U/ml PKA eingesetzt. Diese direkte Aktivierung der PKA durch Trapidil wurde durch verschiedene Konzentrationen von cAMP (0.1- 10 μM) nicht überadditiv beeinflußt.

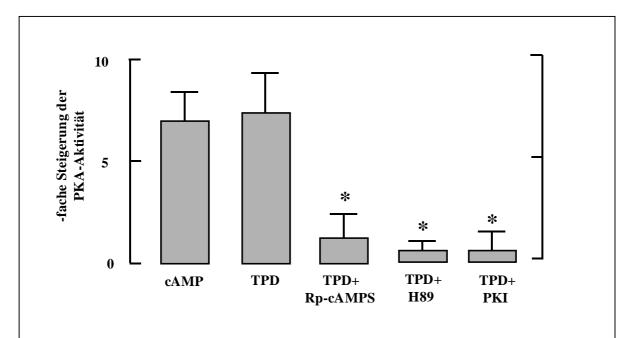


Abb. 24: Aktivierung der PKA durch Trapidil (10  $\mu$ M) und cAMP (10  $\mu$ M) und Inhibition der Trapidil-induzierten PKA-Stimulation durch Rp-cAMPS (10  $\mu$ M), H89 (3  $\mu$ M) und PKI (0.5  $\mu$ M)

Um die Bindungsstelle von Trapidil an der PKA zu bestimmen, wurden verschiedene cAMP-Analoga eingesetzt. Diese binden jeweils selektiv an einer Bindungsstelle (A oder B) einer PKA-Isoform (I oder II). Erst wenn beide Bindungsstellen besetzt sind, kommt es zu einer Aktivierung des Enzyms.

Demzufolge sollte ein synergistischer Effekt zu sehen sein, wenn Trapidil mit einem selektiven Agonisten für die jeweils andere Bindungsstelle kombiniert wird. Dies wäre aber nur dann der Fall wenn Trapidil tatsächlich an einer von beiden cAMP-Bindungsstellen bindet oder zumindest dort eine der jeweiligen Konformationsänderung entsprechenden Wirkung auslöst. Die Agonisten wurden auch untereinander kombiniert. Dies geschah zum einen, um die effektiven Konzentrationsbereiche zu erfassen, aber auch um durch selektive Aktivierung nur einer PKA-Isoform deren Wirkung auf die PDGF-induzierte DNA-Synthese zu bestimmen. Bezogen auf die Kombination mit Trapidil ist in Abbildung 25 zunächst die Wirkung auf die isolierte PKA dargestellt. Es kommt zu einem deutlichen überadditiven Effekt bei Trapidil zusammen mit dem PKAII, binding site A-selektiven Agonisten DCI. Dieser ist noch stärker ausgeprägt als die Positivkontrolle DCI zusammen mit MBC. Mit den PKAI-selektiven Agonisten ergab sich keine synergistische Wirkung in der Kombination mit Trapidil. Die Konzentrationen bei den PKAI-selektiven Agonisten sind geringer gewählt, weil

auch ihre Affinität zum jeweiligen Enzym höher ist, wie Vorversuche mit isolierter PKA im ELISA-Assay und die Bestimmung der VASP-Phosphorylierung durch Western-blot zeigten. Die Tabelle 1 vermittelt einen Überblick über die verwendeten PKA-Agonisten:

Tabelle 1: Übersicht PKA-Agonisten			
PKA-Agonisten	PKA-Isoform	Bindungsstelle	verwendete Konzentration in µM
ABA	I	В	0.1
MB	I	A	0.1
DCI	II	В	0.25
MBC	II	A	0.1

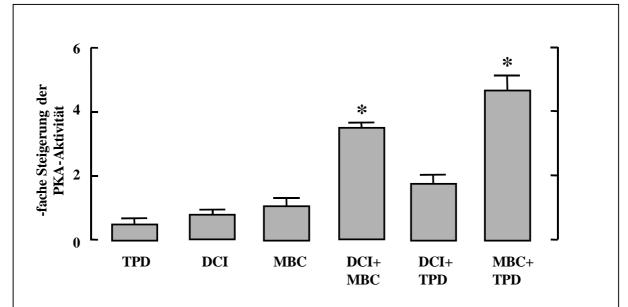


Abb. 25: Wirkung der selektiven PKA-Agonisten auf die Aktivität der isolierten PKA, alleine und in Kombination mit Trapidil  $(1 \mu M)$ 

Die Hemmbarkeit der Trapidil-induzierten PKA-Aktivierung durch verschiedene Inhibitoren der PKA wurde ebenfalls untersucht. Dabei wurden drei strukturell und funktionell unterschiedliche PKA-Inhibitoren verwendet. Alle drei (Rp-cAMPS, H89, PKI) hemmten die PKA-Aktivierung durch Trapidil. In allen Versuchen (n = 6 - 20) wurde die Aktivität der PKA auf das Niveau der Kontrolle oder darunter reduziert. Insbesondere H89 senkte die Enzymaktivität erheblich unter Kontrolle. In Ergänzung dazu wurde auch mit der

myristoylierten Form von PKI Versuche durchgeführt, das Ergebnis war mit dem der anderen Inhibitoren vergleichbar. Die Trapidil-induzierte PKA-Aktivierung ist also durch die genannten Inhibitoren vollständig aufhebbar. Kontrollversuche in denen statt Trapidil cAMP verwendet wurde, zeigten für cAMP als physiologischen Aktivator der PKA ein vergleichbares Ergebnis.

Anschließend wurden weitere Untersuchungen auf eine mögliche synergistische Wirkung von Trapidil mit cAMP durchgeführt. Dabei ergaben sich keine Hinweise auf eine überadditive Wirkung beider Substanzen. Die Versuche wurden mit Konzentrationen vom nanomolaren bis in den millimolaren Bereich durchgeführt. Dabei wurde das cAMP/Trapidil-Verhältnis schrittweise von 1:100 bis auf 100:1 verändert. Verschiedene Veränderungen in der Pufferzusammensetzung, insbesondere Erhöhungen und Erniedrigungen in der Mg²+Konzentration erbrachten im Vergleich zur cAMP-Wirkung keine signifikanten Veränderungen. Auch die im Assay vorgeschriebenen Zeitintervalle, insbesondere die Inkubationszeiten von Trapidil bzw. cAMP mit der PKA und dem Phosphorylierungssubstrat wurden mehrfach variiert, ohne dass im Vergleich zur cAMP-Kontrolle merkliche Veränderungen sichtbar wurden. Bei zu kurzer Inkubationszeit (unter 2 Minuten) ließ sich in beiden Fällen die PKA nicht zuverlässig aktivieren, bei erheblich gesteigerter Inkubationszeit (über 15 Minuten) kam es oft schon beim Kontrollwert zu einer vollen Phosphorylierung des Substrates.

Neben der Wirkung auf das Holoenzym wurde auch eine mögliche Beeinflussung der katalytischen Untereinheit (C) durch Trapidil untersucht. Die C wurden von Prof. Walter (Würzburg) und von PD. Dr. Herberg (Institut für Physiologische Chemie, Ruhr-Universtät Bochum) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Wirkung von Trapidil wurde mit beiden überprüft. In beiden Fällen ergab sich keine Beeinflussung der Enzymaktivität durch Trapidil.

Veränderungen der intrazellulären PKA-Aktivität durch Trapidil wurde ergänzend zu den Versuchen mit isolierter PKA untersucht. Dies ist relativ aufwendig, weil die Enzymaktivität stark von den Extraktionsbedingungen abhängig ist. Es war dabei von entscheidender Bedeutung die Extrakte aus Zellen sehr schnell und unter ständiger Temperaturkontrolle durchzuführen. Sämtliche Schritte wurden mit vorgekühlen (4° C) Materialien und Lösungen durchgeführt. In den intakten Zellen wurden Positivkontrollen mit cAMP oder Forskolin als Adenylatcyclaseaktivator sowie Negativkontrollen mit verschiedenen PKA-Inhibitoren gemacht. Darüber hinaus wurden einige Proben nach der Extraktion mit cAMP, Trapidil und PKA-Inhibitoren behandelt, um den Extraktionserfolg bewerten zu können. Auch diese

Versuche wurden mindestens als Dupletts pro Versuch durchgeführt. Dabei zeigte sich das Trapidil wie auch Forskolin hier eine Steigerung der zellulären PKA-Aktivität um das 2,5-fache bewirkte (ohne Abb.).

Auch die bereits von Bönisch gefundene VASP-Phosphorylierung als Marker für die intrazelluläre PKA-Aktivität durch Trapidil (ab 3 μM) konnte bestätigt werden. Die PKA-Inhibitoren Rp-cAMPS und H89 hoben diesen Effekt auf. Weil die VASP-Phosphorylierung auch durch PKG möglich ist, wurde die Wirkung von Trapidil auf die Aktivität isolierter PKG überprüft. Dabei wurde mit dem selben Assay-Kit gearbeitet, der auch bei der PKA-Bestimmung verwendet wurde. Dies war möglich, weil das dort verwendete immobilisierte Pseudosubstrat auch durch PKG phosphoryliert werden kann und so eine Bestimmung der PKG-Aktivität möglich ist. Während cGMP und das cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP erwartungsgemäß die Enzymaktivität konzentrationsabhängig steigerten, blieb Trapidil (100 μM) ohne Wirkung auf die PKG-Aktivität (ohne Abb.).

#### 3.3.3 Molekularen Mechanismus der PKA-Aktivierung

Wie in Abschnitt 3.3.2 geschildert, gibt es eine synergistische Wirkung von Trapidil mit dem PKAII, cAMP-Bindungsstelle A-selektiven cAMP-Analogon MBC hinsichtlich der PKA-Aktivierung. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Bindung von Trapidil an die cAMP-Bindungsstelle B der PKAII. Um den genauen Mechanismus und vor allem den Ort der Bindung von Trapidil an die PKA zu bestimmen, wurden SPR-spektroskopische Messungen mit rekombinanter, PKA bzw. deren Untereinheiten durchgeführt (freundlicherweise von PD Dr. Herberg zur Verfügung gestellt). Unterschiede zu der PKA der Firma Sigma liegen in der hohen Reinheit und in der fehlenden N-Myristoylgruppe an der C. Es wurden zwei verschiedene chips mit unterschiedlichen immobilisierten cAMP-Analoga (8-AHA-cAMP und 6-AH-cAMP) bei den Untersuchungen verwendet. An diese bindet das Holoenzym oder die R aus der mobilen Phase. In der Folge kommt es zu einem Anstieg der response units (RU). Ohne eine Bindung liegt der RU-Wert praktisch bei Null. Beim Kompetitionsverfahren wurde Trapidil in die mobile Phase gegeben. Zusätzlich wurde cAMP als Positivkontrolle vermessen. Es kommt zu einer Kompetetion zwischen dem immobilisierten cAMP-Analogon mit dem cAMP in der mobilen Phase um die Bindungsstellen der R. In der Folge nimmt die Bindung von R an den chip ab und der RU-Wert sinkt. Wenn Trapidil einen ähnlichen Mechanismus bei der PKA-Aktivierung wie der physiologische Aktivator cAMP aufweist, sollte es auch hier zu einer Abnahme der Bindung an den chip kommen.

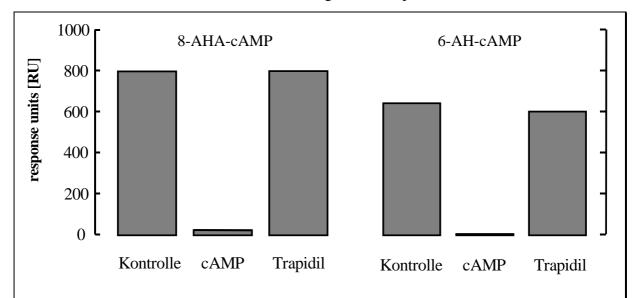


Abb. 26: Wirkung von Trapidil (10  $\mu M)$  im Vergleich zu cAMP (1  $\mu M)$  auf die Bindung von RI  $\alpha$  an die immobilisierten cAMP-Analoga 8-AHA-cAMP und 6-AH-cAMP

Auf die Bindung von RI $\alpha$  an die immobilisierten cAMP-Analoga hatte Trapidil praktisch keinen Einfluß (Abb. 26). Bei der RI $\beta$ -Untereinheit zeigte Trapidil (10  $\mu$ M) einen Effekt qualitativ ähnlich wie cAMP (1  $\mu$ M), es kam zu einer Verminderung der Bindung an den chip. Diese Wirkung war jedoch mit einer Verminderung der RU-Werte um etwa 25 % nicht annähernd so ausgeprägt wie bei cAMP (Abb. 27 ).

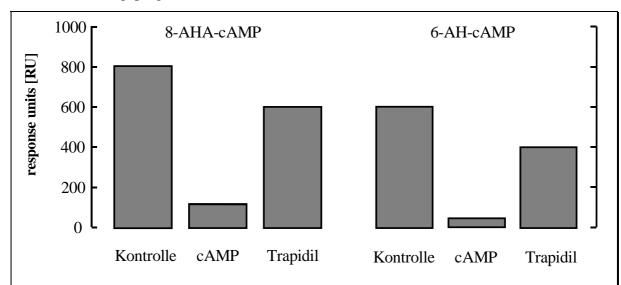


Abb. 27: Wirkung von Trapidil (10  $\mu M)$  im Vergleich zu cAMP (1  $\mu M)$  auf die Bindung von RIß an die immobilisierten cAMP-Analoga 8-AHA-cAMP und 6-AH-cAMP

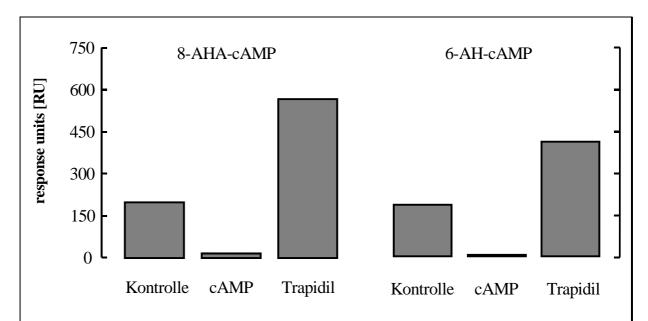


Abb. 28: Wirkung von Trapidil (10  $\mu M)$  im Vergleich zu cAMP (1  $\mu M)$  auf die Bindung von RII $\alpha$  an die immobilisierten cAMP-Analoga 8-AHA-cAMP und 6-AH-cAMP

Bei den beiden RII (α und β) kam es zu einem anderen Effekt unter Trapidil: Hier wurde die Bindung an die immobilisierten cAMP-Analoga verstärkt. Es kam offenbar nicht zu einer Kompetition um die cAMP-Bindungsstellen. Abb. 28 zeigt diese Wirkung bei RIIα. Die Wirkung auf RIIβ war praktisch identisch und ist daher hier nicht abgebildet. Die Frage, ob die Aktivierung der PKA durch Trapidil nur bei Anwesenheit von cAMP möglich ist, konnte nicht sicher geklärt werden. Es gab keine überadditiven Wirkungen von Trapidil zusammen mit cAMP-Konzentrationen von jeweils 30 nM bis 10 μM im ELISA-Assay. Auch einzelne Versuche mit dem SPR-Spektroskop ergaben keinen Hinweis auf einen möglichen synergistischen Effekt. Auf der anderen Seite waren sämtliche verwendeten PKA-Typen nicht völlig frei von cAMP. Zwar konnten diverse Reinigungsverfahren den cAMP-Gehalt von etwa 2 cAMP-Molekülen pro Holoenzym erheblich reduzieren, doch etwa 10 % (M/M) blieben mindestens zurück (ohne Abb.).

#### 3.4 Trapidil-Derivate

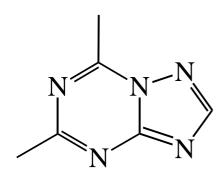
Verschiedene Trapidilderivate wurden freundlicherweise durch den Hersteller UCB (Rodleben/Kerpen) zur Verfügung gestellt. Diese wurden auf antimitogene Wirkung hin überprüft. Auch die Vermittlung der möglichen antimitogenen Wirkung wurde untersucht. Das war zum Beispiel bei AR 12-563 und AR 12-561 der Fall. Die Derivate wurden ausgewählt zunächst aufgrund ihrer bereits bekannte Eigenschaft der Inhibition von Phosphodiesterasen. Bei keinem der Derivate war eine stark ausgeprägte Selektivität für bestimmte PDE-Isoformen bekannt. Das Derivat AR 12020 wurde ausgewählt, weil es sich um einen Metabolit von Trapidil handelt. Ein besonderes Problem bei den meisten Derivaten, insbesondere bei AR 12-566 lag in der geringen Löslichkeit in wäßrigen Medien. Daher wurde zumeist mit auf 37°C vorgewärmten Lösungen gearbeitet. Bei einigen Derivaten wurde DMSO (bis maximal 0.5 %) und Ethanol (bis 2 %) zugesetzt, um die Löslichkeit zu verbessern. Entsprechende Kontrollversuche ergaben, daß diese Zusätze ohne merklichen Einfluß auf die PKA-Aktivität und DNA-Synthese blieb. Auffällig war der Kontrast zwischen der sehr guten Löslichkeit von Trapidil in Wasser und im Kontrast dazu die zumeist sehr schlechte bei den Derivaten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu den einzelnen Derivaten sind auf den folgenden Seiten dargestellt. Dabei zeigte sich, daß neben Trapidil selber auch einige Derivate die PDGF-induzierte DNA-Synthese hemmen. Allerdings waren auch einige Derivate zytotoxisch, so daß diese nicht zwangsläufig als antimitogen wirksam angesehen werden können. Die Zytoxizität wurde mittels Fluoreszenzfarbstoffen untersucht. Dabei wurde die zu prüfende Substanz für jeweils 24 Stunden auf die SMC gegeben.

Nur bei zwei Derivaten war eine direkte PKA-Aktivierung nachweisbar: bei AR 12019 und AR 12563. Bei einigen der Derivate, die im ELISA-Assay keine direkte PKA-Aktivierung bewirkten, kann ein derartiger Effekt trotzdem vorhanden und nur durch die gleichzeitige Inhibition der C verdeckt sein. Kein nicht-zytotoxisches Derivat war stärker antimitogen wirksam als Trapidil. Nur AR 12561 kann möglicherweise als Ausnahme betrachtet werden, weil dort nur eine schwache Zytoxizität gefunden wurde. Bei den dem Trapidil sehr ähnlichen Derivaten fiel auf, daß bereits geringe Strukturunterschiede zum Verlust der Wirkung (AR 12020) oder zum Zelltod (ucb 30195) führten.

## Derivat AR 12020

- Metabolit von Trapidil
- Sehr geringe, nicht signifikante Inhibition der PDGF-induzierten DNA-Synthese in SMC in Konzentrationen bis  $100 \, \mu M$
- Keine direkte PKA-Aktivierung in Konzentrationen bis 100 μM
- Nur sehr geringe Inhibition der C in Konzentrationen bis 100 μM



- Sehr geringe, nicht signifikante Inhibition der PDGF-induzierten DNA-Synthese in SMC in Konzentrationen bis 100 μM
- Keine direkte PKA-Aktivierung in Konzentrationen bis 100 μM
- Geringfügige Inhibition der C bei 100 μM
- Keine zytotoxische Wirkung bis 100 μM

## Derivat AR 12019

- Geringere Inhibition der PDGF-induzierten DNA-Synthese als bei Trapidil (bis 100 μM)
- Direkte PKA-Aktivierung ähnlich wie Trapidil 100 μM, aufhebbar durch die PKA-Inhibitoren H89 (3 μM) und Rp-cAMPS (10 μM)
- Geringe Hemmung der C bei 100 μM
- Keine zytoxische Wirkung bei 100 μM

- Keine Inhibition der PDGF-induzierten DNA-Synthese bis 100 μM
- Keine direkte PKA-Aktivierung bis 100 μM
- Hemmung der C etwa 50 % schwächer als bei H89
- Keine zytotoxische Wirkung bei 100 μM

## Derivat Ar 12163

- Schwache Inhibition der PDGF-induzierten DNA-Synthese bei 100 μM (-45%)
- Keine direkte PKA-Aktivierung bis 100 μM
- Geringe Hemmung der C bei 100 μM
- Keine zytoxische Wirkung bei 100 μM

## Derivat ucb 30195

- Inhibition der PDGF-induzierten DNA-Synthese in einem mit Trapidil vergleichbarem Ausmaß
- Keine direkte PKA-Aktivierung bei 10 und 100 μM
- Hemmung der C (100  $\mu$ M entsprechen der H89-Wirkung, also fast vollständige Hemmung der C-Aktivität) bei 100  $\mu$ M
- Ausgeprägte zytotoxische Wirkung bei 10 μM

## Derivat ucb 30192

- Inhibition der DNA-Synthese stärker als bei Trapidil (3 μM bewirken vollständige Hemmung der PDGF-Wirkung)
- Keine direkte PKA-Aktivierung bei 100 μM
- Hemmung der C (100 μM entspricht der H89-Wirkung, also fast vollständige Hemmung der C-Aktivität)
- Ausgeprägte zytotoxische Wirkung bei 10 μM

### Derivat ucb 30478

- Keine Inhibition der PDGF-induzierten DNA-Synthese bei 100 μM
- Keine direkte PKA-Aktivierung bei 100 μM
- Sehr schwache, nicht signifikante Inhibition der C bei 100 μM
- Zytotoxisch bei 100 μM

# Derivat ucb 30494

- $\bullet\,$  Sehr schwache, nicht signifikante Hemmung der PDGF-induzierten DNA-Synthese bei  $100\,\mu\text{M}\,$
- Keine Wirkung auf PKA oder C bei 100 μM
- Keine zytotoxischen Wirkung im ausreichend abgepufferten Medium bei 100 μM

- Inhibition der PDGF-induzierten DNA-Synthese in einem mit Trapidil vergleichbaren Ausmaß
- Keine direkte PKA-Aktivierung bis 100 μM
- Hemmung der C, etwa 10x schwächer als H89, beginnend bei 0.1 μM
- Zytotoxisch bei 30 μM

### **Derivat AR 12561**

- $\bullet$  Inhibition der PDGF-induzierten DNA-Synthese in einem mit Trapidil vergleichbaren Ausmaß (bis 100  $\mu M)$
- Keine direkte Aktivierung der PKA bei 100 μM
- Inhibition der C bei 100 μM
- Schwach zytotoxisch bei einer Konzentration von 100 μM

- Geringe Inhibition der PDGF-induzierten DNA-Synthese bei 100 μM (-30 %)
- Geringe Aktivierung der PKA (50% Trapidil-Wirkung), Hemmung durch PKA-Inhibitoren Rp-cAMPS (10 μM) und H89 (3 μM)
- Keine Inhibition der C-Aktivität bei 100 μM
- Keine zytotoxische Wirkung bei 100 μM

## Derivat AR 12565

- Antimitogene Wirkung geringfügig stärker als bei Trapidil
- Keine direkte PKA-Aktivierung bei 30 μM
- Geringe Hemmung der C-Aktivität bei  $30 \,\mu M$
- Zytotoxisch bei 30 μM

- Hemmung der PDGF-induzierten DNA-Synthese vergleichbar mit Trapidil
- Keine Wirkung auf PKA oder C (bis 30 μM)
- Zytotoxisch bei 30 μM
- Sehr schlechte Löslichkeit in wäßrige Medien, ausgeprägte Neigung zur Bildung übersättigter Lösungen

#### 3.5 Isoform-selektive cAMP-Analoga

Um zu klären, ob die PKA-vermittelte antimitogene Wirkung von einer bestimmten PKA-Isoform abhängig ist, wurden Untersuchungen mit cAMP-Analoga durchgeführt. Diese binden jeweils selektiv an einer Bindungsstelle (A oder B) einer PKA-Isoform (I oder II). Erst wenn beide Bindungsstellen besetzt sind, kommt es zu einer Aktivierung des Enzyms. Daher wurden jeweils eine PKAI-selektive und eine PKAII-selektive Kombination eingesetzt. Damit wurde versucht, analog zu den vorangegangenen Versuchen die PDGF-induzierte DNA-Synthese zu hemmen. Die verwendeten Konzentrationen sind höher als die im ELISA-Assay verwendeten (siehe 3.3). Die PKAI-selektiven Agonisten wurden verglichen mit ihren IC<sub>50</sub>-Werten (Daten aus Vorversuchen mit isolierter PKA und Bestimmung der VASP-Phosphorylierung, ohne Abb.) in relativ hoher Konzentration (0.5 µM), die PKAII-selektiven Agonisten dagegen in relativ niedriger Konzentration (5 µM) eingesetzt. Damit bei beiden Agonistenkombinationen sichergestellt ist, dass tatsächlich PKA aktiviert wird, wurde mittels Western blot die VASP-Phosphorylierung bestimmt. Dabei wurden die selben Konzentrationen wie bei den Versuchen zur Hemmung der DNA-Synthese verwendet. Die Abbildungen 40 und 41 zeigen jeweils einen repräsentativen Western blot. Es kam in beiden Fällen zur VASP-Phosphorylierung, dabei zeigte sich die Tendenz, daß die PKAI-selektive cAMP-Analoga (bezogen auf ihre Fähigkeit VASP zu phosphorylieren) etwas stärker wirksam waren.

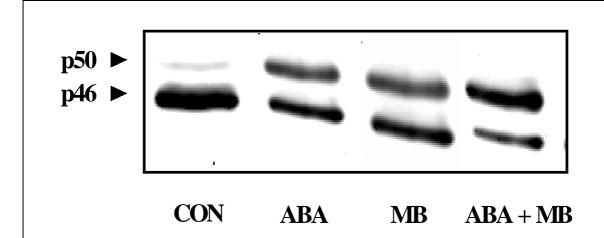
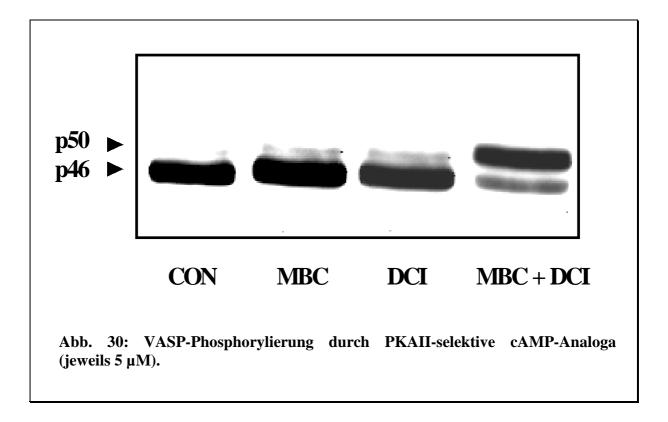


Abb. 29: VASP-Phosphorylierung durch PKAI-selektive cAMP-Analoga (jeweils 0.5  $\mu$ M).

Ergebnisse



Trotz ihrer relativ hohen Konzentration erwiesen sich die PKAI-selektiven Agonisten als unwirksam bei der Hemmung der PDGF-induzierten DNA-Synthese. Anders dagegen die PKAII-selektive Kombination: MBC und DCI hemmten den PDGF-stimulierten [<sup>3</sup>H]Thymidin-Einbau in SMC fast vollständig (Abb. 42).

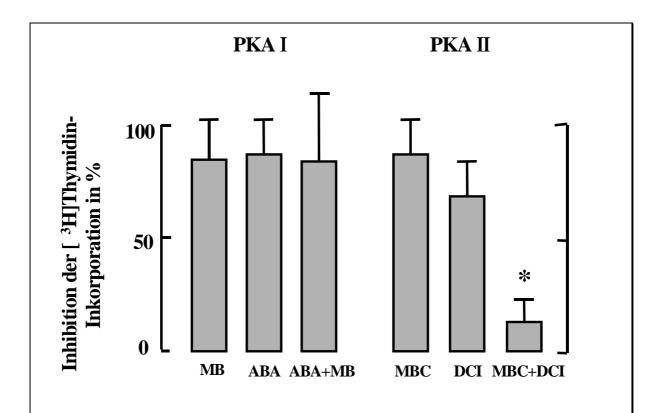


Abb. 31: Vergleich der Wirkung der PKAI-selektiven (ABA und MB, jeweils 0.5  $\mu M)$  mit den PKAII-selektiven Agonisten (jeweils 5  $\mu M)$  auf die PDGF-induzierte DNA-Synthese.

### 3.6 PKA-vermittelte antimitogene Wirkungen in humanen SMC

Nachdem in bovinen SMC PKA-vermittelte antimitogene Aktivität von selektiven PDE3- und PDE5 Hemmern, organischen Nitraten, Trapidil und einigen seiner Derivate sowie von PKAII-selektiven cAMP-Analoga gezeigt werden konnte, wurde versucht, die wichtigsten Ergebnisse in humanen SMC zu reproduzieren.

Sowohl der unselektive PDE-Hemmer IBMX (30  $\mu$ M) als auch die beiden PDE3-Inhibitoren Trequinsin (30 nM) und Quazinone (10  $\mu$ M) hemmten die PDGF-induzierte DNA-Synthese in humanen SMC praktisch vollständig (siehe auch 3.1.1).

Auch Sildenafil (10 μM) als selektiver Hemmstoff der PDE5 hob die PDGF-stimulierte [³H]Thymidin-Inkorporation in humanen SMC auf. Bei der Erstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve fiel auf, daß Sildenafil in humanen SMC wirksamer als in bovinen SMC zu sein schien. Während in bovinen SMC 1 μM praktisch wirkungslos blieb (ohne Zusatz von organischen Nitraten), reduzierte diese Konzentration in humanen SMC die PDGF-induzierte DNA-Synthese um etwa 50 %. Bei 3 μM Sildenafil war der mitogene Effekt von PDGF fast vollständig aufgehoben (Abb. 32). In bovinen SMC war dies erst mit 10 μM Sildenafil möglich. Diese antimitogene Wirkung ließ sich durch Inhibitoren der PKA (Rp-cAMPS, H89, PKI) aufheben (siehe auch 3.2).

Stellvertretend für die organischen Nitrate wurde die Wirkung von ISMN auf die Mitogenese humaner SMC untersucht. ISMN (30  $\mu$ M) hatte sowohl in bovinen als auch in humanen SMC eine vergleichbar potente antimitogene Wirkung.

Trapidil zeigte -bezogen auf die PDGF-induzierte DNA-Synthese- sowohl bei bovinen als auch bei humanen Zellen eine praktisch identische antimitogene Aktivität. Wie erwartet, konnte diese durch die PKA-Inhibitoren Rp-cAMPS, H89 und PKI fast vollständig aufgehoben werden (siehe auch 3.3).

Schließlich wurde noch die Wirkungen PKAI-selektive cAMP-Analoga mit PKAII-selektiven Analoga auf die Mitogenese humaner SMC verglichen. Es wurde dabei mit demselben Stimulationsprotokoll und Konzentrationen wie bei den bovinen SMC gearbeitet. Auch hier hob nur die PKAII-selektive Agonistenkombination DCI und MBC die PDGF-induzierte DNA-Synthese nahezu vollständig auf, während die PKAI-selektiven Agonisten MB und ABA ohne signifikante antimitogene Wirkung blieben (siehe auch 3.5).

Zusammenfassend zeigten die untersuchten Substanzen in humanen SMC praktisch gleiche antimitogene Wirkungen wie in bovinen SMC. Nur beim PDE5-Hemmer Sildenafil wurde eine etwas stärkere Hemmung der PDGF-induzierten DNA-Synthese beobachtet (Abb. 32).

Die Hemmung der antimitogenen Wirkung von Sildenafil wie auch von selektiven PDE3-Hemmern und Trapidil ließ sich durch die PKA-Inhibitoren Rp-cAMPS und PKI praktisch vollständig aufheben.

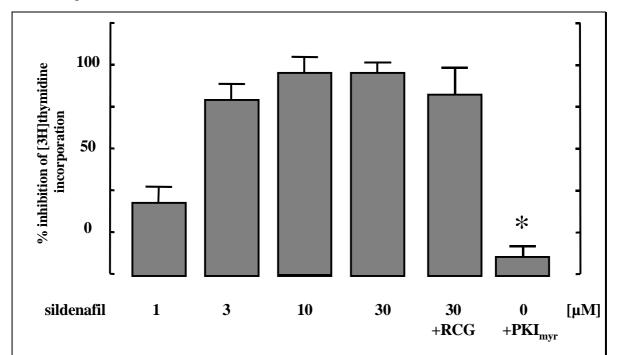


Abb. 32: Hemmung der PDGF-induzierten DNA-Synthese in humanen SMC durch Sildenafil und Einfluß des PKG-Inhibitors Rp-8-pCPT-cGMPS (RCG, 10  $\mu$ M) sowie des PKA-Inhibitors PKI $_{myr}$  (2  $\mu$ M) auf die antimitogene Wirkung von Sildenafil (n = 4)

### **Diskussion**

# 4.1 Bedeutung der antimitogenen Wirkung auf SMC

Die Bedeutung der glatten Gefäßmuskulatur bei der Entwicklung einer Restenose nach PTCA ist in vielen Untersuchungen hervorgehoben worden [Benzakour und Kanthou 1996, Reines und Ross 1993]. Für die Entwicklung der Restenose ist zunächst die Umwandlung von SMC vom kontraktilen zum sekretorischen Phänotyp von Bedeutung. Diese SMC migrieren in Richtung Gefäßlumen (Intima) und proliferieren dort. Die dann dort von den SMC produzierten extrazellulären Matrixproteine verengen das Gefäßlumen, wirken proaggregatorisch auf die Thrombozyten [Raines und Ross 1993, Ross und Fuster 1996] und können so eine Restenose auslösen. Die Proliferation und Migration der SMC wird unter **PDGF** anderem durch stimuliert. Durch Aktivierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges kann die mitogene Wirkung von PDGF reduziert oder völlig aufgehoben werden. Endogene Mediatoren wie Prostacyclin erreichen dies über die Stimulation der Adenylatcyclase und damit der cAMP-Produktion [Zucker et al. 1998]. Doch auch durch Hemmung des Abbaus von cAMP oder durch direkte Aktivierung der PKA könnte eine antimitogene Wirkung in-vivo erzielt und so die Restenoserate gesenkt werden. Zu den für die Prophylaxe der Restenose genutzten pharmakologischen Ansatzpunkten gehört die Hemmung der PDE3 (Cilostazol) wie auch das Triazolopyrimidin Trapidil.

In dieser Arbeit ist das Modell der kultivierten bovinen koronararteriellen glatten Gefäßmuskelzellen genutzt worden. An diesem Modell wurden die antimitogene Wirkung von direkten Inhibitoren cAMP-metabolisierenden PDE-Isoformen (Trequinsin, Quazinone, Ro 20-1724, Rolipram) und potentiellen indirekten Hemmern der PDE3 (GTN, ISMN, PETN, Sildenafil) untersucht. Darüber hinaus sind cAMP-Analoga als direkte PKA-Aktivatoren getestet worden. Auch die Signaltransduktion und Wirkung auf die SMC-Mitogenese von Trapidil und einigen seiner Derivate war Gegenstand dieser Arbeit. Bei Trapidil als bereits in der Prophylaxe der Restenose nach PTCA verwendeten Wirkstoff war der Mechanismus der PKA-abhängigen antimitogenen Aktivität bisher unklar. Die Trapidil-Derivate sind im Rahmen dieser Arbeit erstmals auf antimitogene Aktivität untersucht worden.

### 4.2 Wirkung und Signaltransduktion selektiver Inhibitoren der PDE-Isoformen 3 und 4

In dieser Arbeit wurde die Rolle der PDE-Isoformen 3 und 4 auf die PDGF-induzierte SMC-Mitogenese untersucht. Ergänzend wurde überprüft, ob das Ausmaß des Anstieges der intrazellulären cAMP-Konzentration durch PDE-Hemmer als Indikator für die PKAvermittelte Wirkung dienen kann. In Abschnitt 5.1 wurde von der ausgeprägt antimitogenen Aktivität der selektiven PDE3-Hemmer Trequinsin und Quazinone berichtet (siehe auch Abb. 34). Die antimitogen wirksamen Konzentrationen lagen 2 – 10-fach über den jeweiligen IC<sub>50</sub>-Werten der beiden Substanzen (IC<sub>50</sub> Trequinsin: 0.3 nM [Ruppert et al. 1982], IC<sub>50</sub> Quazinone: 0.6 µM [Holck et al. 1984]. Der antimitogene Effekt zeigte sich nicht nur bei der Hemmung der PDGF-induzierten DNA-Synthese, sondern auch schon bei der Hemmung der Schritt wichtiger MAPK-Phosphorylierung als des mitogenen Signaltranduktionsweges. Als Hinweis auf die PKA-Abhängigkeit kann die Aufhebung der Trequinsin und Quazinone durch die antimitogenen Wirkung von unterschiedlichen PKA-Inhibitoren H89 und Rp-cAMPS gewertet werden. Ganz im Gegensatz dazu steht die fehlende Wirkung der selektiven PDE4-Hemmer Rolipram und Ro 20-1724. Diese beeinflußten weder die MAPK-Phosphorylierung noch die DNA-Synthese in einem Konzentrationsbereich, der die PDE4 vollständig hemmen sollte. Die IC<sub>50</sub> für Ro 20-1724 beträgt 2 μM [Sheppard et al. 1972], diejenige für Rolipram 0.6 – 1 μM [Schneider et al. 1986]. Diese negativen Befunde widersprechen denen anderer Arbeitsgruppen [Souness et al. 1992, Pan et al. 1994], so konnte durch selektive PDE4-Hemmer in SMC von Ratte und Schwein ein ausgeprägter antimitogener Effekt gezeigt werden. Pan et al. [1994] berichteten von einer Reduktion der SMC-Proliferation in SMC von der Ratte durch Rolipram und Ro 20-1724. Allerdings wurden für diese Versuche Konzentrationen eingesetzt, die an eine selektive Hemmung nur der PDE4 durch die eingesetzten Inhibitoren zweifeln lassen. So waren die EC<sub>50</sub>-Werte für die antimitogene Wirkung 50 – 100-fach höher als die IC<sub>50</sub>-Werte für die PDE4-Inhibition. Gründe für diese Unterschiede zu den eigenen Ergebnissen können aber auch zum Beispiel in der Tierspezies und unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen der SMC liegen. Auf der anderen Seite korrelieren die Ergebnisse dieser Arbeit gut mit denen von Chini et al. [1997]. Dort wurde eine Hemmung der mesangialen Zellproliferation nur für selektiven Hemmern der PDE3, nicht aber für selektiven PDE4-Inhibitoren beschrieben.

Auf der Ebene der Signaltransduktion gab es zwischen den PDE3- und den PDE4-Hemmern ebenfalls Unterschiede. Bei den maximal antimitogen wirksamen Konzentrationen erhöhten

die PDE3-Hemmer ohne Zusatz von Forskolin die intrazelluläre cAMP-Konzentration nicht. Bei den PDE4-Hemmern erhöhte Rolipram schon ohne Forskolinzusatz den cAMP-Spiegel. Wenn die Adenylatcyclase durch Forskolin stimuliert wurde, zeigten beide PDE4-Hemmer und –allerdings deutlich schwächer- auch der PDE3-Hemmer Trequinsin eine signifikante Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration. In dieser Arbeit zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Ausmaß des cAMP-Anstieges und der antimitogenen Wirkung. Obwohl weder Trequinsin noch Quazinone die cAMP-Spiegel in der Abwesenheit von Forskolin steigerten, konnten mit beiden PDE3-Hemmern die PDGF-induzierte mitogene Wirkung praktisch vollständig aufgehoben werden. Eine naheliegende Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, daß der intrazelluläre cAMP-Anteil, der von PDE4 metabolisiert wird, größer ist als derjenige, der von PDE3 metabolisiert wird. Doch scheint das von der PDE3 "kontrollierte" funktionelle cAMP/PKA Kompartiment für die antimitogene Wirkung das weitaus wichtigere zu sein.

Diese Arbeit stützt die Hypothese, dass PDE-Isoenzyme an der funktionellen und/oder strukturellen Kompartimentierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges entscheidend beteiligt sind [Chini et al. 1997]. Die PDE-Isoformen verhindern möglicherweise den Übertritt von cAMP in ein anderes Kompartiment und dementsprechend auch die Aktivierung der PKA an dieser Stelle. Weitere Faktoren der Kompartimentierung könnten in der Bindung bestimmter PKA-Isoformen an spezifische A-Kinase-Ankerproteine (AKAPs) liegen. Mit den AKAPs und den PDE-Isoformen ist die Lokalisation der Wirkung nach Stimulation eines ACgekoppelten Rezeptors auf ausgewählte zelluläre Bereiche und Funktionen möglich. Gleichzeitig ist durch die unterschiedlichen Regulationsmöglichkeiten der PDE-Isoformen eine Verknüpfung mit anderen Signalwegen möglich. So könnte zum Beispiel eine Stimulation der GC durch NO mit nachfolgendem Anstieg der intrazellulären cGMP-Spiegel eine Verstärkung der PKA-Aktivität in einem PDE3-,,kontrollierten" Kompartiment bewirken. Auf ein PDE4-kontrolliertes Kompartiment ist dagegen kein entscheidender Einfluß zu erwarten. Umgekehrt ist von PDE4 bekannt, daß sie von MAPK phosphoryliert und aktiviert wird [Hoffmann et al. 1999] während PDE3 unbeeinflußt bleibt.

Um zu überprüfen, ob die eingesetzten PDE-Hemmer auch tatsächlich die PKA intrazellulär aktivieren, wurde die VASP-Phosporylierung als Marker für die PKA-Aktivität bestimmt. Alle vier verwendeten PDE-Hemmer führten zu einer VASP-Phosphorylierung. Der PKA-Inhibitor H89 hob diese auf. Dies zeigte die PKA-Abhängigkeit der durch die PDE-Hemmer induzierten VASP-Phosphorylierung. Obwohl durch Trequinsin, Quazinone und Ro 20-1724

allein keine signifikanten Anstiege der intrazellulären cAMP-Konzentration ausgelöst wurden, konnte doch dieser PKA-abhängige Effekt gemessen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Detektion der VASP-Phosphorylierung mittels Western-blot sensitiver für die Bestimmung von PKA-Aktivität ist als die Messung der gesamtzellulären cAMP-Gehaltes. Auch in anderen Zellen ist dies schon gezeigt worden. So wurde in humanen Thrombozyten zwar eine PKA-abhängige antiaggregatorische Wirkung beobachtet, ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehaltes konnte aber nicht gemessen werden [Weber et al. 1999]. Dagegen wurde eine Steigerung der VASP-Phosphorylierung gefunden.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse für eine besondere Funktion von PDE-Isoenzymen für die subzelluläre Kompartimentierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges. Die PDGF-induzierte Mitogenese in SMC kann von selektiven PDE3-Hemmern unterbunden werden, während PDE4-Hemmer dort ohne Einfluß sind (abb. 34). Obwohl die antimitogenen Effekte von Trequinsin und Quazinone cAMP- und PKAvermittelt sind, ist der Anstieg der gesamtzellulären cAMP-Konzentration durch selektive PDE-Hemmer offenbar kein Maß für die antimitogene Aktivität dieser Wirkstoffe. Die Beachtung der Kompartimentierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges kann für die Pharmakotherapie vieler Erkrankungen von großer Bedeutung und Nutzen sein. So könnten Nebenwirkungen reduziert werden, wenn nur das für den therapeutischen Erfolg wichtige Kompartiment aktiviert wird. Beispiele dafür sind die Entwicklung Isoform-selektiver PDE-Hemmer zur Therapie des Asthma bronchiale, von Allergien, des Diabetes mellitus oder der pulmonalen Hypertonie.

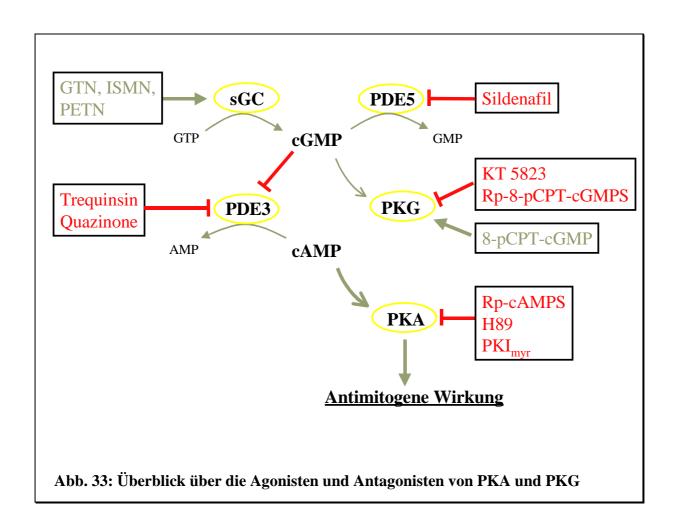
### 4.3 Wirkung und Signaltransduktion von Sildenafil, GTN, ISMN und PETN

Der selektive PDE5-Inhibitor Sildenafil bewirkte eine praktisch vollständige Hemmung der PDGF-induzierten DNA-Synthese. Auch die organischen Nitrate ISMN, PETN und in geringerem Ausmaß auch GTN zeigten diese antimitogene Wirkung. Der Grund für die vergleichsweise geringe Wirkung von GTN könnte in der Kinetik der NO-Freisetzung liegen. GTN setzt kurzfristig relativ viel NO frei. Dafür hält die Wirkung nicht lange an. Entsprechend dem Radikalcharakter von NO stellt ein hoher Anstieg der intrazellulären NO-Konzentration direkt und indirekt (über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies) oxidativen Streß für die Zelle dar. Dieser oxidative Streß wirkt promitogen und kann so antimitogene Wirkungen von NO/cGMP maskieren. Darüber hinaus ist GTN möglicherweise zu kurz wirksam um den PDGF-Effekt annähernd vollständig ausschalten zu können. Weil die organischen Nitrate die cGMP-Synthese steigern während Sildenafil den Abbau dieses Botenstoffes hemmt, kam es erwartungsgemäß zu einer synergistischen Wirkung bei der Hemmung der DNA-Synthese. Zusammen mit einer in bovinen SMC antimitogen unwirksamen Sildenafil-Konzentration (1 µM) wirkte auch GTN ausgeprägt antimitogen. Auch auf der Ebene der p42/p44 MAPK-Phosphorylierung bestätigten sich die antimitogenen Effekte von Sildenafil und organischen Nitrate.

Obwohl die inhibitorische Wirkung sowohl von cAMP als auch cGMP auf die SMC-Proliferation schon relativ lange bekannt ist [Boynton und Whitfield 1983, Assender et al., 1992], blieb der Mechanismus der antimitogenen Wirkung von cGMP weitgehend unklar. Es gibt zwei Enzyme als Hauptziel von cGMP in SMC und den meisten anderen Geweben: Inhibition der PDE3 als cGMP-inhibierbare PDE-Isoform und die Aktivierung der Proteinkinase G. Die Hemmung der PDE3 durch erhöhte cGMP-Konzentrationen führt zu einer Verminderung der cAMP- Metabolisierung. Dadurch kommt es -zumindest im Einflußbereich der PDE3- zu einer Aktivierung der PKA. Dieser Mechanismus verbindet den NO/cGMP-Signalweg mit dem cAMP/PKA-Signalsystem. Wie im vorangegangenen Abschnitt dargestellt, hat diese durch PDE3-Hemmung ausgelöste PKA-Aktivierung auch funktionelle Konsequenzen in SMC in Form einer ausgeprägt antimitogenen Wirkung. Die Messung der Konzentrationen cyclischer Nukleotide zeigte, daß nicht nur die cGMP-Konzentration gesteigert, sondern auch die Forskolin-stimulierten cAMP-Spiegel durch Sildenafil und organische Nitrate signifikant erhöht wurden. Ähnliche Anstiege des intrazellulären cAMP-Gehaltes wurden auch durch die selektiven PDE3-Hemmer Trequinsin und Quazinone erreicht (siehe oben). Zur weiteren Klärung der Frage, ob PKA oder PKG die antimitogene Wirkung von Sildenafil und den organischen Nitraten vermittelt, wurde der Einfluß von selektiven Inhibitoren dieser beiden Kinasen auf die antimitogenen Effekte untersucht. Selektive PKA-Inhibitoren wie H89, Rp-cAMPS und PKI<sub>mvr</sub> hoben die antimitogene Wirkung von Sildenafil und den organischen Nitraten auf. Der umgekehrte Versuch unter Verwendung PKG-selektiver Inhibitoren erwies sich als schwieriger. Das als PKG-Hemmer häufig genutzte KT5823 ist nicht sehr selektiv, es hemmt auch die PKA in einem erheblichen Ausmaß und hat auch auf weitere Zellenzyme Einfluß [Wyatt et al. 1991, Murad et al. 1993]. Mit dem weniger verbreiteten cGMP-Analogon Rp-8-pCPT-cGMPS (Rp) konnte die PKG hochselektiv gehemmt werden. KT5823 und Rp hatten beide keinen signifikanten Einfluß auf die antimitogene Wirkung von Sildenafil und den organischen Nitraten. Bevor dies als Hinweis auf die fehlende Beteiligung von PKG auf die antimitogene Wirkung gewertet werden konnte, wurden zahlreiche Versuche durchgeführt, die Effektivität der verwendeten Konzentrationen an PKG-Hemmern auf die PKG-Aktivität nachzuweisen. Dazu wurde die Bestimmung der VASP-Posphorylierung genutzt. Diese ist PKA- und/oder PKG-abhängig. Daher sollte erst die gemeinsame Wirkung von Inhibitoren der PKA und PKG die Sildenafil-induzierte VASP-Phosphorylierung hemmen. Bezogen auf Rp und PKI<sub>myr</sub> wurde dies auch experimentell bestätigt. Überraschenderweise steigerte KT5823 aber selber die VASP-Phosporylierung. Gründe dafür könnten in der sehr unselektiven Wirkung von KT5823 vermutet werden. Möglicherweise werden auch VASP-dephosphorylierende Phosphatasen von K5823 gehemmt.

Ergänzend wurde die Wirkung von bis zu 100 μM des selektiven PKG-Agonisten pCPT-cGMPS (pCPT) auf die PDGF-induzierte DNA-Synthese untersucht. Dort zeigten sich keine antimitogenen Effekte. Dass dieses cGMP-Analogon aber in der Lage ist, die Zellmembran zu passieren und die PKG zu aktivieren, zeigte sich in einer deutlichen Stimulation der VASP-Phosphorylierung in einer Konzentration von bereits 10 μM (3.2.2). Dieses Ergebnis korreliert mit denen von Southgate et al. [1990]: In dieser Untersuchung erwies sich nur der PKA agonist Br-8-cAMP, aber nicht der PKG agonist 8-Bromo-cGMP als in Ratten-SMC antimitogen wirksam. Ähnlich wie pCPT aktiviert 8-Bromo-cGMP selectiv die PKG, hat jedoch kaum Wirkung auf die PDE3. Auch Cornwell et al. [1994] konnten antimitogene Wirkungen durch Steigerung der zellulären cGMP-Konzentration durch NO-Donoren zeigen. Doch ähnlich wie in dieser Arbeit wirkte auch dort der PKG-Agonist pCPT nicht antimitogen. Einen Überblick über die verwendeten Agonisten und Antagonisten von PKA und PKG ist in Abb. 33 dargestellt.

Zusammenfassend ergeben sich also mehrere Hinweise dafür, dass die cGMP-vermittelten antimitogenen Effekte von Sildenafil und organischen Nitraten letztlich PKA-induziert sind. Der Grund dafür liegt in der Hemmung der PDE3 durch den Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration mit nachfolgender PKA-Aktivierung. Die Abb. 33 verdeutlicht diesen Mechanismus. Diese Befunde stimmen mit Ergebnissen anderer Autoren überein. Southgate et al. [1990] berichteten über die antimitogenen Wirkungen des cAMP-Analogons 8-Br-cAMP im Gegensatz zum cGMP-Analogon 8-Br-cGMP. Dieser PKG-Agonist hat ähnlich wie Rp praktisch keine hemmende Wirkung auf die PDE3. Cornwell et al. [1994] zeigten, daß Erhöhung der intrazellulären cGMP-Spiegel durch NO-Donoren die Mitogenese von SMC der Ratte verhindern kann. Wie bei dieser Arbeit, hatte auch dort pCPT als PKG-Agonist keine Wirkung auf die SMC-Mitogenese. Auch dort wurde die PKA-Aktivierung als Vermittler der antimitogenen Wirkung postuliert. Allerdings wurde die PDE3-Hemmung dort nicht als Möglichkeit der PKA-Aktivierung mit antimitogener Wirkung untersucht oder diskutiert.



In dieser Arbeit wurde erstmals die Wirkung von Sildenafil als selektiver PDE5-Inhibitor auf die Mitogenese von SMC untersucht. Neben den direkten PDE3-Hemmern ist auch durch organische Nitrate zusammen mit Sildenafil eine Hemmung der SMC-Proliferation in vivo mit positiven Wirkungen auf die Restenoseproblematik nach PTCA denkbar. Auf der anderen Seite deuten die Ergebnisse auf die Möglichkeit einer Interaktion mit Substanzen, welche die intrazellulären cAMP-Konzentration steigern. Dazu zählen zum Beispiel Sympathomimetika. Die Wirkungen von Sildenafil im kardiovaskulären Bereich könnten daher in Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Der in dieser Arbeit beschriebe Signaltransduktionsweg zur antimitogenen Wirkung von Sildenafil könnte in ähnlicher Weise auch die Vasorelaxation im Corpus cavernosum (als Grundlage der Wirkung bei erektiler Dysfunktion) erklären. Erste Hinweise auf einen Beteiligung von cAMP und PKA an der Signaltransduktion von Sildenafil in diesem Bereich fanden Stief et al. [2000]. Möglicherweise ist auch die Wirkung von Sildenafil bei erektiler Dysfunktion cAMP/PKA-mediiert und nicht von der Aktivierung der PKG abhängig. Auch hier bieten sich Ansätze zu weiteren Untersuchungen.

### 4.4 Wirkung und Signaltransduktion von Trapidil und Trapidil-Derivaten

# PKA-Abhängigkeit der antimitogenen Wirkung

Bönisch et al. konnten in den Untersuchungen zum antimitogenen Wirkmechanismus zeigen, daß Trapidil die mitogene Signaltranduktion von PDGF und anderen Mitogenen über eine Aktivierung der PKA unterbricht [Bönisch et al. 1998]. Auch in dieser Arbeit wurde dieser Befund einer Hemmung der PDGF-induzierten DNA-Synthese durch Trapidil bestätigt. Versuche mit zellgängigen PKA-Inhibitoren wie H89, Rp-cAMPS und dem hochspezifischen, zellgängigen PKI<sub>myr</sub> sollten die PKA-Ahängigkeit der antimitogenen Wirkung weiter untermauern. Der letztgenannte PKA-Inhibitor war zu Beginn der Arbeiten noch nicht verfügbar, so daß daher in den meisten Versuchen H89 und Rp-cAMPS verwendet wurden. Diese beiden Substanzen hemmen die PKA auf unterschiedlich Weise; H89 hemmt die Kinasefunktion der PKA an den katalytischen Untereinheiten, Rp-cAMPS blockiert die cAMP-Bindungsstellen an den regulatorischen Untereinheiten. In den zellfreien Assays wurde auch das nicht-myristoylierte und damit nicht zellgängige PKI verwendet. Dabei handelt es sich um den Teil des physiologischen Proteinkinase-A-Inhibitor-Peptids, welches die inhibierende Funktion ausübt. Die PKA-Inhibitoren hoben die antimitogene Wirkung von Trapidil bei der Hemmung der MAPK-Phosphorylierung als auch bei der Inhibition der PDGF-induzierten DNA-Synthese auf.

Unklar blieb der Mechanismus für die Aktivierung der PKA durch Trapidil. Zu den zählten die Hemmung potentiellen Möglichkeiten von cAMP-metabolisierenden Phosphodiesterasen oder die Aktivierung der AC, zum Beispiel über einen G<sub>s</sub>/ACgekoppelten-Rezeptor. Die dritte Möglichkeit bestand in der direkten Aktivierung der PKA. Zwar gibt es Hinweise auf eine weitgehend unselektive Hemmung der PDEs durch Trapidil, aber die für eine beginnende PDE-Hemmung notwendigen Konzentrationen lagen mindestens 20-fach über der in-vivo maximal erreichbaren Konzentration von 10 µM [Heinroth-Hofmann et al. 1990, Bethke et al. 1991]. Trotzdem wirkten bereits 10 µM Trapidil in kultivierten SMC ausgeprägt antimitogen. Mit Messungen des intrazellulären cAMP-Gehaltes wurde versucht, Hinweise auf eine Hemmung des cAMP-Abbaus oder der Stimulation der cAMP-Synthese durch Aktivierung der AC zu finden. Um die jeweilige potentielle Trapidilwirkung zu verstärken und im RIA erfaßbar zu machen, wurde entweder mit Forskolin oder Prostaglandinen bzw. mit dem unselektiven PDE-Hemmer IBMX koinkubiert. Doch bei Verwendung von 100 µM Trapidil zeigte sich keine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Damit erschien die Hemmung von PDEs wie auch die direkte oder Rezeptorvermittelte AC-Aktivierung unwahrscheinlich. Mit den ELISA-Untersuchungen an isolierter und aus SMC extrahierter PKA zeigte sich dann, daß Trapidil die PKA aktivieren kann, ohne dass die intrazelluläre cAMP-Konzentration gesteigert wird. Diese Wirkung war durch alle verwendeten PKA-Inhibitoren aufzuheben.

### Wirkung von Trapidil-Derivaten

Es sind vom Hersteller etwa 600 Trapidil-Derivate synthetisiert worden, von diesen waren zu Beginn dieser Arbeit noch etwa 300 verfügbar. Für einige ist eine PDE-Inhibition nachgewiesen worden, teilweise war diese erheblich stärker ausgeprägt als beim Trapidil (AR 12561, AR 12566, AR 12563) [Heinroth-Hofmann et al. 1990]. Es war bisher nicht bekannt, ob auch Trapidil-Derivate antimitogen wirksam sind. Besonders interessant war die Wirkung der Derivate, welche die PDE stärker hemmen und natürlich die der beiden durch Desalkylierung gebildeten Trapidil-Metabolite. Es zeigte sich nur bei zwei Derivaten eine direkte stimulierende Wirkung auf die PKA im zellfreiem ELISA-assay (AR 12019, AR 12563). Während AR 12019 als Dimethylaminoderivat dem Trapidil noch recht ähnlich ist, kann dies von AR 12563 wegen der raumfordernden Substituenten nicht behauptet werden (siehe Formel S. 66). Bei vielen Derivaten wurde eine hemmende Wirkung auf die C gefunden, in diesem Fall war dann eine möglicherweise noch vorhandene Wirkung auf die Gesamt-PKA oder auf R nicht nachweisbar, obwohl sie möglicherweise vorhanden ist. Trotz fehlender direkter Wirkung auf die PKA hemmten einige Derivate die PDGF-induzierte DNA-Synthese, doch dies war meist in einem zytotoxischen Effekt begründet. Darüber hinaus ist auch eine Hemmung von PDEs durch Trapidil-Derivate denkbar. Keines der untersuchten Trapidil-Derivate war der "Muttersubstanz" in Bezug auf durch direkte PKA-Aktivierung vermittelte antimitogene Wirkung überlegen.

#### 4.5 Molekularer Mechanismus der direkten PKA-Aktivierung durch Trapidil

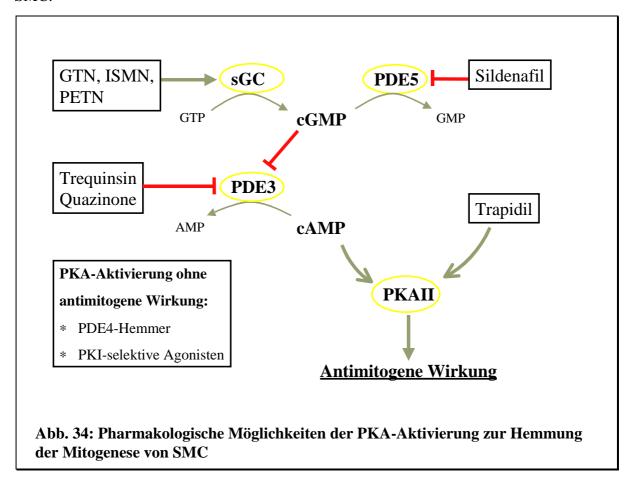
Es sind zwei Isoformen der PKA bekannt (siehe 2.2), daher ergab sich die Frage, welche PKA-Isoform für die antimitogene Wirkung in glatten Gefäßmuskelzellen entscheidend ist. Falls nur einer Isoform die antimitogene Wirkung zukommt, wäre die selektive Aktivierung nur dieser Isoform ein Weg das PDGF-induzierte Wachstum von SMC und damit möglicherweise auch die Restenoserate zu reduzieren. Es ist technisch nicht möglich, den Aktivierungszustand einzelner Isoformen in der Zelle zu bestimmen. Auch die Verwendung selektiver Antagonisten ist sehr problematisch, weil deren tatsächliche intrazelluläre Wirkung schwer nachzuweisen ist. Darüber hinaus wurde mehrfach beobachtet, daß diese "Antagonisten" unter bestimmten Umständen auch partiell agonistisch wirken können. Dies gilt insbesondere bei Koinkubation mit cAMP-Bindungsstellen-selektiven Agonisten [Genieser, pers. Mitteilung]. Letzteres könnte auch bei Trapidil zutreffen, daher wurden Isoform- und cAMP-Bindungsstellen-selektive Agonistenkombinationen eingesetzt. Dadurch war es auch möglich, eventuelle Synergismen eines oder mehrerer selektiver Agonisten mit Trapidil festzustellen. Die tatsächliche intrazelluläre PKA-Aktivierung kann mittels Western blot nachgewiesen werden, indem die PKA-abhängige Phosphorylierung des "vasodilatorstimulated phosphoprotein" (VASP) bestimmt wird [Markert et al. 1996, Weber et al. 1999]. Durch diese Versuche ergab sich, daß nur die PKAII-selektive Agonistenkombination die PDGF-induzierte DNA-Synthese effektiv hemmte. Im Gegensatz dazu blieb die PKAIselektive Kombination praktisch ohne Einfluß auf die SMC-Mitogenese. Beide Agonistenkombinationen phosphorylierten VASP, dabei war die PKAI-selektive Kombination etwas stärker wirksam. Diese Ergebnisse fügen sich in die Befunde anderer Arbeitsgruppen ein, so stellten Ciardiello et al. [Ciardiello et al., 1998] einen Zusammenhang zwischen PKAI-Aktivierung und promitogenen Effekten in Karzinomzellen her, während Chen et al. [Chen et al. 1998] die PKAII als die antimitogen wirksame Isoform vermutete. Daher kann die PKAII auch als das Zielenzym von Trapidil für die antimitogenen Effekte angesehen werden. Zusammen mit dem PKAII, Bindungsstelle A-selektiven cAMP-Analogon MBC zeigte sich tatsächlich eine synergistische Wirkung mit Trapidil auf die PKA-Aktivierung. Mit den anderen PKA-Agonisten wurde keine synergistische Wirkung gefunden.

Als PKA diente das Produkt der Firma Sigma, welches nicht rekombinant ist, sondern aus Rinderherzen gewonnen wird. Diese enthalten mehr PKAII als PKAI. Wie auch die von Prof. Walter zur Verfügung gestellte PKA ist diese nativ, also auch N-myristoyliert an der C. Mit

der SPR-Methode wurden dann weitere Untersuchungen durchgeführt. Dabei führte Trapidil bei der RII zu einer Steigerung der Bindung an die immobilisierten cAMP-Analoga. Es kam, im Gegensatz zu den Kontrollversuchen mit cAMP, nicht zu einer Kompetition mit den immobilisierten cAMP-Analoga um die cAMP-Bindungsstellen der R. Diese Wirkung von Trapidil zeigte sich nur bei der RII, nicht bei der RI. Dort zeigte sich ein schwacher cAMPartiger Effekt, die Bindung von RI an den Chip mit den immobilisierten cAMP-Analoga wurde abgeschwächt. Eine mögliche Erklärung der Trapidilwirkung könnte in einer Sensitivierung der RII in Bezug auf die Bindung von cAMP (bzw. cAMP-Analoga) liegen. Andererseits wurde bei den ELISA-Versuchen keine überadditive Wirkung von Trapidil mit cAMP (jeweils 30 nM bis 10 µM) beobachtet. Weitere Untersuchungen zeigten, daß in allen verwendeten PKAs noch cAMP vorhanden war. Diese Menge war ohne Trapidilzusatz nicht ausreichend für eine PKA-Aktivierung. Aus der Wirkung von Trapidil auf die RII kann erwartet werden, daß Trapidil das PKAII-Holoenzym ebenfalls auf dieselbe Weise beeinflußt. Dies war aber unter Verwendung der rekombinanten, nicht-myristoylierten PKA nicht der Fall. Hier zeigte sich SPR-spektroskopisch kein Einfluß von Trapidil auf die Bindung des Holoenzyms an immobilisierte cAMP-Analoga. Der Grund dafür könnte in der fehlenden Myristoylgruppe liegen. Diese ist bei der PKAII von entscheidener Bedeutung, sie beeinflußt die Struktur des Holoenzyms erheblich [Gangal et al. 1999]. Ob und in welcher Form damit auch auf die cAMP-Bindungsstellen Einfluß genommen wird, ist bisher nicht bekannt. Darüber hinaus gibt es auch die Möglichkeit, das Trapidil auf die C Einfluß nimmt. Bei der ELISA-Untersuchung war keine Hemmung der Phosphorylierungsaktivität der nativen C durch Trapidil (im Gegensatz zu einigen der Trapidil-Derivate) zu beobachten. Bei der rekombinaten, nicht-myristoylierten C kam es sogar zu einer leichten, nicht signifikanten Verstärkung der Phosphorylierungsaktivität der C.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Trapidil die PKA ohne eine Steigerung der cAMP-Konzentration aktiviert. Ob dies jedoch intrazellulär völlig unabhängig von cAMP möglich ist, konnte nicht geklärt werden. Die Bindung von Trapidil an die PKA erfolgt mindestens an die R, möglicherweise ebenfalls an die C. Daraus resultiert eine komplexe Wirkung, deren Konsequenz intrazellulär in einer Stimulation zumindest der PKAII-Aktivität mündet. Die intrazelluläre Wirkung auf die PKAI konnte bislang nicht bestimmt werden. Aus dieser PKAII-Aktivierung heraus kommt es zur antimitogenen Wirkung durch Trapidil. Der genaue Mechanismus der PKA-Aktivierung durch Trapidil bedarf aber weiterer Aufklärung.

Die folgende Abb. gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten pharmakologischen Möglichkeiten zur Aktivierung der PKA mit antimitogener Wirkung auf SMC.



# Zusammenfassung

Die Proliferation glatter koronararterieller Gefäßmuskelzellen (SMC) ist bedeutsam für die Entwicklung einer Restenose nach Koronarangioplastie und kann durch Stimulation der intrazellulären Proteinkinase A (PKA)-Aktivität gehemmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden pharmakologische Mechanismen der PKA-vermittelten antimitogenen Wirkung in kultivierten bovinen und humanen SMC untersucht.

Selektive Hemmer der Phosphodiesterase 3 (cGMP-inhibierbare PDE) hoben die PDGFinduzierte Proliferation von SMC auf. Dies zeigte sich in einer Hemmung der PDGFinduzierten DNA-Synthese und p42/p44 MAP-Kinase-Phosphorylierung. Obwohl diese antimitogene Wirkung nur mit einem geringfügigen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration einherging, kam es dennoch zu einer Aktivierung der PKA. Inhibitoren der PKA hoben den antimitogenen Effekt der PDE3-Hemmer auf. Selektive PDE4 (cAMPspezifische PDE)-Hemmer führten trotz erheblicher Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration mit nachfolgender PKA-Aktivierung nicht zu einer antimitogenen Wirkung. Auch die selektive Hemmung der cGMP-spezifischen PDE (PDE5) durch Sildenafil zeigte ebenso wie die Stimulation der cGMP-Bildung durch organische Nitrate (GTN, ISMN, PETN) eine antimitogene Wirkung. Diese konnte ebenfalls auf eine Hemmung der PDE3 (bedingt durch den Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration) mit nachfolgender Erhöhung der cAMP-Konzentration und PKA-Aktivierung zurückgeführt werden. Selektive PKA-Inhibitoren hoben den antimitogenen Effekt von Sildenafil und organischer Nitrate auf. Auch die antimitogenen Effekte des Koronartherapeutikums Trapidil und einiger seiner Derivate konnten durch Inhibitoren der PKA aufgehoben werden. In Versuchen an isolierter PKA wurde gezeigt, daß dies auf einer direkten Aktivierung der PKA beruht. Diese direkte Wirkung auf die PKA wurde mit einen Oberflächenplasmonresonanz-Spektrometer an verschiedenen PKA-Isoformen näher untersucht. Auch hier zeigte sich an isolierter PKA eine Interaktion mit Trapidil. Unter Verwendung von PKA-Isoform- und cAMP-Bindungsstellenselektiven cAMP Analoga zeigte sich, daß nur die PKA II-selektive Aktivierung in SMC antimitogen wirksam war.

Mit dem Nachweiß einer direkten Aktivierung der PKA (isoliertes Enzym) konnte der Mechanismus der antimitogenen Wirkung von Trapidil weiter aufgeklärt werden. Es wurden Hinweise gefunden, daß PDE- und PKA-Isoformen an der Kompartimentierung der cAMP/PKA-Signaltransduktion in SMC beteiligt sind. Damit ergibt sich der neue therapeutische Ansatz, gezielt pharmakologisch das antimitogen wirksame cAMP/PKA-Kompartiment zu aktivieren. Selektive Hemmung von PDE- oder Aktivierung von PKA-

Isoformen könnten auch bei anderen Erkrankungen (wie z. B. der akuten Myokardischämie) eine wirkungsvolle und nebenwirkungsarme Pharmakotherapie ermöglichen.

# **Literaturverzeichnis**

Assender JW, Southgate KM, Hallett MB, Newby AC, Inhibition of proliferation, but not Ca<sup>2+</sup> mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J* **288**, 527-532, 1992

Beckmann JS, Crow JP, Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans* **21**, 330-334, 1995

Beavo JA, Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isozymes. *Physiol Rev* **75**, 725-748, 1995

Beavo JA, Reifsnyder DH, Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol* **11**, 150-155, 1990

Bethke T, Mehl H, Meyer W, Schmitz W, Scholz H, Thomas K, Wenzlaff H, Effects of the triazolopyrimidine trapidil on force of contraction, beating frequency and phosphodiesterase I-V activity in guinea-pig hearts. *Arzneim-Forsch/Drug Res* **41**, 461-468, 1991

Bobik A, Campbell J, Vascular derived growth factors: cell biology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacological reviews **45**,1-42, 1993

Bornfeld KE, Krebs EG, Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal* **11**, 465-477, 1999

Bönisch D, Weber A-A, Wittpoth M, Osinski, MT and Schrör K, Antimitogenic effects of trapidil in coronary artery smooth muscle cells by direct activation of protein kinase A. *Mol Pharmacol* **54**, 241-248, 1998

Boolell M, Allen MJ and Ballard SA, Sildenafil: an orally active type 5 cyclic phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res* **8**, 47-52, 1996

Boynton AL, Whitfield JF, The role of cAMP in cell proliferation: A critical assessment of evidence. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **15**, 193-294, 1983

Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantification of microgramm quantaties of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254, 1976

Bretschneider E, Wittpoth M, Weber A-A, Glusa E, Schrör K, Activation of NFkappaB is essential but not sufficient to stimulate mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 365-368, 1997

Butt E, Walter U, Cyclic nucleotides: measurement and function. In: *Platelets – a practical approach* (Hrsg. Watson SP, Authi KS), 199-277, Oxford University Press, Oxford, 1996

Butt E, Nolte C, Schulz S, Beltman J, Beavo JA, Jastorff B, Walter U, Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP. *Biochem Pharmacol* **43**, 2591-2600, 1992

Buxton ILO, Brunton LL, Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *J Biol Chem* **258**, 10233-10240, 1983

Cercek B, Sharifi B, Barath P, Bailey L, Forrester JS, Growth factors in pathogenesis of coronary arterial restenosis. *Am J Cardiol* **68**, 24C-33C, 1991

Cercek B, Ebrahimi R, Dimayuga P, Khorsandi M, Forrester JS, Trapidil prevents rat vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Am J Cardiol* **17**, 72A, 1993

Chen TC, Hinton DR, Zidovetski R, Hofmann FM, Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas. *Lab Invest* **78**, 165-174, 1998

Chen YM, Wu KD, Tsai TJ, Hsieh BS, Pentoxifyllin inhibits PDGF-induced proliferation of and TGF-beta-stimulated collagen synthesis by vascular smooth muscle cells *J Mol Cell Cardiol* **31**, 773-783, 1999

Chini CCS, Grande JP, Chini EN, Dousa TP, Compartmentalization of cAMP signaling in mesangial cells by phosphodiesterase isozymes PDE3 and PDE4. *J Biol Chem* **272**, 9854-9859, 1997

Ciardiello F, Dixit M, di Isernia G, Damiano V, Bianco R, Arteaga CL, Tortora G, Down-regulation of type I protein kinase by transfection of human breast cancer cells with an epidermal growth factor antisense expression vector. *Breast Cancer Res Treat* **47**, 57-62, 1998

Claesson-Welsh L, Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem* **269**, 32023-32026, 1994.

Cook SJ, McCormick F, Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* **262**, 1069-1072, 1994

Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM, Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol* **267**, C1405-C14013, 1994

Cullen DC, Brown RG, Lowe CR, Detection of immuno-complex formation via surface plasmon resonance on gold-coated diffraction gratings. *Biosensor* **3**, 211-225, 1987

Dangas G, Fuster V, Management of restenosis after coronary intervention. *Am Heart J* 132, 428-436, 1993

Davis RJ, The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **268**, 14553-14556, 1993

Dell'aqua ML, Scott JD, Protein kinase A anchoring. J Biol Chem 272, 12881-12884, 1997

De Wit RJW, Hekstra D, Jastorff B, Stec WJ, Baraniak J, Van Dreil R, Van Haastert PJM, Inhibitory action of certain cyclophospate derivatives of cAMP on cAMP-dependent protein kinases. *Eur J Biochem* **142**, 255-260, 1984

Døskeland SO, Øgreid D, Ekanger R, Sturm PA, Miller JP, Suva RH, Mapping of the cylic nucleotide binding sites of adenosine cyclic 3',5'-phosphate-dependent protein kinase I. *Biochemistry* **22**, 1094-1101, 1983

Døskeland SO, Øgreid D, Characterization of the interchain interactions between the binding sites of the free regulatory moity of protein kinase I. *J Biol Chem* **259**, 2291-2302, 1984

Dostmann WRG, Taylor SS, Genieser, HG, Jastorff B, Døskeland SO, Øgreid D, Probing the cyclic nucleotide binding sites of cAMP-dependent protein kinase I and II with analogs of adenosine 3',5'-cyclic phosphorothioates. *J Biol Chem* **265**, 10484-10491, 1990

Durgerian S, Taylor SS, The consequence of introducing an autophosphorylation site into the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **264**, 9807-9813, 1989

Feelisch M, Noack EA, Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* **139**, 19-30, 1987

Ferns GAA, Raines E, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R, Inhibition of neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* **253**, 1129-1132, 1991

Füller H, Hauschild F, Modersohn D, Thomas E, Pharmakologie des 5-methyl-7-diäthylamino-s-triazolo [1,5-a]pyrimidin (Trapymin, Rocornal<sup>©</sup>), einer Verbindung mit gefäßerweiternder Wirkung. *Pharmazie* **26**, 554-562, 1971

Gangal M, Clifford T, Deich-J, Cheng X, Taylor SS, Johnson DA, Mobilization of the A-kinase N-myristate through an intermolecular switch. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 12394-12399, 1999

Garbers DL, Guanylate cyclase, a cell surface Receptor. J Biol Chem 264, 9103-9106, 1989

Giessler C, Fahr A, Tertov VV, Kudryashov SA, Orekhov AN, Smirnov VN, Mest HJ, Trapidil derivatives as potential antiatherosclerotic drugs. *Arneim-Forsch / Drug Res* **37**, 538-541, 1987

Graves LM, Bornfeldt KE, Raines EW, Potts BC, Macdonald SG, Ross R, Krebs EG, Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 10300-10304, 1993

Graves LM, Bornfeldt KE, Sidhu., Argast GM, Raines EW, Ross R, Leslie CC, Krebs EG, Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase A through a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* **271**, 505-511, 1996

Halbrügge M, Friedrich C, Eigenthaler M, Schanzenbacher P, Walter U, Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cAMP- and cGMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem* **265**, 3088-3093, 1990

Harder S, Thürmann PA, Hellstern A, Benjaminov A, Pharmacokinetics of trapidil, an antagonist of platelet-derived growth factor, in healthy subjects and in patients with liver cirrhosis. *Br J Clin Pharmacol* **42**, 443-449, 1996

Heinroth-Hofmann I, Krüger J, Tertov VV, Orekhov AN, Mest H-J, Influence of trapidil and trapidil derivatives on the content of cyclic nucleotides in human intima cells cultured from atherosclerotic plaques. *Drug Dev Res* **19**, 321-327, 1990

Hofmann F, Beavo JA, Bechtel PJ, Krebs EG, Comparison of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases from rabbit skeletal and bovine heart muscle. *J Biol Chem* **250**, 7795-801, 1975

Hoffmann R, Baillie GS, MacKenzie SJ, Yarwood SJ, Houslay MD, The MAP kinase ERK2 inhibits the cyclic AMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 by phosphorylating it at Ser579. *EMBO J*, **18**, 893-903. 1999

Holck M, Thorens S, Muggli R, Eigenmann R, Studies on the mechanism of positive inotropic activity of Ro 13-6438, a structurally novel cardiotonic agent with vasodilating properties. *J Cardiovasc Pharmacol* **6**, 520-530, 1984

Hoshiya M, Awazu M, Trapidil inhibits platelet-derived growth factor–stimulated mitogenactivated protein kinase cascade. *Hypertension* **31**, 665-671, 1998

Jiang H, Corbin JD, Effect of epinephrine or cAMP on cAMP-bound kinase holoenzyme from bovine heart. *Am J Physiol* **260**, H722-H729, 1991

Jonzon B, Nilsson J, Fredholm BB, Adenosine receptor –mediated changes in cyclic AMP productions and DNA synthesis in cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **124**, 451-456, 1985

Knighton DR, Xuong N-H, Taylor SS, Sowadski JM, Crystallization studies of cAMP-dependent protein kinase. *J Mol Biol* **220**, 217-220, 1991

Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Xuong NH, Taylor SS, Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate—dependent protein kinase. *Science* **253**, 414-420, 1995

Krebs EG, Beavo JA, Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem* **48**, 923-959, 1979

Leroux F, van Keulen BJ, Daliers J, Pommery N, Hénichart JP, Phosphodiesterase 4 inhibitors as airways smooth muscle relaxant agents: Synthesis and biological activities of triazine derivatives. *Bioorg Med Chem* **7**, 509-516, 1989

Liedberg B, Nylander C, Lundstom I, Biosensingf with surface plasmon resonance-how it al started. *Biosens Bioelectron* **10**, 1-9, 1995

Liu MW, Roubin GS, Robinson KA, Black AJR, Hearn JA, Siegel RJ, King III SB, Trapidil in preventing restenosis after baloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* **81**, 1089-1093, 1994

Loesberg C, Van Wijk R, Zandbergen J, Van Aken WG, Van Mourik JA, De Groot PG, Cell cycle dependent inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by prostaglandin I<sub>2</sub>. *Exp Cell Res* **160**, 117-125, 1985

Majesky MW, Reidy MA, Bowen-Pope DF, Hart CE, Wilcox JN, PDGF ligand and receptor gene expression during repair of arterial injury. *J Cell Biol* **111**, 2149-2158, 1990

Makert T, Krenn V, Leebmann J, Walter U, High expression of the focal adhesion- and microfilament-associated protein VASP in vascular smooth muscle and endothelial cells of the intact human vessel wall. *Basic Res Cardiol* **91**, 337-343, 1996

Malarkey K, Belham CM, Paul A, Graham A, McLees A., Scott PH, Plevin R, The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem. J* **309**, 361-375, 1995

Manganiello VC, Degermann E, Cyclic nucleotides phosphodiesterases (PDEs): diverse regulators of cyclic nucleotide signals and inviting molecular targets for novel therapeutic agents. *Thromb Haemost* **82**, 407-411, 1999

Maresta A, Balducelli M, Cantini L, Casari A, Chion R, Fabbi M, Fontanelli A, Monici Preti PA, Repetto S, De Servi S, Varani E, Trapidil (Triazolopyrimidine), a platelet derived groth factor antagonist, reduces restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Results of the randomized, double-blind, STARC study. *Circulation* **90**, 2710-2715, 1994

Maronde E, Cyclische Nukleotide als Regulatoren von Zellwachstum und Zelldifferenzierung. Dissertation, Universität Bremen, 1993

Murad F, Förstermann U, Nakane M, Pollock J, Tracey A, Matsumoto T, Buechler W, The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **28**, 101-109, 1993

Nakaki T, Nakayama M, Yamamoto S, Kato R,  $\alpha_1$ -Adrenergic stimulation and  $\beta_2$ -adrenergic inhibition of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **37**, 30-36, 1990

Neitzel JJ, Dostmann WR, Taylor SS, Role of MgATP in the activation and reassociation of cAMP-dependent protein kinase I: consequence of replacing the essential arginine in the cAMP binding site A. *Biochemistry* **30**, 733-739, 1991

Nicholson CD, Chaliss RA, Shahid M, Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 19-27, 1991

Nishikawa H, Ono N, Motoyasu M, Preventive effects of trapidil (PDGF antagonist) on restenosis after PTCA. *Circulation* **86**, 41-53, 1992

Noguchi K, Tomoike H, Kawachi Y, Nabeyama S, Shimokawa H, Maruoka Y, Nakamura N, Effects of trapidil and nitroglycerin on coronary circulation in conscious dogs. *Arzneim-Forsch* **34**, 872-876

Øgreid D, Døskeland SO, Activation of protein kinase isoenzymes under near physiological conditions. *Biochemistry* **22**, 1686-1697, 1982

Øgreid D, Ekanger R, Suva, R-H, Miller J-P, Døskeland, SO, Comparison of the two classes of binding sites (A and B) of type I and type II cyclic AMP-dependent protein kinase by using cyclic nucleotides analogs. *Eur J Biochem* **181**, 19-31, 1989

Okamato S, Inden M, Setsuda M, Konishi T, Nakano T, Trapidil (triazolopyrimidine), a platelet-derived growth factor (PDGF) antagonist, in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* **123**, 1439-1444, 1992

Onishi H, Yamaguchi K, Shimada S, Suzuki Y, Kumagi A, A new approach to treatment of atherosclerosis and trapidil as an antagonist of platelet-derived growth factor. *Life Sci* **31**, 2595-2602, 1982

Pan X, Arauz E, Krzanowski JJ, Fitzpatrick DF, Polson JB, Synergistic interactions between selective pharmacological inhibitors of phosphodiesterase isozyme families PDE3 and PDE4 to attenuate proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* **48**, 827-835, 1994

Polson JB, Strada SJ, Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. Annu Rev Pharmacol Toxicol 36, 403-427, 1996

Pulverer PJ, Kyrikis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR, Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinaes. *Nature* **353**, 670-674, 1991

Rascon A, Lindgren S, Stavenow L, Belfrage P, Andersson K-E, Manganiello VC and Degermann E, Purification and properties of the cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase from bovine aortic smooth muscle. *Biochim Biophys Acta* **1134**, 149-156, 1992

Rannels Corbin Studies on the function of the two intrachain cAMP binding sites of protein kinase A. *J Biol Chem* **256**, 7871-7876, 1981

Reeves ML, Leigh BK, England PJ, The identification of a new cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in human and guinea-pig cardiac ventricle. *Biochem J* **241**, 535-541, 1987.

Reidy MA, Factors controlling smooth muscle cell proliferation. *Arch Pathol Lab Med* **116**, 1276-1280, 1992

Reines RW, Ross R, Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* **69**, 30-37, 1993.

Reinitz CA, Bianco RA, Shabb JB, Compartmentation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in cardiac ventrivular muscle. *Arch Biochem Biophys*, **348**, 391-402, 1997

Rose RJ, Liu H, Palmer D, Maurice DH, Cyclic AMP-mediated regulation of vascular smooth muscle cell cyclic AMP phosphodiesterase activity. *Br J Pharmacol* **122**, 233-240, 1997

Rosen OM, Erlichman J, Reversible autophosphorylation of a cyclic 3',5' AMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *J Biol Chem* **250**, 7788-7794, 1975

Roskoski K Jr, Assays of protein kinase. Methods Enzymol 99, 3-6, 1983

Ross R, Fuster V, The pathogenesis of atherosclerosis. In: *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease* (Hrsg. Fuster V, Ross R, Topol EJ), 441-460. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996

Rothermel JD, Botello LHP, A mechanistic and kinetic analysis of the diastereomers of adenosine 3',5' (cyclic) adenosine posphothionate with purified cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem J* **251**, 757-762, 1988

Ruppert D, Weithmann KU, HL 725, an extremely potent inhibitor of platelet phosphodiesterase and platelet aggregation. *Life Sci* **31**, 2037-2043, 1982

Rybalkin SD, Bornfeldt KE, Cyclic nucleotide phosphodiesterases and human arterial smooth muscle cell proliferation. *Thromb Haemost* **82**, 424-434, 1999

Sekiya M, Funada J, Watanabe K, Miyagawa M, Akatsu H, Effects of probucol and cilostazol alone and in combination on frequency of poststenting restenosis. *Am J Cardiol* **82**, 144-147, 1998

Sheppard H, Wiggan GA, Tsien WH, Structure-activity relationship for inhibitors of phosphodiesterases from erythrocytes and other tissues. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **1**, 103-112, 1972

Schneider HH, Schmiechen R, Brezinski M, Seidler J, Stereospecific binding of the antidepressant rolipram to brain protein structures. *Eur J Pharmacol* **127**, 105-115, 1986

Schoeffter, P, Lugnier, C, Travo, C and Stoclet, JC, A comparison of cyclic AMP signaling system in rat aortic myocytes in primary culture and aorta. *Lab Invest*, **61**, 177-182, 1989

Schröder H, Schrör K, Prostacyclin-dependent cyclic AMP formation in endothelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **347**, 101-104, 1993

Schwartz SM, Reidy MA, Restenosis. An assessment of factors important in arterial occlusion. *in* Atherosclerosis and Coronary Artery Disease. (Hrsg. Fuster V, Ross R, Topol EJ), pp. 701-714 J.B. Lippincott, Philadelphia, 1996

Sciorati C, Nisticò G, Meldolesi J, Clementi E, Nitric oxide effects on cell growth: GMP-dependent stimulation of the AP-1 transcription complex and cyclic GMP-independent slowing of cell cycling. *Br J Pharmacol* **122**, 687-697, 1997

Scott JD, Soderling TA, Serine/threonine protein kinases. *Curr Opin Neurobiol* **2**, 289-295, 1992

Sekiya M, Funada J, Watanabe K, Miyagawa M, Akatsu H, Effects of probucol and cilostazol alone and in combination on frequency of poststenting restenosis. *Am J Cardiol* **82**, 144-147, 1998

Shabb JB, Buzzeo BD, Ng L, Corbin JD, Mutating protein kinase cAMP-binding sites into cGMP-binding sites: mechanism of cGMP selectivity. *J Biol Chem* **266**, 24320-24326, 1991

Sharma RV, Balla RC, PDGF-induced mitogenic signalling is not mediated through protein kinase C and c-fos pathway in VSM cells. *Am J Physiol* **264**, C71-C79, 1993

Sheppard H, Wiggan GA, Tsien WH, Structure-activity relationship for inhibitors of phosphodiesterases from erythrocytes and other tissues. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **1**, 103-112, 1972

Smolenski A, Burkhardt AM, Eigenthaler M, Butt E, Gambaryan S, Lohmann SM; Walter U, Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **358**, 134-139, 1998

Snyder HM, Noland TD, Breyer MD, cAMP-dependent protein kinase mediates hydrosmotic effect of vasopressin in collecting duct. *Am J Physiol* **263**, C147-C153, 1992

Souness JE, Hassall GA, Parott DP, Inhibition of pig aortic smooth muscle cell DNA synthesis by selective type III and IV cAMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochem Pharmacol* **44**, 857-866, 1992

Southgate K, Newby AC, Serum-induced proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells from the contractile state is inhibited by 8-Br-cAMP but not 8-Br-cGMP. *Atherosclerosis* **52**, 113-123, 1990

Sudo T, Tachibana K, Toga K, Tochizawa S, Inoue Y, Kimura Y, Hidaka H, Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamid analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme activity. *Biochem Pharmacol* **59**, 347-356, 2000

Taylor SS, cAMP-dependent protein kinase: a model for an enzyme family. *J Biol Chem* **264**, 8443-8446, 1989

Tiell ML, Sussmann II, Gordon PB, Sanders RN, Suppression of fibroblast proliferation in vitro and of neointimal hyperplasia in vivo by the triazolopyrimidine trapidil. *Artery* **12**, 33-50, 1983

Titani K, Sasagawa T, Ericsson LH, Kumar S, Smith SB, Krebs EG, Walsh DA, Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type I adenosine cyclic 3', 5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry* **23**, 4193-4199, 1984

Tsuchikane E, Fukuhara A, Kobayashi T, Kirino M, Yamasaki K et al, Impact of cilostazol on restenosis after percutaneous coronary balloon angioplasty. *Circulation* **100**, 21-26, 1999

Weber A-A, Hohlfeld, T, Schrör K, cAMP is an important messenger for ADP-induced platelet aggregation. *Platelets*, **10**, 238-241, 1999

Weber A-A, Strobach H, Schrör K, Direct inhibition of platelet function by organic nitrates via nitric oxide. *Eur J Pharmacol* **247**, 29-37, 1993

Wright DE, Noiman, Chock BB, Chau V, Fluorimetric assay for adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**. 6048- 6053,1981

Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW, Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. Science 262, 1065-1069, 1993

Wyatt TA, Pryzwansky KB, KT5823 activates human neutrophils and fails to inhibit cGMP-dependent protein kinase phosphorylation of vimetin. *Res Comm Chem Path Pharm* **74**, 3-14, 1991

Yokozaki H, Tortora G, Pepe S, Maronde E, Genieser H-G, Jastorff B, Cho-Chung YS, Unhydryzable analogues of adenosine 3', 5'-monophosphate demonstrating growth inhibition and differentiation in human cancer cells. *Cancer Res* **52**, 2504-2508, 1992

Yu, S-M, Hung L-M, Lin C-C, cGMP-elevating agents supress proliferation of vascular muscle cells by inhibiting the activation of the epidermal growth factor signalling pathway. *Circulation* **95**, 1269-1277, 1997

Zhou, YY, Cheng, H, Bogdanov, KY, Hohl, C, Altschuld, R, Lakatta, EG and Xiao, RP, Localized cAMP-dependent signaling mediates beta 2-adrenergic modulation of cardiac excitation-contraction coupling. *Am J Physiol*, **273**, H1611-8, 1997

Zucker T-P, Bönisch D, Hasse A, Grosser T, Weber A-A, Schrör K, Tolerance development to antimitogenic actions of prostacyclin but not of prostaglandin E<sub>1</sub> in coronary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* **345**, 213-220, 1998

Zucker T-P, Bönisch D, Muck S, Weber A-A, Bretschneider E, Glusa, E, Schrör K, Thrombin-induced mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells is potentiated by thromboxane  $A_2$  and involves upregulation of thromboxane receptor mRNA. Circulation **97**, 589-595, 1998

### Veröffentlichungen in Zusammenhang mit dieser Arbeit

# Poster auf wissenschaftlichen Tagungen

- 64. Jahrestagung der DGK, 15. 18. Oktober 1998 in Mannheim: Trapidil hemmt die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen über einen Protein-Kinase A-mediierten Mechanismus (Bönisch D, Wittpoth M, Osinski MT, Weber A-A, Schrör K)
- 65. Jahrestagung der DGK, 8. 10. April 1999 in Mannheim: Komplexe Wechselwirkungen stimulatorischer und inhibitorischer Mechanismen determinieren die PDGF-induzierte Mitogenese glatter Gefäßmuskelzellen (Osinski MT, Weber A-A, Schrör K)
- 27<sup>th</sup> Congress International Society for Thrombosis & Haemostasis, 14. 21. August 1999 in Washington, DC: Separation of protein kinase A activation of smooth muscle cells by selective inhibitors of phosphodiesterase 3 and 4 (Schrör K, Osinski MT)
- 1<sup>st</sup> European Meeting of Vascular Biology and Medicine, 29. September − 1. Oktober 1999 in Nürnberg: Antimitogenic actions of sildenafil and organic nitrates via activation of protein kinase A following inhibition of cGMP-inhibited phosphodiesterase (Osinski MT, Schrör K)

DPhG Jahrestagung, 6. – 9. Oktober 1999 in Frankfurt/Main: Antimitogenic actions of sildenafil and organic nitrates via activation of protein kinase A following inhibition of phosphodiesterase 3 (Osinski MT, Schrör K)

### Vorträge auf wissenschaftlichen Tagungen

- 40. Frühjahrstagung der DGPT, 9. 11. März 1999 in Mainz: Trapidil mediates its antimitogenic effect by direct activation of protein kinase isoform II (Osinski MT, Schrör K)
- 65. Jahrestagung der DGK, 8. 10. April 1999 in Mannheim: Phosphodiesterase 3-Inhibitoren hemmen die Mitogenese koronarer Gefäßmuskelzellen Evidenz für eine Kompartimentierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges (Osinski MT, Weber A-A, Schrör K)

Doktorandentagung der DPhG, 11. – 13. März in Freiburg: Antimitogenic action of the triazolopyrimidine trapidil is mediated by direct activation of protein kinase A, isoform II (Osinski MT, Schrör K)

2<sup>nd</sup> European Congress of Pharmacology, 3. – 7. Juli 1999 in Budapest: Antimitogenic actions of Trapidil are mediated by activation of the binding site B of PKA isoform II (Osinski MT, Weber A-A, Schrör K)

5. Knechtstedener Tage für Vaskuläre Biologie, 31. Mai – 2. Juni in Knechsteden: Antimitogene Wirkung von PDE-Inhibitoren (Osinski MT, Weber A-A)

### *Kurzartikel* (Abstracts)

Bönisch D, Wittpoth M, Osinski MT, Weber A-A, Schrör K: Trapidil hemmt die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen über einen Protein-Kinase A-mediierten Mechanismus. Z Kardiol, 1998, **87** (Suppl 1), 1058

Osinski MT, Schrör K: Trapidil mediates its antimitogenic effect by direct activation of protein kinase isoform II. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1999, **359** (3), 240

Osinski MT, Schrör K: Trapidil mediates its antimitogenic effect by direct activation of protein kinase isoform II. Arch Pharm Pharm Med Chem, 1999, **331** (Suppl 1), 24

Osinski MT, Weber A-A, Schrör K: Phosphodiesterase 3-Inhibitoren hemmen die Mitogenese koronarer Gefäßmuskelzellen – Evidenz für eine Kompartimentierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges. Z Kardiol, 1999, **88** (Suppl 1), 479

Osinski MT, Weber A-A, Schrör K: Komplexe Wechselwirkungen stimulatorischer und inhibitorischer Mechanismen determinieren die PDGF-induzierte Mitogenese glatter Gefäßmuskelzellen. Z Kardiol, 1999, **88** (Suppl 1), 773

Osinski MT, Weber A-A, Schrör K: Antimitogenic actions of Trapidil are mediated by activation of the binding site B of PKA isoform II. Fundam Clin Pharmacol, 1999, **13** (Suppl. 1), 412

Schrör K, Osinski MT: Separation of protein kinase A activation of smooth muscle cells by selective inhibitors of phosphodiesterase 3 and 4. 1999, **82**, 245

Osinski MT, Schrör K: Antimitogenic actions of sildenafil and organic nitrates via activation of protein kinase A following inhibition of cGMP-inhibited phosphodiesterase. Basic Res Cardiol, 1999, **94** (5), 278

Osinski MT, Schrör K: Antimitogenic actions of sildenafil and organic nitrates via activation of protein kinase A following inhibition of phosphodiesterase 3. Arch Pharm Pharm Med Chem, 1999, **332** (Suppl 2), 87

#### Artikel in Fachzeitschriften

Bönisch D, Wittpoth M, Weber A-A, Osinski MT, Schrör K: Antimitogenic actions of trapidil in coronary smooth muscle cells by direct activation of protein kinase A. Mol Pharmacol, 1998, **54**, 241 – 248

Osinski MT, Weber A-A, Schrör K: Complex actions of protein kinase A inhibitors on mitogenesis of bovine coronary artery smooth muscle cells. Eur J Pharmacol, 2000, **395**, 173-176

Osinski MT, Schrör K: Inhibition of platelet-derived growth factor-induced mitogenesis by phosphodiesterase 3 inhibitors. Biochem Pharmacol, 2000, **60**, 381-387

Osinski MT, Kojda G: Bedeutung von Stickstoffmonoxid für den Gefäßschutz. Apothekenmagazin 18, 20-23

Osinski MT, Rauch B, Schrör K: Activation of protein kinase A by sildenafil and nitric oxide donors in coronary artery smooth muscle cells (in Vorbereitung)

Osinski MT, Schrör K: Activation of protein kinase A isoform II determines antimitogenic actions in coronary artery smooth muscle cells (in Vorbereitung)

### **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör für den Arbeitsplatz an dem von ihm geleiteten Institut sowie für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Für die Arbeit selber und die Veröffentlichung von Teilergebnissen im Rahmen wissenschaftlicher Tagungen und in Fachzeitschriften habe ich von ihm großzügige Betreuung und Unterstützung erfahren.

Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei Herrn Dr. Artur-Aron Weber möchte ich mich für seine umfassende Hilfe und zahlreiche weiterführende Anregungen und Diskussionen bedanken.

Frau Erika Lohmann und Frau Karin Montag danke ich die freundliche und stets hilfsbereite Unterstützung bei allen organisatorischen und sonstigen Problemen.

Bei Frau Sabine Menzel möchte ich mich für die wertvolle Unterstützung in der Zellkultur und bei anderen Labortätigkeiten bedanken.

Frau Dr. Marina Braun danke ich für die Bereitstellung humaner Gefäßmuskelzellen.

Herrn PD Dr. Friedrich Herberg (Bochum) und seinen Mitarbeitern danke ich für seine großzügige Unterstützung bei den Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Trapidil.

Dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Walter (Würzburg) für die Überlassung isolierter PKA und PKG.

Herrn Dr. Thomas (Rodleben) danke ich für die Bereitstellung der Trapidil-Derivate.

Allen meinen Kollegen danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft, anregenden Diskussionen und vor allem auch für die freundliche Atmosphäre am Institut.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meiner Freundin Isabel für ihre Anteilnahme und Unterstützung.

# Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, daß ich die vorliegende Doktorschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe, und das diese Doktorschrift an keiner anderen Fakultät eingereicht worden ist.

Düsseldorf, den 19.09.2000

Michael Osinski

# **Lebenslauf**

# Michael Thomas Osinski

Geboren am 26.02.1971 in Oberhausen

08/ 1977 - 07/ 1982	Grundschule in Essen
09/ 1981 - 05/ 1990	Bischöfliches Gymnasium am Stoppenberg in Essen
05/ 1990	Abitur
Wehrdienst	
08/1990 – 07/1991	Wehrdienst als Sanitäter in Giebelstadt und Essen
<u>Studium</u>	
10/ 1991 - 04/ 1997	Pharmaziestudium an der Heinrich-Heine-Universität in
	Düsseldorf
03/ 1994	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
04/ 1996	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
04/ 1996 - 10/ 1996	Erste Hälfte des Praktischen Jahres in der Oberkasseler
	Apotheke in Düsseldorf
11/ 1996 - 04/ 1997	Zweite Hälfte des Praktischen Jahres in der toxikologischen
	Abteilung der Bayer AG in Wuppertal, Abschlußarbeit mit dem
	Thema "Methoden zur Erfassung von Redox-cycling in
	Mitochondrien, submitochondralen Partikeln und Zellen"
05/ 1997	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
06/ 1997	Approbation als Apotheker
06/ 1997 - 06/2000	Promotionsstudium am Institut für Pharmakologie und Klinische
	Pharmakologie der Universität Düsseldorf, Weiterbildung zum
	Fachapotheker für Arzneimittelinformation
07/2000 - 08/2000	Marketing-Trainee bei Bayer-India in Thane/Indien