

**Genexpressions-Analysen mit Iloprost an humanen glatten
Gefäßmuskelzellen**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Svenja Debey

aus Solingen

Düsseldorf 2002

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

Referent: Prof. Dr. K. Schrör

Koreferent: Prof. Dr. U. Rütter

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2002

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
CRE	cAMP responsive element
CREB	cAMP responsive element binding protein
CREM	cAMP responsive element modulator
Ct	Cycle treshold
CTGF	connective tissue growth factor
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
CYR61	cystein-rich protein 61
DAG	1,2-Diacylglycerol
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-desoxy-Ribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
h	Stunden
HA	Hyaluronsäure
HAS-2	Hyaluronsäure-Synthase-2
HBSS	Hanks' Salzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure

hEZF	human epithelial / endothelial zinc finger protein
hSMC	humane glatte Gefäßmuskelzellen
ICER	inducible cAMP early repressor
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP-R	Prostacyclin-Rezeptor
IVT	in vitro Transkription
kDa	kilo Dalton
Kon	Kontrolle
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
min	Minuten
MKP-1	MAPK-Phosphatase-1
mM	Millimolar (mmol / l)
μM	Mikromolar (μmol / l)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nm	nano Meter
NO	Stickstoffmonoxid
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PAI-1	Plasminogen-Aktivator Inhibitor 1
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF-BB	Platelet derived growth factor, B-Ketten Homodimer
PG	Prostaglandin
PGI ₂	Prostacyclin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-myristate13-acetat
PVDF	Polyvenylidene Difluoride Membran
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunden

SAPF	Streptavidin-Phycoerythrin
SDS	Na ⁺ -Dodecylsulfat
SMC	glatte Gefäßmuskelzellen
STC	Stanniocalcin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
UV	Ultra Violett
VEGF	vascular endothelial growth factor

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	BIOSYNTHESE DER EIKOSANOIDE	1
1.2	DIE CYCLOOXYGENASE-1 (COX-1).....	2
1.3	DIE CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2).....	3
1.4	STRUKTUR DER CYCLOOXYGENASE-1 UND -2 PROTEINE	5
1.5	WIRKUNG VON PROSTAGLANDINEN.....	6
1.5.1	Prostacyclin und Prostacyclin-Rezeptor	7
1.5.1.1	Vorkommen und Wirkung.....	7
1.5.1.2	Molekularbiologie des Prostacyclin-Rezeptors	8
1.5.1.3	Signaltransduktion des Prostacyclin-Rezeptors.....	10
1.5.1.4	Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	12
1.6	HINTERGRUND.....	13
1.6.1	Die Atherosklerose.....	14
1.6.2	Bedeutung der Cyclooxygenasen.....	15
1.7	ZUSAMMENFASSUNG UND ZIEL DER ARBEIT	18
2	MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1	PUFFER UND LÖSUNGEN.....	19
2.2	ZELLKULTUR	20
2.2.1	Kultur glatter Gefäßmuskelzellen des Menschen	21
2.2.2	Stimulation von hSMC für Versuche.....	21
2.3	ÜBERSICHT ÜBER DIE ARRAY-ANALYSE.....	21
2.4	PRÄPARATION UND ANALYSE VON RNA	23
2.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen.....	23
2.4.2	Quantifizierung von RNA.....	23
2.4.3	Auftrennung von RNA in Agarose-Gelen	23
2.4.4	Ethanol-Präzipitation	24
2.4.5	Aufreinigung von RNA mit RNeasy Spin Columns	24
2.5	CDNA-SYNTHESE.....	24
2.5.1	Aufreinigung von cDNA.....	25
2.6	SYNTHESE VON BIOTIN-MARKIERTER cRNA (IN-VITRO TRANSKRITION)	25
2.7	cRNA-FRAGMENTIERUNG	26
2.8	HYBRIDISIERUNG VON ARRAYS	26
2.9	WASCHEN, FÄRBen UND SCANNEN DER ARRAYS.....	27
2.10	AUSWERTUNG VON ARRAY-EXPERIMENTEN	28
2.10.1	Expressions-Analyse der Einzelexperimente.....	28
2.10.2	Vergleichende Expressions-Analyse	30

2.11	REVERSE TRANSKRIPTASE-POLYMERASE-KETTENREAKTION (RT-PCR)	31
2.11.1	RT-PCR mit Ready-To-Go™ RT-PCR Beads	31
2.11.2	RT-PCR mit Qiagen® One-Step RT-PCR Kit	32
2.12	DENSITOMETRISCHE AUSWERTUNG VON RT-PCRS	33
2.13	PCR-AMPLIFIKATION	34
2.14	REAL-TIME PCR.....	34
2.14.1	cDNA-Synthese für die Real-Time PCR.....	34
2.14.2	Real-Time PCR.....	34
2.15	PRÄPARATION UND ANALYSE VON DNA.....	35
2.15.1	Auftrennung von DNA in nativen Agarose-Gelen	35
2.15.2	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	35
2.15.3	Restriktion von DNA.....	36
2.15.4	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA.....	36
2.15.5	Transformationen von Escherichia coli (E.coli).....	36
2.15.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	37
2.15.6.1	Alkalische Lyse ("Mini-Präparation").....	37
2.15.6.2	Qiagen ("Midi-Präparation").....	37
2.15.7	Sequenzierung von DNA.....	37
2.16	PRÄPARATION UND ANALYSE VON PROTEINEN	38
2.16.1	Analyse von Proteinen durch Western Blot.....	38
2.16.1.1	Isolierung von Proteinen aus Säugetierzellen.....	38
2.16.1.2	Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE).....	38
2.16.1.3	Transfer von Proteinen	38
2.16.1.4	Hybridisierung und Detektion von Proteinen.....	38
2.16.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	39
2.17	BESTIMMUNG VON CYCLO-ADENOSINMONOPHOSPHAT (cAMP-ASSAY).....	39
2.17.1	Desensibilisierungsversuche	40
2.18	BESTIMMUNG VON 6-KETO-PGF _{1α}	40
2.19	STATISTIK.....	40
3	ERGEBNISSE.....	41
3.1	REGULATION DER COX-2 IN HUMANEN GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN.....	41
3.1.1	Induktion der COX-2 mRNA.....	41
3.1.2	Induktion von COX-2 Protein und PGI ₂ -Synthese	44
3.1.3	Untersuchungen zum Mechanismus der COX-2 Induktion	47
3.1.3.1	Untersuchungen zum cAMP / PKA Signaltransduktionsweg	47
3.1.3.2	Nachweis funktioneller Prostaglandin-Rezeptoren auf hSMC.....	50
3.1.3.3	Untersuchungen zum Gq / PKC Signaltransduktionsweg.....	51

3.1.3.4	Untersuchungen zur Desensibilisierung des IP-Rezeptors.....	52
3.1.3.5	Untersuchungen zur Regulation des Transkriptions-Repressors Inducible cAMP Early Repressor (ICER)	55
3.2	GENEXPRESSIONS-ANALYSEN MIT ILOPROST AN HSMC	56
3.2.1	Genexpressions-Analysen der Einzelexperimente.....	56
3.2.2	Vergleichende Genexpressions-Analyse.....	57
3.2.3	Überprüfung und Verifizierung der Array Daten mittels RT-PCR Analyse.....	62
3.2.3.1	Cystein rich angiogenic Protein (CYR61).....	62
3.2.3.1.1	Herabregulation der CYR61 mRNA Expression durch Iloprost	63
3.2.3.1.2	Untersuchungen zum Mechanismus der Herabregulation der CYR61 mRNA Expression durch Iloprost.....	65
3.2.3.1.3	Effekt von Thrombin auf die CYR61 mRNA Expression	66
3.2.3.1.4	Effekt von Iloprost auf die Thrombin-induzierte CYR61 mRNA Expression	67
3.2.3.2	Plasminogen Activator-Inhibitor I (PAI-1)	69
3.2.3.3	Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1).....	70
3.2.3.4	MAP-Kinase Phosphatase-1 (MKP-1)	71
3.2.3.5	Human epithelial / endothelial zinc finger transcription factor (hEZF)	72
3.2.3.6	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	74
3.2.3.7	Hyaluronsäure-Synthase 2 (HAS-2).....	75
3.2.3.8	Stanniocalcin (STC)	76
4	DISKUSSION.....	78
4.1	REGULATION DER COX-2 IN HUMANEN SMC	78
4.1.1	Regulation der COX-2 Expression durch Iloprost und PMA	78
4.1.2	Untersuchungen zum Mechanismus der COX-2 Induktion durch Iloprost.....	83
4.2	GENEXPRESSIONS-ANALYSEN MIT ILOPROST AN HSMC	86
4.2.1	Extrazelluläre Matrix	86
4.2.2	Immunsystem / Chemokine	89
4.2.3	Wachstumsfaktoren / Hormone / Hämostase	90
4.2.4	Phosphatasen / Transkriptionsfaktoren	92
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	95
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	96
7	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	111
8	DANKSAGUNG	113
9	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	114

10 LEBENSLAUF.....115

1 EINLEITUNG

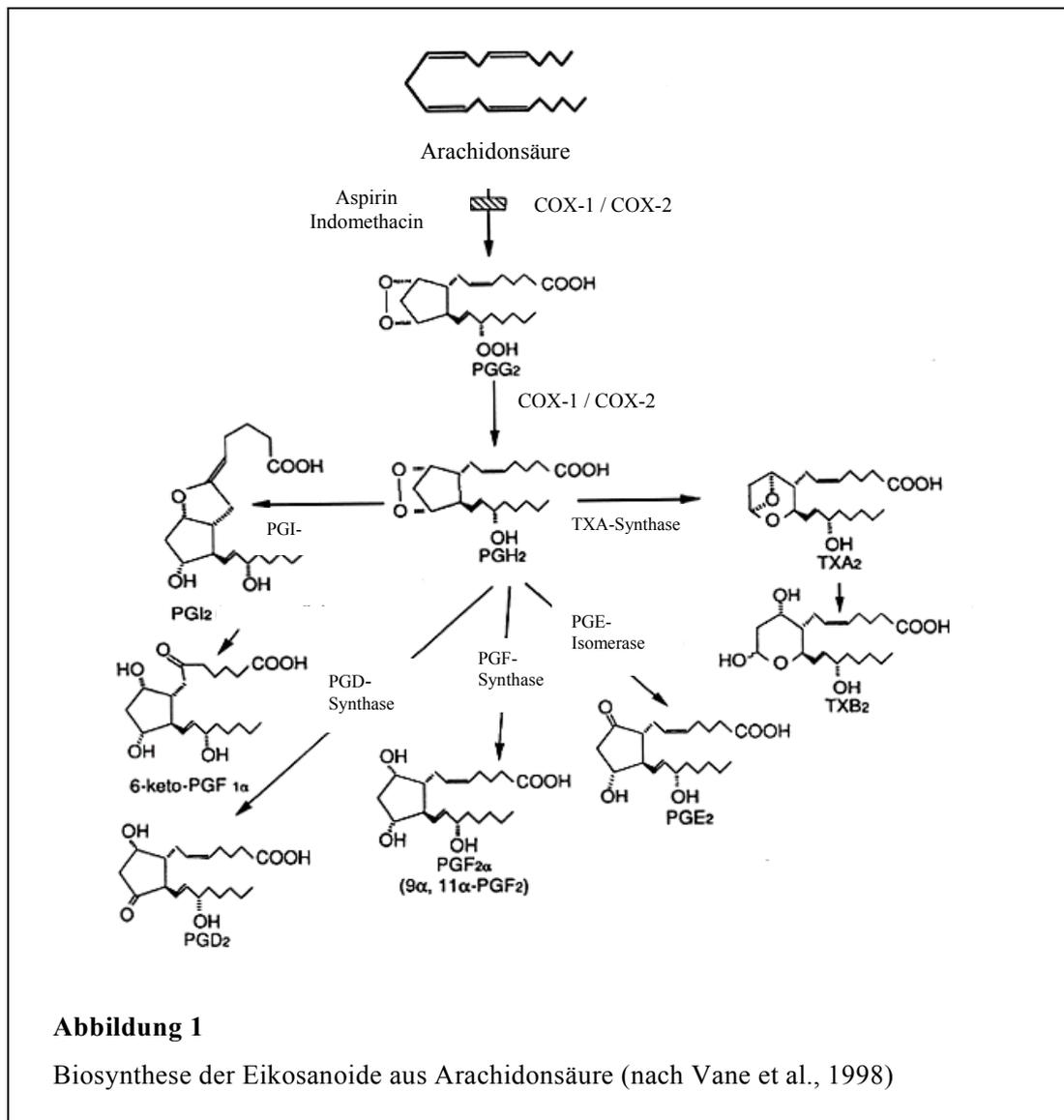
1.1 Biosynthese der Eikosanoide

Thromboxan und Prostaglandine gehören zur Stoffklasse der Eikosanoide (griech. eikosa = zwanzig). Diese lokal wirksamen Gewebshormone werden aus mehrfach ungesättigten C₂₀-Fettsäuren, hauptsächlich der Arachidonsäure (5,8,11,14-Eikosatetraensäure), synthetisiert.

Die Biosynthese von Thromboxan und Prostaglandinen erfolgt als Antwort auf verschiedene physiologische (Hormone, Wachstumsfaktoren; Smith 1989) oder pathologische (Endotoxine, Entzündungsprozesse, Gewebeschädigungen; Needleman, 1986) Stimuli. Durch die Acylhydrolase Phospholipase A₂ wird die Arachidonsäure aus Phospholipiden der Zellmembran (Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin; Smith, 1989) freigesetzt und über den Cyclooxygenaseweg zu Prostaglandinen und Thromboxan A₂ metabolisiert (Abb. 1).

Das Schlüsselenzym der Prostaglandin-Biosynthese ist die Cyclooxygenase (COX) oder Prostaglandin H Synthase (PGHS). Es ist ein bifunktionelles Enzym, welches die ersten beiden Schritte in der Umwandlung der Arachidonsäure zu den Prostaglandinen katalysiert. Im ersten Schritt (Cyclooxygenase-Reaktion) wird die Arachidonsäure unter Verbrauch von 2 Molekülen Sauerstoff zu Prostaglandin G₂ (PGG₂) oxidiert. Im zweiten Schritt (Peroxidase-Reaktion) wird PGG₂ durch 2 Elektronen zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) reduziert. PGH₂ wird schließlich durch gewebsspezifische Synthasen in die biologisch aktiven Endprodukte PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂ (Prostacyclin) oder Thromboxan (TXA₂) umgewandelt (siehe Abb. 1).

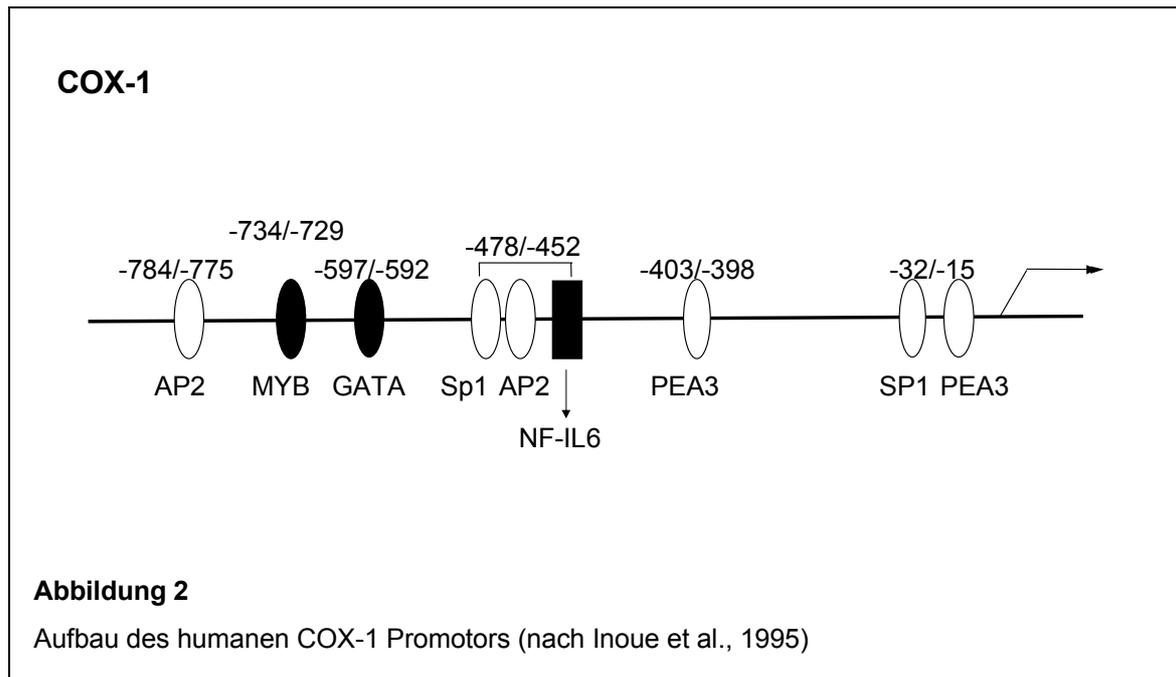
Für die Cyclooxygenase sind zwei Isoformen beschrieben, welche als COX-1 und COX-2 bezeichnet werden. Beide Enzyme katalysieren die gleiche Reaktion, zeigen eine ca. 60% ige Homologie in ihrer Proteinstruktur (siehe 1.4), werden jedoch unterschiedlich reguliert und haben verschiedene biologische Funktionen (siehe 1.2 und 1.3).



1.2 Die Cyclooxygenase-1 (COX-1)

Die COX-1 wurde zuerst in Vesikeln der Schafssamenblase nachgewiesen und 1988 kloniert (DeWitt und Smith, 1988). Das COX-1 Gen ist beim Menschen auf Chromosom 9 lokalisiert. Es besitzt eine Größe von 22 kb mit 11 Exons und 10 Introns. Das Transkript hat eine Länge von 2.8 kb (Krämer et al., 1992). Der Promotor des COX-1 Gens besitzt keine TATA-Box (Abb. 2) was ein typisches Merkmal für konstitutiv exprimierte Gene ist, weist aber verschiedene Transkriptionsfaktor-Bindestellen auf (Kraemer et al., 1992; Xu et al., 1997). Es wurden zwei Sp-1 (stimulating protein 1)- Bindestellen identifiziert, die an der Regulation der konstitutiven COX-1 Expression beteiligt sind. COX-1 mRNA und Protein (72 kDa) werden unter normalen physiologischen Bedingungen in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert.

Als sog. „Housekeeping“-Isoenzym ist es für die Produktion verschiedener Prostaglandine verantwortlich, die z.B. die Regulation der lokalen Durchblutung in Niere und Blutgefäßen, die Regulation der Thrombozytenfunktion, sowie die Zytrotektion der Magenschleimhaut vermitteln (Otto und Smith, 1995). Die COX-1 Expression kann aber auch z.B. bei der Differenzierung von Monozyten in Makrophagen (Smith et al., 1993), oder durch Scher-Stress in Endothelzellen (Okahara et al., 1998) leicht (1.4 fach) induziert werden.

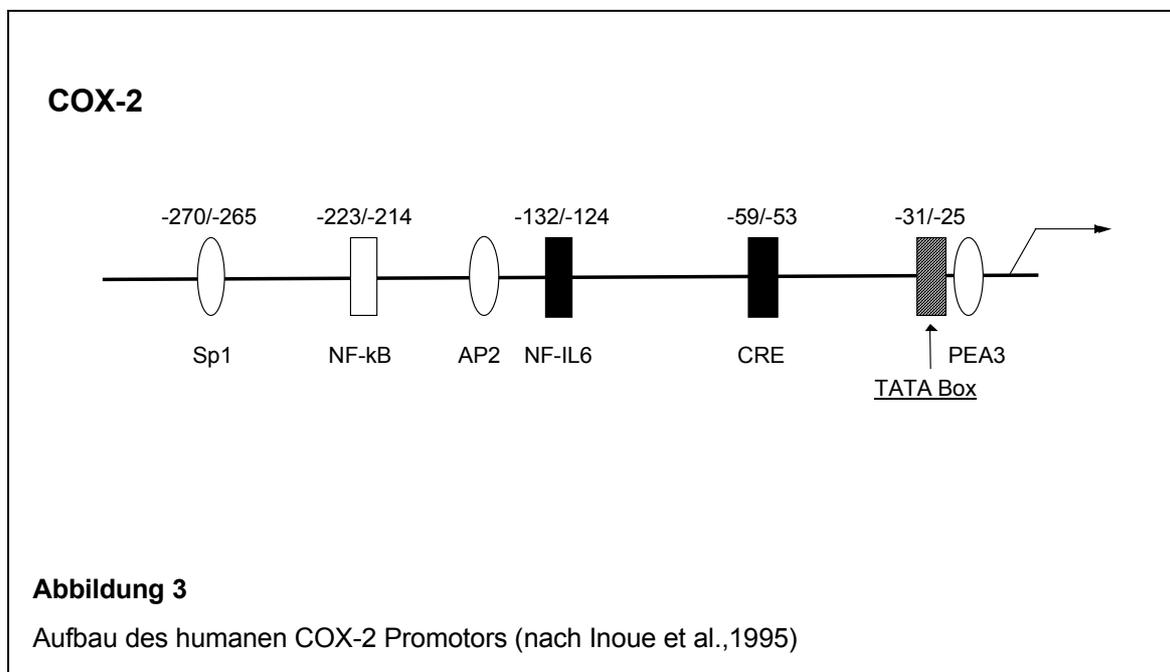


1.3 Die Cyclooxygenase-2 (COX-2)

Das COX-2 Gen ist beim Menschen auf Chromosom 1 lokalisiert und besitzt eine Größe von 8.3 kb (Fletcher et al., 1992), welches zu einer 4.5 kb mRNA transkribiert wird. Es weist eine ähnliche Exon / Intron-Struktur wie das COX-1 Gen auf, ausser das im COX-2 Gen die ersten beiden Exons zu einem Exon vereinigt sind. Der Promotor des COX-2 Gens weist im Gegensatz zum COX-1 Gen eine TATA-Box auf (Kosaka et al., 1994). Diese und die geringe Größe des COX-2 Gens sind ein typisches Merkmal für sogenannte „immediate early genes“ (Hershman, 1991). Unter normalen Bedingungen wird die COX-2 in den meisten Geweben nicht, oder nur in geringem Maße exprimiert. Die Expression des COX-2 Gens kann z.B. durch Wachstumsfaktoren (DeWitt und Meade, 1993), Serum (O’Banion et al., 1992), Endotoxine (Lee et al., 1992), inflammatorische Zytokine (Ristimäki, 1994) und Phorbol ester (Kujubu et al., 1991) stark induziert werden. Dementsprechend besitzt der COX-2 Promotor

zahlreiche Transkriptionsfaktor-Bindestellen wie z.B. CRE (cAMP responsive element), NF- κ B (nuclear factor- κ B), Sp1 (stimulating protein 1) und NF-IL6 (nuclear factor of interleukin-6), über die eine Induktion der COX-2 erfolgen kann (Abb. 3). Aufgrund der Induzierbarkeit durch mitogene- und inflammatorische Reize, spielt die COX-2 vor allem eine wichtige Rolle bei der Mitogenese und in entzündlichen Prozessen (Hershman, 1994). Neben der Induktion der COX-2 ist auch eine konstitutive Expression in verschiedenen Geweben nachgewiesen worden. So wird z.B. unter physiologischen Bedingungen COX-2 mRNA und -Protein in Magen (Zimmermann et al., 1998), Niere (Kornhoff et al., 1997), Plazenta (Macchia et al., 1997) und Zentralnervensystem (Breder et al., 1995) exprimiert, wo sie eine Rolle bei der physiologischen Funktion dieser Organe zu spielen scheint.

In den letzten Jahren wurde vermehrt auch eine Regulation der COX-2 durch Prostaglandine beschrieben. So induziert PGE₂ z.B. die COX-2 Expression in Mesangiumzellen der Ratte (Nüsing et al., 1996) und in Keratinozyten der Maus (Maldve et al., 2000), oder potenziert die LPS-induzierte COX-2 Expression in Makrophagen der Maus (Hinz et al., 2000a) und in humanen Monozyten (Hinz et al., 2000b), was auf einen regulatorischen Rückkopplungs-Mechanismus hinweist.



Die Expression der COX-2 wird nicht nur auf transkriptioneller Ebene, sondern auch durch posttranskriptionelle Mechanismen reguliert. So weist die COX-2 mRNA in ihrer 3'-untranslatierten Region zahlreiche Instabilitätssequenzen (AUUUA-Sequenzen) auf, über die eine schnelle Degradation des Transkriptes vermittelt wird (Ristimäki et al., 1994). Das COX-2 Protein, weist wie die COX-2 mRNA, eine kurze Halbwertszeit von ca. 30 min auf (DeWitt und Meade, 1993; Evett et al., 1993). Die Instabilität von COX-2 mRNA und – Protein, sowie die kurze Zeit der transkriptionellen Aktivierung des COX-2 Gens führen in kultivierten Zellen zu einer transienten Expression des COX-2 Proteins (Kraemer et al., 1994).

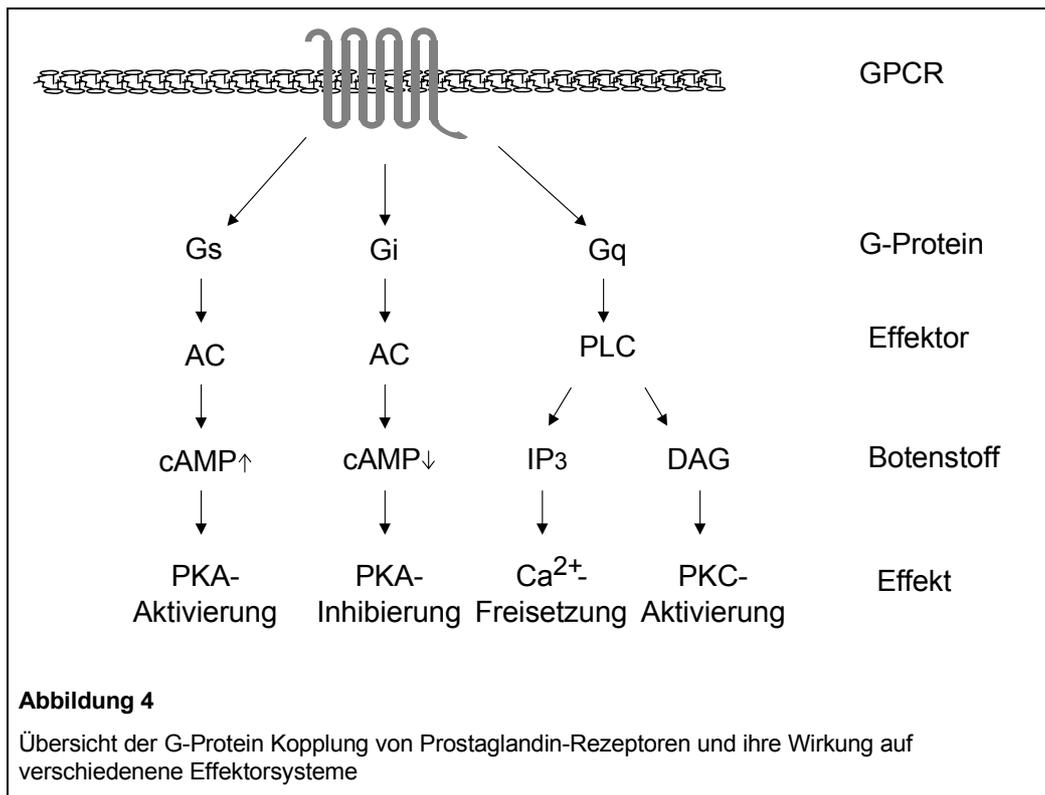
1.4 Struktur der Cyclooxygenase-1 und -2 Proteine

COX-1 und COX-2 sind homodimere, Membran-assoziierte, glycosylierte Häm-Proteine, die sich in Struktur und katalytischer Aktivität sehr ähnlich sind. Die Proteine sind vor allem auf der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER), sowie an der Zellkern-Membran lokalisiert (Spencer et al., 1998). In ihrem Aminosäure-Aufbau weisen sie eine Homologie von 63% auf. Beide Isoformen haben ein Molekulargewicht von ca. 72 kDa und bestehen aus 3 Domänen: der amino-terminalen EGF (epidermal growth factor) Domäne, der carboxyl-terminalen katalytischen Domäne und den helikalen Membranbindungsdomänen. Die Membran-Bindung erfolgt nicht durch typische Transmembran-Domänen, sondern wird durch hydrophobe α -Helices vermittelt, die sich nur in einer Schicht des Lipid-Bilayers verzahnen (Picot et al., 1994). Die katalytische Domäne umfasst die katalytischen Zentren der Cyclooxygenase und der Peroxidase. Sie hat die Form eines Kanals, der mit hydrophoben Aminosäure-Resten ausgekleidet ist, und in das Zentrum des Enzyms mündet. In beiden Isoformen sind die für die Katalyse der Prostaglandin-Synthese notwendigen Aminosäuren hoch konserviert. Die biosynthetische Aktivität beider Isoformen kann durch nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs) wie Aspirin und Indomethacin gehemmt werden, wobei eine höhere Präferenz für die COX-1 besteht. Die Inhibition durch Aspirin beruht dabei auf einer irreversiblen Acetylierung der Cyclooxygenase-Untereinheit der PGH-Synthase. Die Acetylierung erfolgt an einem Serinrest (Ser-530) und beeinflusst durch sterische Behinderung die Bindung der Arachidonsäure. Die Peroxidase-Aktivität des Enzyms bleibt dabei unbeeinflusst. Andere NSAIDs verursachen eine reversible Inhibition des Enzyms, indem sie mit dem Substrat um die Bindung an einen Tyrosinrest (Tyr-385) im aktiven Zentrum konkurrieren (kompetitive Inhibition).

Trotz der Ähnlichkeit der beiden Isoenzyme gibt es strukturelle und biochemische Unterschiede. So besitzt die COX-2 im aktiven Zentrum an Position 523 einen Valin-Rest (Val), im Gegensatz zu einem Isoleucin-Rest (Ile) im aktiven Zentrum der COX-1. Dadurch ist das aktive Zentrum der COX-2 größer, als das der COX-1 und ermöglicht somit die Bindung von selektiven COX-2 Inhibitoren in einer "Seitentasche" des Enzyms. Der Zugang zu dieser Seitentasche wird im aktiven Zentrum der COX-1 durch den größeren Isoleucin-Rest sterisch behindert. COX-2 spezifische Hemmstoffe (z.B. Celecoxib, Rofecoxib) werden für die Behandlung von Entzündungen, Fieber und Schmerzen eingesetzt. Weitere Unterschiede in der Proteinstruktur der beiden Isoenzyme befinden sich im Amino (N)- und Carboxyl (C)-Terminus. So fehlt dem COX-2 Protein am N-Terminus, eine Sequenz von 17 Aminosäuren, besitzt aber zusätzlich im C-Terminus 18 Aminosäuren, die im COX-1 Protein fehlen (Otto und Smith, 1995; Hershman, 1996). Es wird vermutet, dass die zusätzlichen Aminosäuren im C-Terminus der COX-2 am Abbau des Proteins beteiligt sind.

1.5 Wirkung von Prostaglandinen

Prostaglandine (PG) und Thromboxan A₂ haben ein breites Wirkungsspektrum, das über spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) in der Plasmamembran vermittelt wird (Abb. 4). Nach Aktivierung der Rezeptoren durch Ligandenbindung koppeln die PG-Rezeptoren an Guanin-tri-phosphat (GTP)-bindende Proteine (G-Proteine), die aus einer α -, β - und γ -Untereinheit bestehen. Nach der Bindung an den Liganden-Rezeptor-Komplex kommt es zur Dissoziation der α -Untereinheit von der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die α -Untereinheit induziert je nach Typ des G-Proteins nachfolgend die Aktivierung (stimulatorische G-Proteine; G_s-Kopplung) oder die Inhibierung (inhibitorische G-Proteine; G_i-Kopplung) von intrazellulären Effektorsystemen, wie z.B. der Adenylatzyklase (AC). G-Proteine der G_q-Familie induzieren eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC; Shenker et al., 1991). Die Effektoren wiederum produzieren die sogenannten sekundären Botenstoffe (second-messenger), wie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Ca²⁺-Ionen, Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃), welche die Aktivität bestimmter Protein-Kinasen (z.B. Proteinkinase A, Proteinkinase C) steuern und definierte zelluläre Antworten auslösen.



Die PG-Rezeptoren können im vaskulären System aufgrund ihrer Signaltransduktion in 3 Gruppen unterteilt werden: die relaxierenden Rezeptoren (IP-, DP-, EP₂ und EP₄-Rezeptoren), vermitteln einen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels über eine Gs-Kopplung und führen zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Die kontrahierenden Rezeptoren (TP-, FP- und EP₁-Rezeptoren) mediiere einen Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels durch Kopplung an Gq und induzieren die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur. Inhibitorische Rezeptoren (EP₃-Rezeptor), induzieren durch Gi-Kopplung eine Verminderung des intrazellulären cAMP-Gehalts, womit die Relaxation der Gefäßmuskulatur inhibiert wird (Narumiya et al., 1999).

1.5.1 Prostacyclin und Prostacyclin-Rezeptor

1.5.1.1 Vorkommen und Wirkung

Prostacyclin (PGI₂) ist das Hauptprodukt des Arachidonsäure-Stoffwechsels im Endothel und in glatten Gefäßmuskelzellen großer Blutgefäße (Smith, 1986). Es wird mit Hilfe der membrangebundenen Prostacyclin-Synthase (Pereira et al., 1994) aus PGH₂ gebildet (Abb. 1) und hydrolysiert bei physiologischem pH-Wert innerhalb von 3 - 5 min zu dem stabilen

Endprodukt 6-keto-PGF_{1α} (Schrör, 1984). Die Hauptwirkungen von PGI₂ sind die Inhibition der Thrombozyten-Aggregation (Weiss und Turitto, 1979), Hemmung der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen (Schrör und Weber, 1997), Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Moncada, 1976), sowie Beeinflussung des Cholesterin-Umsatzes (Willis et al., 1986). Das Prostacyclin wird als physiologischer Gegenspieler des Thromboxans angesehen, welches die Thrombozyten-Aggregation induziert und vasokonstriktorische Wirkungen auf Gefäße ausübt.

Die physiologischen Wirkungen von PGI₂ werden durch spezifische Prostacyclin-Rezeptoren (IP-R) vermittelt (Coleman et al., 1994). IP-Rezeptoren werden entsprechend ihrer physiologischen Funktion, stark auf Thrombozyten exprimiert (Schafer et al., 1979) wo sie die Inhibition der Plättchenaggregation einleiten, und auf glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert (Town et al., 1982). Eine Expression von IP-Rezeptoren wurde durch Northern-Blots in den meisten menschlichen Geweben nachgewiesen. Eine starke Expression zeigte sich in Thymus, Milz, Herz / Aorta und Lunge (Namba et al., 1994).

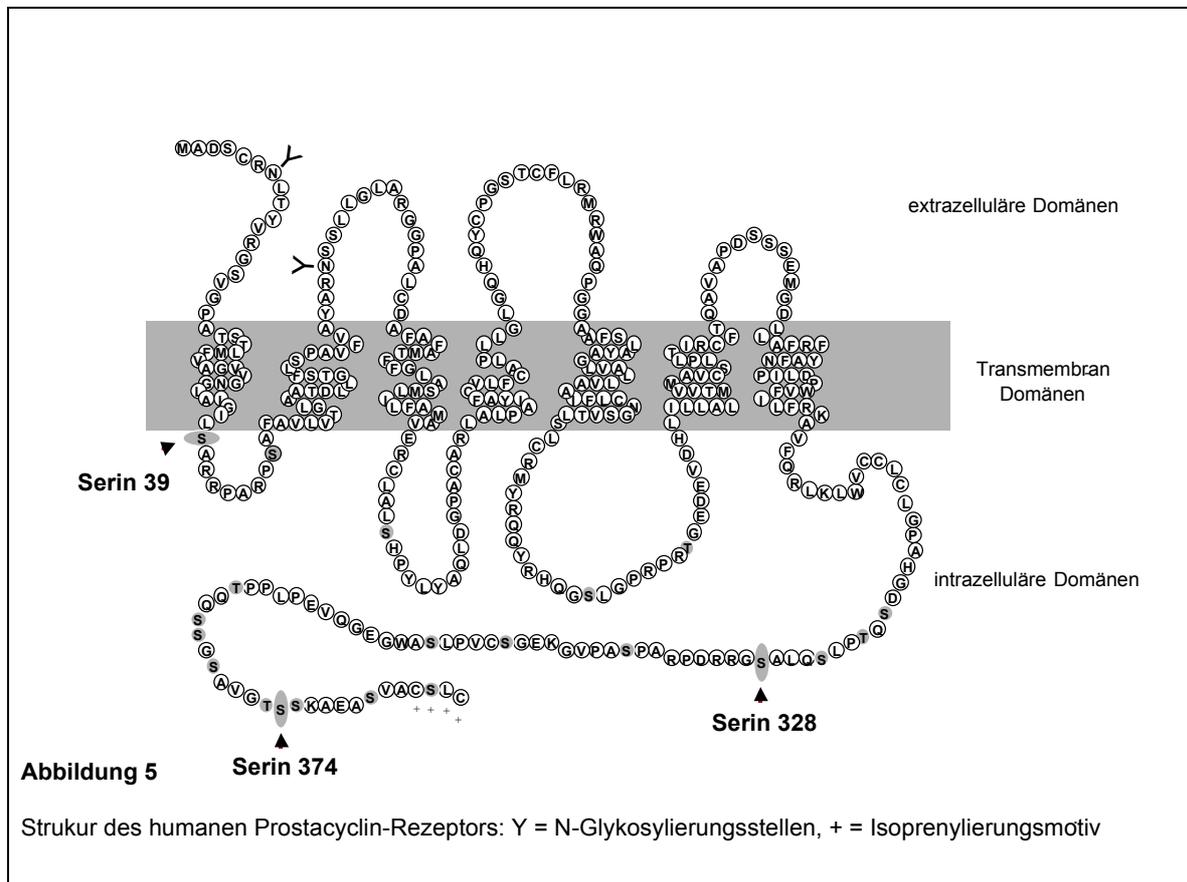
1.5.1.2 Molekularbiologie des Prostacyclin-Rezeptors

Das Gen des humanen IP-R ist auf Chromosom 19 lokalisiert und besteht aus 3 Exons und 2 Introns (Ogawa et al., 1995). Diese Exon / Intron-Struktur ist in verschiedenen Prostaglandin-Rezeptoren (z.B. DP-, EP₃-, EP₄-Rezeptoren) auch in verschiedenen Spezies, konserviert (Narumiya et al., 1999). Analysen der 5' flankierenden Region zeigten, dass der Promotor des IP-R Gens keine TATA- und keine CCAAT-Box besitzt. Als mögliche *cis*-aktivierende regulatorische Elemente sind Transkriptionsfaktor-Bindestellen für AP-1, AP-2 und Sp1 beschrieben (Ogawa et al., 1995).

Das humane IP-Rezeptor Protein besteht aus 386 Aminosäuren, mit einer molekularen Masse von ca. 46 kDa. Der Rezeptor weist die typische Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf: er besteht aus 7 hydrophoben Transmembrandomänen, mit 3 extra- und 3 intrazellulären Schleifen (Abb. 5). In der ersten intrazellulären Schleife (Serin 39), sowie im C-Terminus des IP-R (Serin 328 und 374) befinden sich 3 potentielle PKC-Phosphorylierungsstellen. Im Gegensatz zum IP-Rezeptor der Ratte und der Maus, besitzt der humane IP-Rezeptor keine PKA-Phosphorylierungsstelle (Sasaki et al., 1994; Smyth et al., 1996).

In den letzten Jahren haben verschiedene Studien zur Identifizierung der Regionen beigetragen, die an der Spezifität und Affinität der Liganden-Bindung beteiligt sind. In Untersuchungen mit chimären Proteinen aus DP- und IP-Rezeptoren der Maus fand man

heraus, dass die Bindung des Agonisten an den Rezeptor über die Transmembrandomänen I, II und VII vermittelt wird. Dabei sind die Transmembrandomänen I und II für die Erkennung und Bindung des Cyclopentanringes verantwortlich, während die Transmembrandomäne VII die Seitenketten des Agonisten erkennt (Kobayashi et al., 1997; Kobayashi et al., 2000).



Für den IP-Rezeptor sind verschiedene posttranslationale Modifikationen beschrieben, über die eine Modulation der Rezeptor-Funktion erfolgen kann. So besitzt der humane IP-Rezeptor zwei Konsensus-Stellen für Asparagin (N)-Glycosylierung, (N(7) und N(78)). Zhang et al., (2001) zeigten anhand von Mutationen, dass die Glycosylierung dieser Asparaginreste einen regulatorischen Einfluss auf die Membranlokalisierung, Liganden-Bindung und Signaltransduktion des IP-Rezeptors hat.

Eine weitere Regulation der Rezeptor-Funktion erfolgt durch Isoprenylierung des IP-Rezeptors. Der Prozess der Isoprenylierung ist eine post-translationale Lipidmodifikation von Proteinen durch C-15 Farnesyl- oder C-20 Geranylgeranyl-Isoprenoide (Zhang und Casey, 1996) und erfolgt bei Prostaglandin-Rezeptoren an konservierten Konsensus-Sequenzen

(CSLC). Für den humanen IP-Rezeptor wurde eine Isoprenylierung mit einem C-15 Farnesylrest im C-Terminus beschrieben. Eine Mutation der Konsensus-Sequenz hatte zwar keinen Einfluss auf die Ligandenbindungs-Eigenschaften, aber entkoppelte den Rezeptor von seinem G-Protein (Hayes et al., 1999).

1.5.1.3 Signaltransduktion des Prostacyclin-Rezeptors

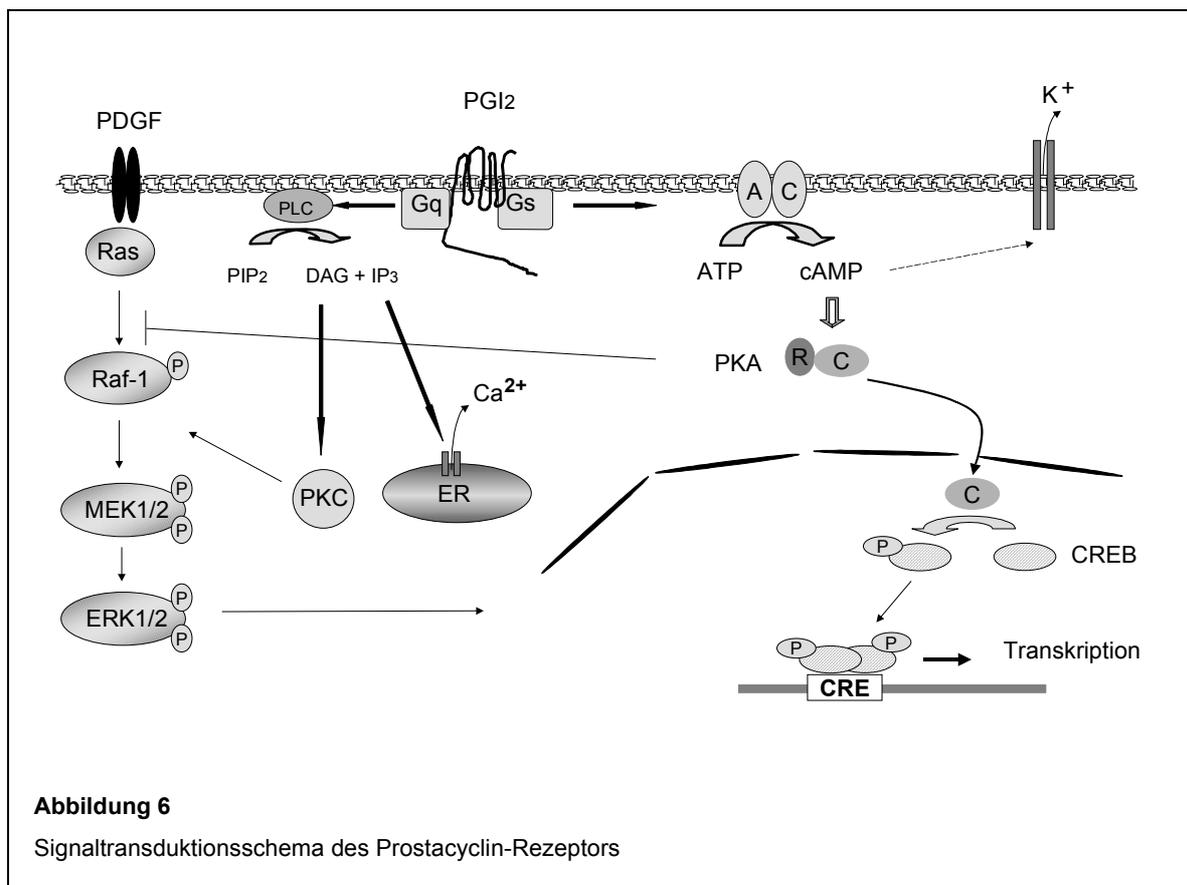
Für den IP-Rezeptor sind zwei verschiedene Signaltransduktionswege beschrieben, über die die zellulären Effekte von Prostacyclin vermittelt werden (Abb. 6): eine Gs-Protein-gekoppelte Stimulation der Adenylatzyklase (Katsuyama et al., 1994; Nakagawa et al., 1994) und eine Gq-Protein-gekoppelte Aktivierung der Phospholipase C (Schwaner et al., 1992; Oka et al., 1993).

In vaskulären Zellen erfolgt hauptsächlich eine Kopplung des IP-Rezeptors an stimulatorische G-Proteine (Gs) mit einer nachfolgenden Aktivierung der Adenylatzyklase (AC). Die Adenylatzyklase wandelt Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophat (cAMP) um. Die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt schließlich zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). Dabei kommt es zur Dissoziation des inaktiven tetrameren PKA-Komplexes in die aktiven katalytischen Untereinheiten (C) und in die beiden regulatorischen Untereinheiten (R). Die katalytischen Untereinheiten wandern in den Zell-Kern und phosphorylieren (aktivieren) dort Transkriptions-Aktivatoren wie z.B. das cAMP-responsive element binding protein (CREB). Das phosphorylierte CREB kann als Dimer an die cAMP responsive element (CRE) Region im Promotor verschiedener Gene binden und somit deren Transkription aktivieren.

Die Erhöhung der IP-Rezeptor-mediierten cAMP-Konzentration vermittelt auch die Öffnung von Kalium-Kanälen der Plasmamembran (Siegel et al., 1991). Über den Ausstrom von K^+ aus der Zelle kommt es zur Hyperpolarisation und nachfolgend zu einem verminderten Einstrom von Ca^{2+} über spannungsregulierte Ca^{2+} -Kanäle. Die verminderte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration führt schließlich zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Siegel et al., 1992).

Neben der nukleären Komponente des cAMP / PKA-Signaltransduktionwegs, ist ein "cross-talk" mit der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Kaskade beschrieben. Die Aktivierung der MAPK-Kaskade durch Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF) führt zu einer Aktivierung des kleinen GTP-bindenden Proteins Ras und nachfolgend zur Aktivierung der Raf-1 Kinase (Abb. 6). Raf-1 phosphoryliert und aktiviert die MAPK-Kinasen MEK1 und

MEK2, welche wiederum die extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1 / ERK2) phosphorylieren. Diese Signal-Kaskade, die verschiedene Vorgänge wie Genexpression und Proteinbiosynthese moduliert, sowie die Proliferation von Zellen steuert, wird durch die Aktivität der PKA gehemmt, indem die Bindung von Raf-1 an Ras blockiert wird (Wu et al., 1993; Cook und McCormick, 1993). Die Hemmung der Raf-1 Kinase wird für die antimitogene und antiproliferative Wirkung von Prostacyclin in glatten Gefäßmuskelzellen verantwortlich gemacht (Weber et al., 1998; Bornfeldt und Krebs, 1999).



Neben der Kopplung des IP-Rezeptors an Gs-Proteine ist in einigen nicht-vaskulären Zell-Linien auch eine Gq-Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC) beschrieben (Schwaner et al., 1992; Oka et al., 1993). Die PLC spaltet Phosphatidylinositol-bis-phosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). DAG aktiviert die Protein-Kinase C (PKC), welche wiederum verschiedene Zielproteine phosphorylieren kann. IP₃ bindet an IP₃-abhängige Ca²⁺-Kanäle des endoplasmatischen Retikulums (ER) und bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Dieser Mechanismus wird auch für die

vasokonstriktorisches Effekte von hohen Prostacyclin-Konzentrationen verantwortlich gemacht (Schrör und Verheggen, 1988).

1.5.1.4 Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Die Signaltransduktion über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) wird durch verschiedene Mechanismen kontrolliert. Die Regulation G-Protein-gekoppelter Membran-Rezeptoren kann sowohl auf Proteinebene (Internalisierung, Desensibilisierung) als auch auf mRNA-Ebene erfolgen (transkriptionelle Regulation), wobei entweder die Aktivität oder die Anzahl von Rezeptormolekülen beeinflusst und somit die Signalkaskade unterbrochen wird. Die Regulation des β -adrenergen Rezeptors dient dabei als Modell für viele GPCRs (Lefkowitz et al., 1998).

Bei der Desensibilisierung wird der Rezeptor nach der Ligandenbindung von seinen G-Proteinen entkoppelt, womit die Rezeptor-Funktion, nämlich Produktion von zellulären Botenstoffen, als Antwort auf andauernde Agonistenstimulation, reduziert wird (Hausdorff et al., 1989). Generell wird die Entkopplung des Rezeptors von seinen G-Proteinen durch Phosphorylierung ausgelöst.

Man unterscheidet verschiedene Arten der Desensibilisierung. Bei der Kurzzeit-Desensibilisierung kommt es innerhalb von Sekunden bis Minuten zur Dissoziation des Agonisten vom Rezeptor. Bei der Langzeit-Desensibilisierung wird der Rezeptor innerhalb von Minuten bis Stunden in intrazelluläre Kompartimente (Endosomen) internalisiert. In den Endosomen kann der Rezeptor entweder durch spezifische Phosphatasen wieder dephosphoryliert (Pitcher 1995) und anschließend wieder zur Zelloberfläche transportiert werden (Recycling), oder er wird zur "Downregulation" in Lysosomen transportiert (Koenig und Edwardson, 1997). Die "Downregulation" von Rezeptoren erfolgt häufig bei einer langfristigen Stimulation der Rezeptoren mit ihren Agonisten und beruht auf einem Abbau von Rezeptor-Proteinen und auf einer Reduzierung der Rezeptor steady-state mRNA, woraus eine verminderte Anzahl von Rezeptor-Protein resultiert (Chuang et al, 1996). Die Anzahl von aktivierbaren Rezeptoren kann nur durch eine Neusynthese wieder erhöht werden (Nilius et al., 2000).

Bei der Desensibilisierung kann man weiterhin zwischen der homologen (Agonisten-spezifischen) und der heterologen (nicht Agonisten-spezifische) Desensibilisierung unterscheiden. Bei der homologen Desensibilisierung werden die Rezeptoren von sogenannten G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinasen (GRKs; Inglese et al., 1993; Premont

et al., 1995) phosphoryliert. Die Phosphorylierung durch GRKs erfolgt dabei spezifisch nur an Agonisten-gebundenen Rezeptoren und bewirkt eine Entkopplung des Rezeptors von den G-Proteinen. An der homologen Desensibilisierung sind außerdem noch inhibitorische Proteine, sogenannte Arrestine, beteiligt, die an den phosphorylierten Rezeptor binden und eine maximale Desensibilisierung bewirken (Lohse et al., 1990). Bei der heterologen Desensibilisierung werden Rezeptoren von second-messenger-abhängigen Proteinkinasen wie PKC und PKA phosphoryliert. Die aktivierten Kinasen phosphorylieren jedoch nicht nur Agonisten-gebundene Rezeptoren, sondern auch eine Anzahl weiterer Rezeptorklassen (Chuang et al., 1996).

Für den humanen IP-Rezeptor ist eine Agonisten-abhängige Desensibilisierung beschrieben, die weder durch die PKA noch durch G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen beeinflusst wurde (Smyth et al., 2000; Nilius et al., 2000). Eine Aktivierung der PKC beschleunigte dagegen die Desensibilisierung des Rezeptors, wobei die Internalisierung unabhängig von Arrestin-Proteinen erfolgte. Für die Resensibilisierung der IP-Rezeptoren war eine Neusynthese von Rezeptor-Protein notwendig, was auf eine Agonisten-induzierte "Downregulation" schließen lässt.

1.6 Hintergrund

Die gesunde arterielle Gefäßwand besteht aus einer luminalen Schicht von Endothelzellen, mehreren Schichten von glatten Muskelzellen (SMCs), der Media, und der darunter liegenden Adventitia. Die SMCs sind unter physiologischen Bedingungen für die Elastizität und für die Kontraktion der Gefäßmuskulatur verantwortlich. Entsprechend ihrer Funktion sind SMCs mit einem kontraktilem Apparat ausgestattet (kontraktiler Typ). Dazu gehören zahlreiche Proteine des Zytoskeletts wie das smooth muscle α -Aktin (SM α -Aktin), Subtypen der Myosin "heavy chains", Desmin, Vimentin, Calponin, Caldesmon, SM 22 α und Smoothelin (Owens 1995; van der Loop et al., 1996). Bei krankhaften Veränderungen der Gefäßwand, wie der Atherosklerose, kommt es zur Dedifferenzierung der ruhenden, kontraktilem SMCs in einen proliferativen, migratorischen Typ, der große Mengen an Extrazellulärmatrix (ECM)-Proteinen synthetisieren kann (Campbell et al., 1988; Owens 1995). Die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von okklusiven Gefäßerkrankungen, wie z.B. bei der Bildung von atherosklerotischen Plaques oder Restenosen nach einer Angioplastie.

1.6.1 Die Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der arteriellen Gefäßwand, die durch lokale und systemische Risikofaktoren entsteht (Ross, 1999). Lokale Risikofaktoren sind Gabelungen, Abzweigungen und Krümmungen im Gefäßsystem, an denen der uniforme laminare "Scherstress" des Blutstromes verändert ist (Nagel et al., 1999). Die Gefäß-Bereiche, die einem turbulenten Blutstrom ausgesetzt sind, sind besonders anfällig für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen. Zu den systemischen Risikofaktoren, die zur Entwicklung der Atherosklerose beitragen, gehören erhöhte Cholesterinspiegel des Plasmas, Rauchen, fortgeschrittenes Alter, Diabetes, Übergewicht und erhöhter Blutdruck (Lefkowitz und Willerson, 2001).

Der erste Schritt in der Entstehung der Atherosklerose beinhaltet eine Dysfunktion der innersten luminalen Gefäßschicht, dem Endothel. Das gesunde Endothel bildet normalerweise eine nicht-thrombogene und nicht-adhäsive Schicht, welche zum einen den Transport von Nährstoffen in den subendothelialen Zwischenraum verhindert, und durch die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO)- und Prostacyclin den Gefäßtonus reguliert. Bei einer endothelialen Dysfunktion kommt es neben einer erhöhten Permeabilität des Endothels, zu einem Verlust der NO- und PGI₂-Produktion mit nachfolgender Expression von Adhäsionsmolekülen und damit eine erhöhte Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an die Gefäßwand. Die angelagerten Leukozyten, insbesondere Monozyten, durchwandern das Endothel und entwickeln sich im subendothelialen Zwischenraum zu Makrophagen. Durch Verdauung großer Mengen an Lipoproteinen entwickeln sich aus den Makrophagen sogenannte Schaumzellen, welche Zytokine und Chemokine produzieren. Die glatten Gefäßmuskelzellen reagieren auf die freigesetzten Zytokine und Wachstumsfaktoren mit Proliferation und dedifferenzieren in den synthetischen Typ. Die SMCs wandern aus der Media in die Intima, wo sie große Mengen von Matrixproteinen synthetisieren und proliferieren, was letztlich zu einer Gefäßverengung (Stenose) führt. Die Beseitigung dieser Gefäßstenosen erfolgt mittels Angioplastie. Bei dieser Methode werden die stenosierten Gefäße durch Einführen und Aufblasen eines Ballonkatheters dilatiert. Dabei kommt es häufig zu einer Überdehnung und Verletzung der Gefäßwand im betroffenen Bereich, mit nachfolgender Aktivierung und Anlagerung von Thrombozyten. Durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, PDGF, Serotonin und ADP, kommt es wiederum zu einer Stimulation der Migration und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen und zur Bildung einer Neointima. In 30-40 % der Fälle kommt es somit nach einer Angioplastie innerhalb von 3-6 Monaten zu einem Wiederverschluß des Gefäßes, einer sogenannten Restenose (Bailey, 2002).

Über die molekularen Mechanismen und über die Veränderung der Genexpression, die der Dedifferenzierung glatter Gefäßmuskelzellen vom kontraktile zum sekretorischen Typ zugrunde liegen, ist bisher nur wenig bekannt. Die Dedifferenzierung der glatten Muskelzellen ist z.B. mit einer Abnahme an kontraktile Proteinen, wie $SM\alpha$ -Aktin und $SM22\alpha$ begleitet (Owens, 1995). De Vries et al., (2000) zeigten an humanen glatten Muskelzellen, die mit Zytokinen als atherogenem Stimulus behandelt wurden, unter anderem eine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen (intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)), Interleukinen (granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) und Interleukin 8 (IL8)) und von Transkriptionsfaktoren (nuclear factor κ B (NF- κ B)), die an der Progression der Atherosklerose beteiligt sind.

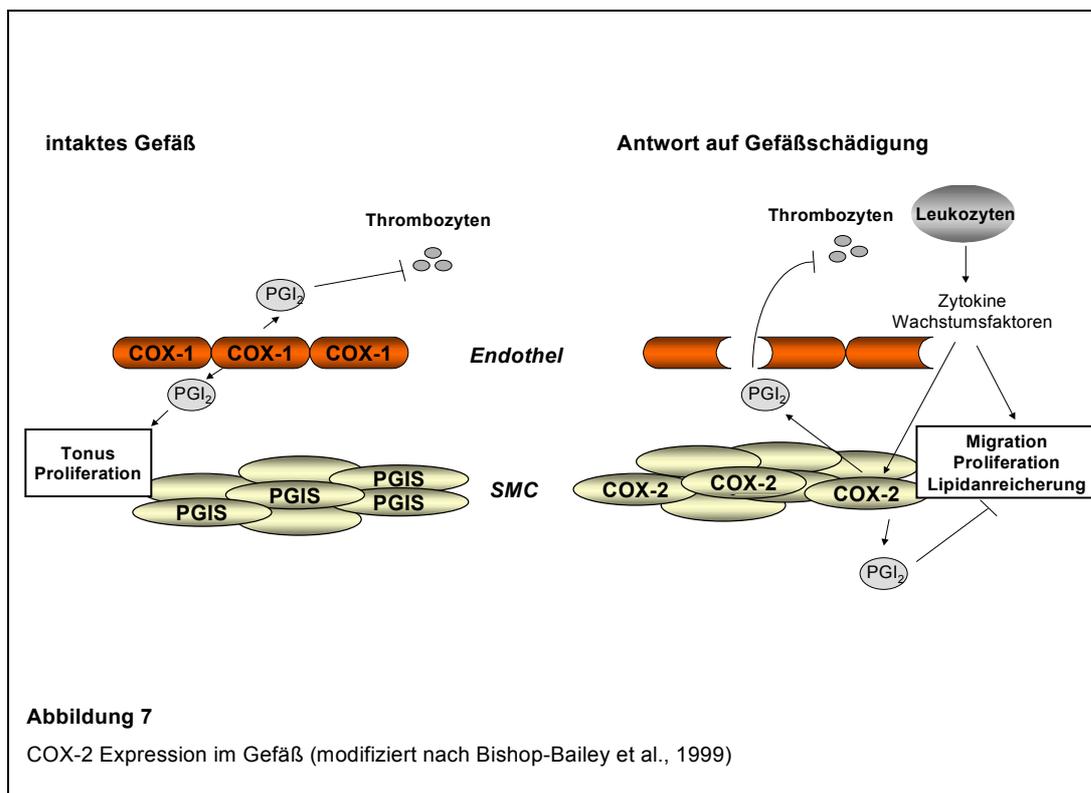
1.6.2 Bedeutung der Cyclooxygenasen

Die Cyclooxygenasen sind die geschwindigkeits-bestimmenden Enzyme in der Produktion der Prostaglandine Prostacyclin, PGE_2 und des Thromboxans, die wichtige Regulatoren der vaskulären Funktion darstellen. Unter normalen physiologischen Bedingungen regulieren COX-abhängige Vasodilatoren, vor allem das Prostacyclin, gemeinsam mit NO, den vaskulären Tonus.

Zahlreiche vaskuläre Erkrankungen wie z.B. Bluthochdruck, Präeklampsie, Ischämie und Atherosklerose, sind mit einer Störung des Prostaglandin-Stoffwechsels assoziiert, wobei es häufig zu einer überwiegenden Synthese von vasokonstriktorisches Prostaglandinen, z.B. Thromboxan kommt (Review: Davidge, 2001). Erste Hinweise auf eine verminderte Produktion von PGI_2 in atherosklerotischen Gefäßen fand man in experimentellen Studien am Kaninchen (Dembinska-Kiec et al., 1977). Später wurden ähnliche Ergebnisse auch an humanem atherosklerotischen Gefäßmaterial gezeigt (Rolland et al., 1984). Die verminderte PGI_2 -Synthese in atherosklerotischen Gefäßen ist auf einer Inaktivierung der PGI_2 -Synthase durch Nitrierung zurückzuführen (Zou et al., 1999). Die Nitrierung von Proteinen kommt durch eine starke Expression der induzierbaren NO-Synthase (NOS-2) in atherosklerotischen Gefäßen zustande. Die gesteigerte NO-Synthase kompensiert zwar die beeinträchtigte Funktion des Endothels bezüglich der Vasodilatation und Thrombozyten-Aggregation, fördert aber auch, zusammen mit Sauerstoff-Radikalen, die Bildung von Peroxinitrit wodurch schließlich die Nitrierung von Proteinen erfolgt (Buttery et al., 1996).

In gesunden Gefäßen wird PGI_2 hauptsächlich vom Endothel durch die COX-1 synthetisiert (Abb. 7). Die darunter liegenden glatten Muskelzellen weisen nur geringe COX-Aktivitäten

auf, sind aber reich an Prostacyclin-Synthase (Smith, 1986). In atherosklerotischen Gefäßen kommt es unter dem Einfluss der freigesetzten Zytokine und Wachstumsfaktoren oder nach Verletzung des Endothels z.B. nach Angioplastie, zu einer Induktion der COX-2 in den glatten Gefäßmuskelzellen (Rimarachin et al., 1994; Pritchard et al., 1994). Die gesteigerte Bildung von PGI₂ führt zu einer Aktivierung der IP-Rezeptoren. Durch die nachfolgende Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und Aktivierung des PKA-Signaltransduktionsweges, kommt es zur Hemmung der Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen und zur Hemmung der Thrombozytenaggregation (siehe 1.5.1.1). Die lokale Induktion der COX-2 mit nachfolgender Freisetzung von PGI₂ wird daher als endogener Schutzmechanismus angesehen, womit die verminderte endotheliale Bildung von PGI₂ kompensiert und proatherogenen Effekten entgegengewirkt werden kann.



Diese Hypothese wird durch weitere verschiedene Befunde unterstützt: die COX-2 Aktivität kann die proliferative Antwort glatter Muskelzellen auf eine Stimulation mit Interleukin 1 β (IL1 β) vermindern (Libby et al., 1988) und die Sekretion von GM-CSF inhibieren (Stanford et al., 2000). Weiterhin ist in verschiedenen Studien beschrieben, dass Prostacyclin-Mimetika und COX-2 abhängiges PGE₂ die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM-1

reprimieren (Braun et al., 1997; Bishop-Bailey et al., 1998). Darüber hinaus ist eine Expression der COX-2 mit einer gesteigerten Produktion von Prostacyclin in atherosklerotischen Gefäßen nachgewiesen worden (Belton et al., 2000; Schönbeck et al., 1999).

Aufgrund der protektiven Eigenschaften von Prostacyclin wurden zahlreiche therapeutische Strategien entwickelt, um die lokale Prostacyclin-Produktion oder -wirkung zu erhöhen. Zur Therapie von Gefäßrestenosen wurden z.B. chemisch stabile Prostacyclin-Mimetika wie z.B. Iloprost, Beraprost und Cicaprost eingesetzt. In Studien an Schweinen wurde durch den Einsatz von koronaren Stents, die kontinuierlich Iloprost freisetzen, eine verringerte Neointima-Bildung nachgewiesen (Alt et al., 2000). Im Kaninchen-Modell führte die Behandlung mit Beraprost nach einer Angioplastie im Vergleich zu nicht-behandelten Kontroll-Tieren zu einem größeren Gefäßdurchmesser (Isogaya et al., 1995). Desweiteren wurde in klinischen Studien durch Behandlung von Angioplastie-Patienten mit dem Prostacyclin-Mimetikum Ciprosten eine Reduktion der Restenoserate erreicht (Darius et al., 1992). Andererseits gibt es aber klinische Studien, bei denen eine intravenöse Gabe von Prostacyclin keinen Effekt auf die Restenose zeigte (Knutson et al., 1990; Gershlik et al., 1994). Darüberhinaus kommt es bei einer systemischen Gabe von Prostacyclin-Mimetika teilweise zu erheblichen Nebenwirkungen, wie Blutdruckabfall und Herzrhythmus-Störungen, so dass Prostacyclin-Mimetika nicht zur Therapie von Gefäß-Restenosen eingesetzt werden. Ein weiterer therapeutischer Ansatz zur Behandlung von Restenosen ist die Überexpression des Prostacyclin-Synthase (PGIS) Gens. In Ratten-Arterien, die durch Ballon-Dilatation verletzt wurden, konnte durch Überexpression der PGIS eine erhöhte Produktion von PGI₂ nachgewiesen werden. Die Bildung einer Neointima wurde dabei merklich inhibiert und darüberhinaus wurde die Wiederausbildung der Endothelschicht gefördert (Numaguchi et al., 1999; Todaka et al., 1999).

1.7 Zusammenfassung und Ziel der Arbeit

Die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sind kritische Vorgänge bei der Entstehung okklusiver Gefäßerkrankungen, z.B. bei der Entstehung der Atherosklerose und von Restenosen nach einer Angioplastie. Für Prostacyclin und seine chemisch stabilen Mimetika sind zahlreiche vasoprotektive Effekte wie Inhibition der Thrombozyten-Aggregation, Hemmung der Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen, sowie Beeinflussung des Cholesterol-Umsatzes beschrieben worden (Übersicht: Schrör 1997).

Die zellulären Wirkmechanismen des Prostacyclins sind gut untersucht: sie werden über spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Plasmamembran vermittelt. Im vaskulären System kommt es nach der Bindung an den IP-Rezeptor über die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu einer nachfolgenden Aktivierung des PKA-Signaltransduktionsweges, der die verschiedenen vasoprotektiven Effekte steuert. Als Grundlage wird dabei die Hemmung des MAPK-Kaskade Signaltransduktionsweges angesehen. Über eine transkriptionelle Regulation bestimmter Gene, über die die vasoprotektiven Effekte von Prostacyclin und Prostacyclin-Mimetika vermittelt werden, ist in glatten Muskelzellen bisher jedoch wenig bekannt. Eine Aufklärung der veränderten Genexpression durch Prostacyclin bzw. seinen chemisch stabilen Mimetika könnte jedoch für das Verständnis und für die Therapie vaskulärer Erkrankungen von Bedeutung sein.

Eine besondere Bedeutung spielt in diesem Zusammenhang die Regulation der Cyclooxygenase-2, da die COX-2 abhängige Synthese von PGI₂ in glatten Gefäßmuskelzellen einen wichtigen atheroprotektiven Mechanismus darstellt. Da sich in den letzten Jahren Hinweise auf einen Rückkopplungs-Mechanismus von Prostaglandinen auf die Regulation ihres eigenen Synthese-Enzyms häufen (siehe 1.3), wurde im ersten Teil der Arbeit die Regulation der Cyclooxygenase-2 in humanen glatten Muskelzellen unter dem Einfluss von Iloprost untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Iloprost-abhängige Veränderung im Expressionsmuster glatter Gefäßmuskelzellen mittels Microarray-Analyse untersucht. Mit dieser Methode kann die Veränderung der Genexpression von ca. 5800 funktionellen Genen charakterisiert werden. Ziel war es, neue Gene zu identifizieren, die für die atheroprotektiven Wirkungen von Iloprost eine Rolle spielen könnten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Tabelle 1: verwendete Puffer und Lösungen

Blot-Puffer: 1 x Laufpuffer ohne SDS 20% Methanol	
Denaturierungspuffer: 100 µl Formamid 35 µl Formaldehyd 20 µl 10 x E-Puffer 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)	10 x Laufpuffer: 250 mM Tris 1.9 mM Glycin 0.1% SDS
10 x E-Puffer: 20 mM MOPS 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA pH 7.0	4 x Laemmli-Puffer: 250 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7.0 8% SDS 40% Glycerin 20% 2-Mercaptoethanol 0.001% Bromphenolblau 100 mM Dithiothreitol (DTT)
10 x HBSS: 1.35 mM NaCl 50 mM KCl 4 mM Na ₂ HPO ₄ 4.5 mM KH ₂ PO ₄ 8 mM MgSO ₄ 40 mM NaHCO ₃ pH 7.0	LB-Medium 1 % Trypton (Pepton 140; Difco, USA) 0.5 % Hefeextrakt (Difco, USA) 0.5 % NaCl
1 x HBSS: 10 x HBSS mit: 1 mM CaCl ₂ 5.5 mM Glukose 10 mM HEPES, pH 7.8 1 mg/ml BSA	PBS: 137 mM NaCl 2.7 mM KCl 1.5 mM KH ₂ PO ₄ 8.3 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7.4
Hybridisierungspuffer 100 mM MES 1 M [Na ⁺] 20 mM EDTA 0.01 % Tween 20	P1-Puffer: 50 mM Tris/HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A pH 8.0

P2-Puffer: 0.2 M NaOH 1% SDS	10 x TAE 40 mM Tris 20 mM Na-Acetat 2 mM EDTA pH 7.8
P3-Puffer: 3 M K-Acetat pH 5.5	10 x TBE-Puffer: 1 mM Tris 83 mM Borsäure 10 mM EDTA pH 7.4
5 x RNA-Fragmentierungspuffer 200 mM Tris-Acetat, pH 8.1 500 mM K-Acetat 150 mM Mg-Acetat	4 x Trenngelpuffer: 1.5 mM Tris/HCl 0.4% SDS pH 8.8
RIA-Puffer: 50 mM Tris/HCl 4 mM EDTA pH 7.5	TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8.0
4 x Sammelgelpuffer: 0.5 mM Tris/HCl 0.4% SDS pH 8.8	2 x Färbe-Puffer 100 mM MES 1 M [Na ⁺] 0.05 % Tween 20 0.005 % Antifoam
20 x SSPE 3 M NaCl 0.2 M NaH ₂ PO ₄ 0.02 M EDTA	Wasch-Lösung 50 mM NaCl 10 mM Tris/HCl 2.5 mM EDTA 50 % Ethanol (v/v) pH 7.5
10 x TBS: 100 mM Tris/HCl 1.5 mM NaCl pH 7.4	Wasch-Puffer A (nicht-stringent) 6 x SSPE 0.01 % Tween 20 0.005 % Antifoam
TBSTM: 1 x TBS mit: 0.1% Tween 20 5% Magermilchpulver	Wasch-Puffer B (stringent) 100 mM MES 0.1 M [Na ⁺] 0.01 % Tween 20

2.2 Zellkultur

Alle Substanzen für die Zellkulturmedien wurden von Gibco BRL Life Technologies, (Karlsruhe) bezogen. Die Kulturgefäße wurden von den Firmen Becton-Dickinson (Heidelberg) und Greiner (Solingen) bezogen.

2.2.1 Kultur glatter Gefäßmuskelzellen des Menschen

Glatte Gefäßmuskelzellen des Menschen (hSMC) wurden nach der Explant-Technik (Fallier-Becker et al., 1990) aus Koronar-Arterien oder Aorten isoliert. Die Kultivierung erfolgte in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 15% FCS, 100 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin bei 37 °C unter Begasung mit 5% CO₂. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (0.05 % / 0.5 mM) nach einmaligem Waschen mit PBS subkonfluent passagiert. Die Versuche wurden mit Zellen der Passagen 3 - 14 durchgeführt.

2.2.2 Stimulation von hSMC für Versuche

Generell wurden alle Zellen vor Versuchen, soweit nicht anders vermerkt, zweimal mit PBS gewaschen und für 24 h in serumfreien DMEM mit 100 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin (DMEM / PS) inkubiert. Danach erfolgte Zugabe der verschiedenen Stimuli in den angegebenen Konzentrationen und für die angegebenen Zeiten.

Table 2: verwendete Substanzen im Zellversuch

Substanz	Wirkung	Hersteller
PMA	PKC-Aktivator	Alexis, Grünberg
Iloprost	IP-Rezeptor-Agonist	Schering, Berlin
Forskolin	Adenylatzyklase-Aktivator	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
dbcAMP	cAMP-Analogon	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Thrombin	Serin-Protease	Dr. J. Stürzebecher, Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin, Erfurt
Actinomycin D	Transkriptions-Inhibitor	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Actidione (Cycloheximid)	Proteinbiosynthese-Inhibitor	Serva, Schweiz

2.3 Übersicht über die Array-Analyse

Abbildung 8 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Schritte der Array-Analyse: **1)** Aus humanen SMC wird Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zur cDNA-Synthese wird ein Oligo(dT)-Primer eingesetzt, an dessen 5'-Ende die Sequenz des bakteriophagen T7-RNA-Polymerase Promotors angehängt ist. **2)** Bei der nachfolgenden in-vitro Transkription (IVT) mit T7-RNA-Polymerase wird Biotin-markiertes UTP oder –CTP in die synthetisierte

cRNA eingebaut. **3)** Die Biotin-markierten RNA-Fragmente (RNA target) werden nach Fragmentierung auf einen Array hybridisiert. Die Biotin-markierten RNA-Fragmente werden mit Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat gefärbt und der Array bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm gescannt. Während des Scannens wird die Fluoreszenzemission ermittelt und mit Hilfe der Microarray Suite Software werden die einzelnen Intensitätswerte, die ein Maß der Expression darstellen, für jedes Transkript analysiert.

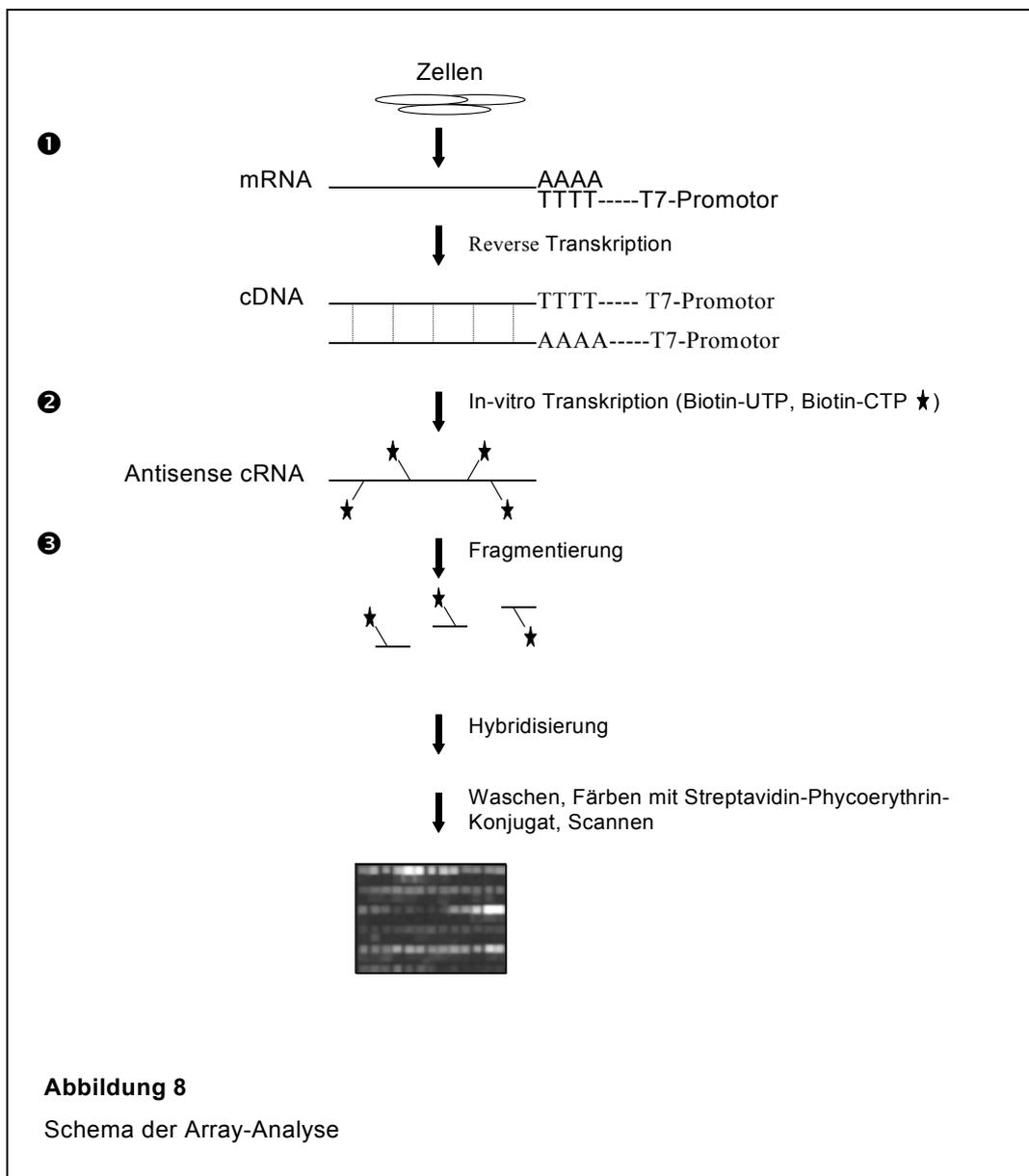


Abbildung 8
Schema der Array-Analyse

2.4 Präparation und Analyse von RNA

2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen erfolgte mit der Trizol-Methode (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe). Generell wurde bei der Präparation von RNA RNase-freies H₂O (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) verwendet.

Die Zellen wurden direkt nach Abnahme des Mediums in der Kulturschale durch Zugabe von Trizol-Reagenz (1 ml/10 cm²) lysiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die RNA-Proben in sterile Eppendorf-Gefäße oder sterile 15 ml Falconröhrchen überführt, mit 200 µl Chloroform / ml Trizol versetzt, ausgeschüttelt, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert (5.000 rpm, 4 °C, Beckman J2-HS Zentrifuge; JA 20-Rotor oder 13.000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13). Die Fällung der RNA aus dem Überstand erfolgte mit 500 µl Isopropanol / ml Trizol bei Raumtemperatur für 10 min und anschließender Zentrifugation für 30 min (12.000 rpm, 4 °C, Beckman J2-HS Zentrifuge; JA 20-Rotor oder 13.000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13). Das RNA-Pellet wurde nach zweimaligem Waschen mit 80 % Ethanol an der Luft getrocknet und anschließend in H₂O gelöst.

2.4.2 Quantifizierung von RNA

Die Konzentration und Reinheit von RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm in einem Genequant II DNA/RNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt. Der Quotient aus den beiden Absorptionswerten (260 nm/280 nm) bietet eine Abschätzung der RNA-Reinheit und sollte zwischen 1.5 und 2 liegen.

1 OD₂₆₀ = 40 µg/ml RNA.

2.4.3 Auftrennung von RNA in Agarose-Gelen

Die Integrität der RNA wurde durch Kontrolle der 18S- und 28S-RNA Bande auf einem denaturierendem Agarose-Formaldehydgel (10 ml 10 x E-Puffer, 73 ml DEPC-H₂O (500 µl/l), 17 ml Formaldehyd, 1 g Agarose) überprüft. Zur Denaturierung wurden die Proben mit Denaturierungspuffer versetzt und für 5 min bei 65 °C erhitzt. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte in 1 x E-Puffer bei 60 V.

2.4.4 Ethanol-Präzipitation

Zur Präzipitation von RNA wurde 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5.2) und 2.5 Volumina absoluter Ethanol zugegeben und anschließend für mindestens 1 h bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde für 20 min zentrifugiert (13.000 rpm, 4°C , Heraeus Biofuge 13) und 2 x mit 80% Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in H_2O gelöst.

2.4.5 Aufreinigung von RNA mit RNeasy Spin Columns

Die Aufreinigung von RNA erfolgte nach dem „RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup“ nach Angaben des Herstellers über RNeasy Spin Columns aus dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden). Die Elution der RNA erfolgte in 2 Schritten mit je $50\ \mu\text{l}$ H_2O . Für cDNA-Synthesen wurde die aufgereinigte RNA erneut mit Ethanol präzipitiert (2.4.4).

2.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit einem Gibco BRL SuperScript Choice System (Life Technologies, Karlsruhe) und einem T7-(dT)₂₄ Primer (MWG Biotech AG, Ebersberg):



Für die cDNA-Synthesen wurden maximal $16\ \mu\text{g}$ aufgereinigte Gesamt-RNA eingesetzt, wobei innerhalb eines Experimentes (Kontrolle / Iloprost-behandelte Zellen) immer gleiche Mengen Gesamt-RNA eingesetzt wurden.

Table 3: Erststrang-Synthese Ansatz

1. Schritt: Primer-Hybridisierung 70°C , 10 min	10 μl RNA (maximal $16\ \mu\text{g}$) 1 μl T7-(dt) ₂₄ -Primer
2. Schritt: Temperatur-Anpassung 42°C , 2 min	4 μl 5x Erststrang-Synthese Puffer 2 μl DTT (0.1 M) 1 μl dNTP-Mix (10 mM)
3. Schritt: Erststrang-Synthese 42°C , 1 h	2 μl Superscript II RT
Gesamt-Volumen	20 μl

Der Erststrang-Synthese Ansatz wurde kurz zentrifugiert und anschließend auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der in Tab. 4 aufgelisteten Reagenzien für die Zweitstrang-Synthese.

Table 4: Zweitstrang-Synthese Ansatz

H ₂ O	91 µl
5 x Zweitstrang-Synthese Puffer	30 µl
dNTP-Mix (10 mM)	3 µl
DNA-Ligase (10 U/µl)	1 µl
DNA-Polymerase I (10 U/µl)	4 µl
RNase H (2 U/µl)	1 µl
Gesamt-Volumen	150 µl

Der Zweitstrang-Synthese-Ansatz wurde für 2 h bei 16 °C inkubiert. Danach erfolgte Zugabe von 2 µl T₄ DNA-Polymerase und eine abschließende Inkubation für 5 min bei 16 °C. Bis zum späteren Gebrauch wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.1 Aufreinigung von cDNA

Die Aufreinigung von doppelsträngiger cDNA erfolgte mittels Phenol/Chloroform Extraktion über Phase Lock Gels (PLG; Eppendorf, Köln). PLG bilden eine inerte, versiegelnde Barriere zwischen der wässrigen und organischen Phase von Phenol-Chloroform-Extraktionen und ermöglichen eine größere und reinere Ausbeute der Probe.

Zum cDNA-Ansatz (152 µl, siehe 2.5) wurden 152 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, Roth, Karlsruhe) zugegeben. Nach Mischen wurde die Probe auf das pelletierte PLG gegeben und anschließend für 2 min zentrifugiert (14.000 rpm, Zentrifuge 5414C, Eppendorf). Der Überstand (ca. 145 µl) wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und die aufgereinigte cDNA durch Zugabe von 0.5 Volumen NH₄Ac (7.5 M) und 2.5 Volumina Ethanol (absolut, -20 °C) bei -20 °C präzipitiert.

2.6 Synthese von Biotin-markierter cRNA (in-vitro Transkription)

Aufgereinigte, Ethanol-präzipitierte cDNA (2.5.1) wurde für 20 min zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13), zweimal mit 80% Ethanol gewaschen, das Pellet an der Luft getrocknet und in 12 µl H₂O gelöst. Die gesamte cDNA-Fraktion wurde für die in-vitro Transkription eingesetzt und mit dem BioArray™ HighYield™ RNA Transcript Labeling Kit

(Enzo Biochem, Inc., Farmingdale, USA) durchgeführt. Die Zugabe der Reagenzien erfolgte bei RT in der in Tabelle 5 aufgelisteten Reihenfolge.

Tabelle 5: *in-vitro* Transkriptions-Ansatz

cDNA	12 µl
RNAse freies H ₂ O	10 µl
10 x HY Reaktions-Puffer	4 µl
10 x Biotin-markierte Ribonukleotide	4 µl
10 x DTT	4 µl
10 x RNase Inhibitor-Mix	4 µl
20 x T7 RNA Polymerase	2 µl
Gesamt-Volumen	40 µl

Der gesamte Ansatz wurde gemischt, kurz zentrifugiert und für 5 h bei 37 °C inkubiert. Alle 45 min wurde der Reaktionsansatz vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

Die Aufreinigung der cRNA erfolgte wie unter 2.4.5 beschrieben, wobei jeweils der halbe Reaktionsansatz eingesetzt wurde. Anschließend wurde die cRNA quantifiziert (siehe 2.4.2) und mit 0.5 Volumen NH₄Ac und 2.5 Volumina Ethanol (absolut, -20 °C) bei -20 °C präzipitiert.

2.7 cRNA-Fragmentierung

Zur Fragmentierung wurde die aufgereinigte, Ethanol-präzipitierte cRNA für 20 min zentrifugiert (13.000 rpm, 4°C, Heraeus Biofuge 13) und einmal mit 80% Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in H₂O in einer Konzentration von ca. 1 µg/µl gelöst. 15 µg cRNA in einem Volumen von maximal 16 µl H₂O wurden mit 4 µl 5 x RNA-Fragmentierungspuffer versetzt und für 35 min bei 95 °C erhitzt. Danach wurden die Proben kurz zentrifugiert und auf Eis inkubiert.

2.8 Hybridisierung von Arrays

Vor der Hybridisierung wurden die Arrays (HUGeneFL, Affymetrix, Santa Clara, USA) auf Raumtemperatur gebracht, mit 200 µl 1 x Hybridisierungspuffer befüllt und für 10 min bei

45 °C im Hybridisierungssofen (GeneChip® Hybridization Oven 640, Affymetrix, Santa Clara, USA) mit Rotation (60 rpm) inkubiert.

Tabelle 6: Herstellung des Hybridisierungscocktails

Bio Controls (20 x): GeneChip® Eukaryotic Hybridization Control Kit (Affymetrix)	15 µl
B2-Oligo (3 nM): GeneChip® Eukaryotic Hybridization Control Kit (Affymetrix)	5 µl
Hering Sperm DNA (10 mg/ml; Promega, GMBH, Mannheim)	3 µl
Acetyliertes BSA (50 mg/ml; Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe)	3 µl
Hybridisierungspuffer (2 x)	150 µl
H ₂ O	104 µl
Gesamt	280 µl

Nach Zugabe der fragmentierten cRNA (15 µg) und Inkubation des Hybridisierungscocktails für 5 min bei 99 °C und 5 min bei 45 °C wurde der Ansatz zur Sedimentation von Schwebepartikeln für 2 min zentrifugiert (14.000 rpm, Heraeus Biofuge 13).

Der Hybridisierungspuffer wurde aus den Arrays entnommen und durch den Hybridisierungscocktail ersetzt. Die Arrays wurden dann für 16 h bei 45 °C im Hybridisierungssofen mit Rotation (60 rpm) inkubiert.

2.9 Waschen, Färben und Scannen der Arrays

Nach der Hybridisierung wurde der Hybridisierungscocktail aus den Arrays entnommen und durch 200 µl Wasch-Puffer A ersetzt. Der Hybridisierungscocktail wurde bei -20 °C aufbewahrt. Die Anfärbung der Biotin-markierten cRNA erfolgte anschließend mit Streptavidin Phycoerythrin (SAPE) Lösung.

Tabelle 7: Herstellung der SAPE-Lösung

2 x Färbe-Puffer	400 µl
H ₂ O	360 µl
Acetyliertes BSA	32 µl
SAPE (1mg/ml; Molecular Probes, Göttingen)	8 µl
Gesamt	800 µl

Die Arrays wurden in die entsprechenden Module der Fluidic-Station (GeneChip Fluidics Station 400, Affymetrix) platziert und die SAPE-Anfärbung mit einem Wasch-/Färbeprotokoll (EukGE-WS1) gestartet. Es wurde den Anweisungen im Display der Fluidic Station gefolgt. Nach der SAPE-Anfärbung wurden die Arrays bei 588 nm gescannt (Agilent GeneArray® Scanner). Die SAPE-Lösung wurde bei 4 °C zwischengelagert und später bei der Antikörper-Verstärkung wiederverwendet. Zur Verstärkung der Signale erfolgte ein zweiter Färbeschritt mit biotinyliertem Anti-Streptavidin-Antikörper.

Table 8: Herstellung der Antikörperlösung

2 x Färbe-Puffer	400 µl
H ₂ O	355.2 µl
Acetyliertes BSA	32 µl
goat IgG (10 mg/ml; Sigma Chemical)	8 µl
Anti-Streptavidin (0.5 mg/ml) (Vector Laboratories, CA, USA)	4.8 µl
Gesamt:	800 µl

Zur Antikörper-Verstärkung wurden die Arrays erneut in die Module der Fluidic Station platziert und ein weiteres Wasch- und Färbeprotokoll (EukGE-WS2) gestartet. Es wurde den Anweisungen im Display der Fluidic Station gefolgt. Anschließend wurden die Arrays erneut bei 588 nm gescannt.

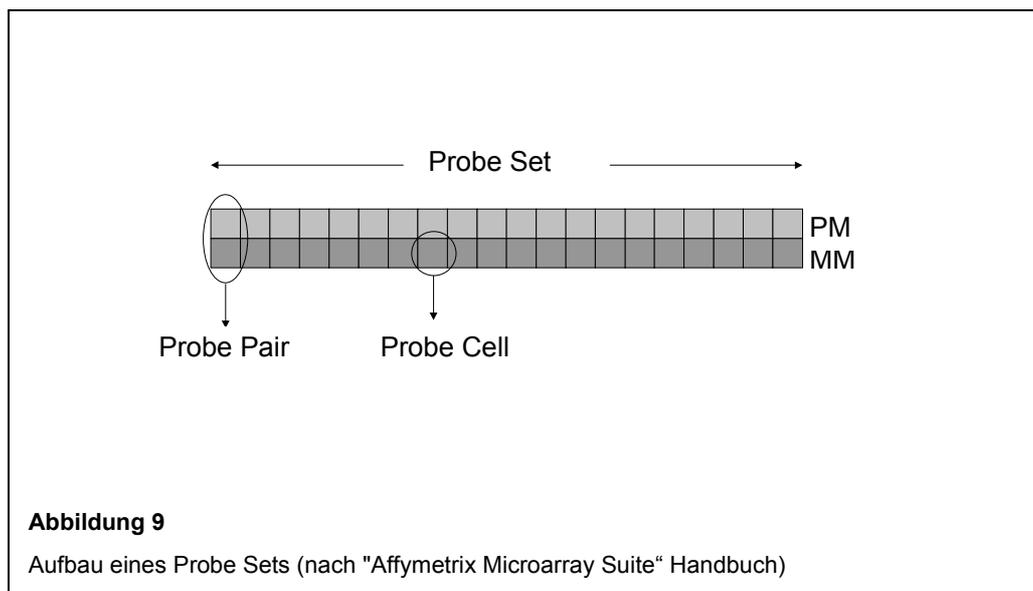
2.10 Auswertung von Array-Experimenten

Da es teilweise keine sinnvollen Übersetzungen der im folgenden Text vorkommenden englischen Fachtermini gibt, wurden die englischen Begriffe beibehalten.

2.10.1 Expressions-Analyse der Einzelexperimente

Microarrays von Affymetrix werden durch ein kombiniertes Verfahren von Photolithografie und kombinatorischer Chemie hergestellt. Zehn- bis hunderttausend verschiedene Oligonukleotid-Proben werden dabei direkt auf dem Array synthetisiert. Bei den in dieser Arbeit verwendeten HUGeneFL-Arrays handelt es sich um einsträngige DNA-Oligonukleotide mit einer Länge von 25 Basenpaaren. Die DNA-Oligonukleotide, die ein bestimmtes Transkript repräsentieren, sind auf sogenannten "Probe Sets" lokalisiert (Abb. 9). Jedes "Probe Set" besteht aus 16 – 20 "Probe Pairs", die jeweils aus 2 verschiedenen "Probe

Cells", den "Perfect Match" (PM) und "Mismatch" (MM), zusammengesetzt sind. Die PM-Oligonukleotide sind exakt komplementär zu einem Sequenzabschnitt in einem spezifischen Transkript. Die MM-Oligonukleotide sind ebenfalls komplementär zu diesem Sequenzabschnitt, weisen jedoch an einer zentralen Position einen homomerischen Basen-Mismatch auf. Die Mismatch-Probe eines jeden "Probe Pair" dient als Kontrolle der Hybridisierungs-Spezifität. Jede "Probe Cell" beinhaltet wiederum Millionen Kopien eines spezifischen Oligonukleotids.



Während des Scannens wird jede "Probe Cell" in Pixel unterteilt, und die Rohintensitäts-Daten pro Pixel ermittelt. Die Ermittlung eines Intensitätswertes pro "Probe Set" (= Transkript) erfolgt in zwei Schritten mit Hilfe der "Affymetrix Microarray Suite" Software, Version 4.0. Im ersten Schritt werden aus den Pixeldaten eines "Probe Cell" (= eines spezifischen Oligonukleotids) unter Berücksichtigung einer Hintergrund-Korrektur, ein Intensitätswert pro "Probe Cell" (PM oder MM) ermittelt. Im zweiten Schritt werden die ermittelten Intensitätswerte der "Probe Cells" zur Korrektur von unspezifischen Hybridisierungen eingesetzt. Für jedes "Probe Pair" wird die Differenz zwischen "Perfect Match" und "Mismatch" gebildet (PM-MM). Aus der Summe der Differenzen der "Probe Pairs" wird der Signalintensitätswert, die "Average Difference" (AD) pro "Probe Set" ermittelt. Die "Average Difference" dient als relativer quantitativer Indikator der Expression eines Transkriptes.

Von der Software wird für jedes Transkript über eine komplexe Entscheidungsmatrix (nähere Informationen hierzu im Microarray Suite Handbuch S. 297 - 308) ein qualitativer Parameter, der sogenannte "Absolut Call" zugeordnet. Der "Absolut Call" besagt, ob ein Transkript vorhanden bzw. detektierbar ist. Die Transkripte können als "Absent", "Marginal" oder "Present" detektiert werden.

Zur Kontrolle der Hybridisierungsqualität eines Array-Experiments enthält der Array "Probe Sets" mit nicht-eukaryontischen Oligonukleotiden: bioB, bioC, bioD und cre. Die entsprechenden Transkripte (Spike-Kontrollen) werden dem Hybridisierungscocktail zugegeben (siehe 2.8, Tab. 6) und müssen später in der absoluten Analyse im "Absolut Call" den Status "Present" aufweisen. bioB repräsentiert dabei das unterste Detektionslimit, da es in der geringsten Konzentration (1.5 pM) zugegeben wird.

Als interne Kontrollen für die Qualität der cDNA-Synthese und der in-vitro Transkription, werden die Quotienten aus den 3' und 5' "Average Difference"-Werten (AD 3'/5') der "Housekeeping"-Kontrollen GAPDH und Actin "Probe Sets" bestimmt. Die Quotienten sollten zwischen 1 und 2 liegen; Quotienten über 2 weisen z.B. auf inkomplette IVT-Reaktionen bzw. unvollständige cDNA-Synthesen hin.

2.10.2 Vergleichende Expressions-Analyse

In biologischen Assays treten Variabilitäten der Daten auf, die durch nicht-biologische Faktoren beeinflusst werden. So können z.B. Schwankungen der Menge und Qualität der verwendeten cRNA, der Färbung oder andere experimentelle Variablen zu unterschiedlichen Hybridisierungs-Intensitäten führen. Um dennoch einen zuverlässigen Vergleich mehrerer Arrays durchzuführen, müssen diese Faktoren minimiert werden. Dies wird durch "Normalization" und "Scaling" des Arrays erreicht. Es wurde bei allen Arrays ein globales Scaling über alle "Probe Sets" durchgeführt. Dabei wird ein durchschnittlicher Intensitätswert für alle "Probe Sets" eines Arrays, die "Average Average Difference", bestimmt. Als "Target Intensity" wurde der Wert 1000 gewählt. Bei dieser Methode werden die Daten jedes Experiments mit einem "Scaling Factor" multipliziert, um die "Average Intensity" auf die vorgegebene "Target Intensity" zu Normalisieren. Damit wird der Vergleich verschiedener Experimente ermöglicht.

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Transkripte in Iloprost-stimulierten hSMC (6 h, 100 nM) wurde eine vergleichende Analyse mit unbehandelten Kontroll-Zellen durchgeführt. Die Kontrollen wurden gemäß dem Affymetrix Microarray Suite Handbuch als "Baseline",

die Iloprost-behandelten Proben als "Experiment" definiert. In der vergleichenden Analyse werden dann die "Average Difference"-Werte aller "Probe Sets" des "Experiments" und der "Baseline" miteinander verglichen. Daraus werden die relativen quantitativen Veränderungen in der Expression der Transkripte, der "Fold Change", ermittelt. Als qualitativer Parameter wird für jedes Transkript der sogenannte "Difference Call" bestimmt. Im Vergleich zur "Baseline" sind 5 verschiedene "Difference Call" möglich: "Increase", "Marginal Increase", "Decrease", "Marginal Decrease" oder "No Change".

Für weitere Untersuchungen wurden nur solche Gene einbezogen, die einen "Fold Change" von $\geq +2.0$ oder ≥ -2.0 aufwiesen.

2.11 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

RT-PCR Reaktionen erfolgten in einem TRIO-Thermo-Cycler (Biometra, Göttingen).

Primer (siehe 2.11.2, Tab. 9) für die RT-PCR wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg) oder Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

2.11.1 RT-PCR mit Ready-To-Go™ RT-PCR Beads

Die Analyse der COX-2 Expression erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, mit Ready-To-Go™ RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Als interner Standard wurde die Expression des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

RT-PCR Ansatz: 500 ng Gesamt-RNA
 0.5 µg Oligo d(T)-Primer
 je 1 µl COX-2 Primer (15 µmol/l)
 je 1 µl GAPDH-Primer (15 µmol/l)
 Gesamt-Volumen: 50 µl

RT-PCR Bedingungen: 30 min, 42 °C
 5 min, 95 °C
 1 min, 95 °C
 1 min, 55 °C
 1 min, 72 °C
 15 min, 72 °C

} 30 Zyklen

2.11.2 RT-PCR mit Qiagen® One-Step RT-PCR Kit

Alle anderen RT-PCRs wurden mit dem Qiagen® One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Als interner Standard wurde wiederum die Expression des Enzyms GAPDH verwendet.

RT-PCR Ansatz: 250 ng Gesamt-RNA
 10 µl 5 x RT-PCR-Puffer
 10 µl Q-Lösung
 2 µl dNTPs
 2 µl Enzym-Mix
 je 1.5 µl GAPDH-Primer (15 µmol/l)
 je 1.5 µl genspezifische Primer (20 µmol/l)
 Gesamt-Volumen: 50 µl

RT-PCR Bedingungen: 30 min, 50 °C
 15 min, 95 °C
 1 min, 94 °C
 1 min, Anlagerungs-Temperatur (siehe Tab. 9)
 1 min, 72 °C
 10 min, 72 °C

} 30 Zyklen

Table 9: verwendete RT-PCR-Primer

Gen	Primer-Sequenz	Grösse des PCR-Produkts (bp)	Anlagerungs-Temperatur (°C)
COX-1	5': TGCCAGCTCCTGGCCCGCCGCTT 3': GTGCATCAACACAGGCGCCTCTTC	303	62
COX-2	5': AATGAGTACCGCAAACGCTTTATG 3': CATCTAGTCCGGAGCGGGAAGAAC	421	55
CYR61	5': GGCTGCGGCTGCTGTAAGGTCT 3': GTTCGGGGGATTCTTGGTCT	739	60
GAPDH	5': TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA 3': TCCTTGAGGCCATGTAGGCCAT	238	52, 55, 60, 62
HAS-2	5': GTCTCAAATTCATCTGATCTC 3': ACATTTCCCTTAAGTAGTCTGG	419	51
hEZF	5': CATCAGCGTCAGCAAAGGCAG 3': TCGCAGGTGTGCCTTGAGATG	514	60
ICER	5': ATTATGGCTGTAAGTGA 3': TCATTAGCCTCAGCTCTC	213	55
MCP-1	5': CCAATTCTCAAAGTGAAGCTC 3': AGGTGAATGAAGCACAGACCA	489	60
MKP-1	5': CATAGACTCCATCAAGAATGC 3': GAGTTCAGCAAATGTCTTGAC	559	55
PAI-1	5': AAAGGTATGATCAGCAACTTG 3': CTGAAAGACTCGTGAAGTCAG	499	55
STC	5': TTGTGATCAGTGCTTCTGCAAC 3': CTCAGTGATGGCTTCAGGGTTC	410	52
VEGF	5': CTAAGTCCATCCAATCGAGAC 3': TCACATCTGCAAGTACGTTTCG	411	55

2.12 Densitometrische Auswertung von RT-PCRs

Zur densitometrischen Auswertung wurden die RT-PCR Proben in 1 – 1.5 %igen Agarose-Gelen mit Ethidiumbromid (0.5 µg/ml) aufgetrennt und die Intensitäten der DNA-Banden unter Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit einer Geldoc 2000 Apparatur und dem Programm Quantity One Version 4.1.0 / Geldoc (Biorad, München). Für jede Probe wurde der Quotient aus den Intensitäten des zu untersuchenden Gens und der GAPDH als internen Standard gebildet. Der Quotient von nicht-stimulierten Zellen (0 h = Kontrollen) wurde als 1 definiert und die Quotienten von den

stimulierten Zellen zu diesem Kontrollwert in Relation gesetzt. In den Abbildungen sind diese Werte als relative mRNA Expression angegeben.

2.13 PCR-Amplifikation

Zur Verstärkung schwacher ICER RT-PCR Signale wurde eine PCR-Amplifikation mit Ready-To-Go™ PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Ein 5 µl Aliquot der cDNA aus der RT-PCR Reaktion (2.11.2) mit frisch zugesetzten ICER-Primern (1.5 µl / Ansatz) wurde mit 35 Zyklen (1 min 95°C; 1 min 55°C, 1 min 72°C) amplifiziert. Die Auswertung der PCR erfolgte wie unter 2.12 beschrieben.

2.14 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von spezifischen Gensequenzen. Sie basiert auf einer Detektion von Fluoreszenzsignalen, die proportional während der Amplifikation eines PCR-Produktes entstehen.

2.14.1 cDNA-Synthese für die Real-Time PCR

Die cDNA-Synthese für Real-Time PCRs erfolgten mit 200 ng Gesamt-RNA und einem Reverse Transcription Core Kit (Eurogentec, Belgien) nach dem Two-step Reaction Mix Protokoll des Herstellers in einem TRIO-Thermo-Cycler (Biometra, Göttingen).

2.14.2 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR erfolgte mit einem qPCR™ Core Kit for Sybr™ Green I (Eurogentec, Belgien) nach Angaben des Herstellers. Pro Reaktion wurde 1 µl der cDNA-Reaktion und 300 nM der folgenden Primer (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt:

CYR5`SYBR: GGAGCCTCGCATCCTATAACAACC

CYR3`SYBR: CCCTTTTTCAGGCTGCTGTACAC

Die Real-Time PCRs wurden mit einem Applied Biosystems (ABI) 7700-Sequence Detector (Foster City, CA, USA) durchgeführt.

PCR-Bedingungen: 10 min 95 °C
 15 s 95 °C }
 1 min 60 °C } 40 Zyklen

Die Auswertung der Real-Time PCRs erfolgte mit dem Programm "PE Applied Biosystems Sequence Detection System", Version 1.6.3. Als Maß für die Veränderung der Genexpression wurde der "Cycle threshold" (Ct)-Wert bestimmt. Der Ct-Wert ist umgekehrt proportional zu der Kopienzahl eines Transkriptes, d.h. je höher die Konzentration eines Transkriptes ist, desto niedriger ist der Ct-Wert.

2.15 Präparation und Analyse von DNA

2.15.1 Auftrennung von DNA in nativen Agarose-Gelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1 - 1.5 %igen Agarosegelen. Als Gelpuffer wurde 1 x TAE-, bzw. TBE-Puffer verwendet. Die Proben wurden vor Beladung des Gels mit 1/10 Volumen Blaumarker (Bromphenolblau 0.25 %, Saccharose 40 %) versetzt. Als Längenstandard diente eine 100-10.000 Basenpaar-Leiter (peqLAB, Erlangen). Durch Zugabe von 0.5 µg/ml Ethidiumbromid zum Agarosegel wurde die DNA nach der Auftrennung bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

2.15.2 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente in 1 - 1.5 %igen TAE-Agarosegelen, wurden die gewünschten Fragmente unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und das Agarosestück mit der DNA in dreifachem Volumen 6 M Na-Iodid-Lösung bei 50 °C geschmolzen. Nach Zugabe von 5 µl "Glasmilk", einer DNA-bindenden Silikat-Matrix (GeneClean-Kit II; Dianova, Hamburg), erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 50 °C. Der Glasmilk/DNA-Komplex wurde durch Zentrifugation (30 s, 13000 rpm, Eppendorf Zentrifuge 5415 C) sedimentiert und anschließend 3 x mit je 1 ml kalter Wasch-Lösung gewaschen. Die DNA wurde anschließend mit 20 µl 1 x TE-Puffer durch eine 5 minütige Inkubation bei 50 °C von der Matrix gelöst und durch Zentrifugation (30 s, 13.000 rpm, Zentrifuge 5415C, Eppendorf) von dieser getrennt. Der Überstand mit der DNA wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

2.15.3 Restriktion von DNA

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen der Firmen Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) und New England Biolabs (Frankfurt). Puffer und Reaktionstemperatur wurden nach Herstellerangaben gewählt. Für 1 µg Plasmid-DNA wurden 1 U Enzym eingesetzt und die DNA für eine Stunde bei entsprechender Temperatur inkubiert.

2.15.4 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA

Die Ligation von RT-PCR Produkten erfolgt unter Verwendung des SureClone™ Ligation Kit (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg). 3'-überhängende Enden wurden durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität des Klenow-Enzyms abgebaut und mit T₄-Polynukleotidkinase phosphoryliert. Die Reaktionen erfolgten für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurde die DNA mit Phenol-Chloroform extrahiert und über eine Mikro-Spin-Säule mit Sephacryl S 200 nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Ligation der DNA-Fragmente in dephosphorylierten pUC18 Vektor für 1-2 h bei 16 °C.

2.15.5 Transformationen von *Escherichia coli* (E.coli)

Die Herstellung kompetenter Zellen und die Transformation von DNA erfolgten nach dem Protokoll von Hanahan (1985). Für die Transformation wurde folgender *E.coli*-Stamm (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) verwendet:

DH5αF' F' / *endA1 hsdR17*(r_k⁻m_k⁺) *supE44 lambda⁻ thi-1 recA1*
gyrA relA1 (lacZY A-*argF*)_{U169} (m80*dlacZΔM15*)

Zu gefrorenen kompetenten DH5α-Zellen wurden 10 µl des Ligationsansatzes (2.15.4) gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Nach 45 s Hitzeschock bei 37 °C wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 7.000 rpm, Eppendorf Zentrifuge 5415 C) wurde das Zellpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert, auf X-Gal Platten (LB-Medium mit 1% Agar, X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid) 100 µg/ml, Ampicillin 100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Auffinden von potentiellen *E. coli* Transformanten erfolgte über Blau/Weiß-Selektionierung.

2.15.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

2.15.6.1 Alkalische Lyse ("Mini-Präparation")

Die Präparation wurde nach Birnboim und Doly (1979) durchgeführt, deren Methode nach Vorschrift der Firma Qiagen modifiziert wurde. Bakterien aus 1.5 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert und in 300 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl P2-Puffer und kurzem Mischen wurden 300 µl P3-Puffer zugefügt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden 15 min bei 12.500 rpm und 4 °C zentrifugiert (Heraeus Biofuge 13) und der Überstand, der sowohl die DNA als auch RNA enthält, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 2.5 Volumina Ethanol (96 %). Das DNA-Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.15.6.2 Qiagen ("Midi-Präparation")

Die Plasmid-DNA, die in größeren Mengen benötigt wurde, wurde mit dem "Plasmid Midi Kit" der Firma Qiagen (Hilden) isoliert. Dies wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

2.15.7 Sequenzierung von DNA

Alle Materialien und Geräte zur Sequenzierung von DNA wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit fluoreszenzmarkierten M13 Universe-, oder M13 Reverse-Primern und einem "AutoRead Sequencing Kit" nach Protokoll B des Herstellers. Diese Methode beruht auf einer Modifikation der Dideoxy-Methode nach Sanger et al. (1977).

Sequenzgel:	8.8 ml Long-Ranger Acrylamid
	29 g Harnstoff
	12 ml 10 x TBE ad 60 ml Aqua dest.
	550 µl APS (10 %)
	55 µl TEMED

Elektrophoresebedingungen:	1500 V, 55 mA, 25 W, 53 °C, Laufpuffer: 0.5 x TBE
System:	ALF-Express DNA-Sequenzierer
Programm:	ALF-Manager 3.01

2.16 Präparation und Analyse von Proteinen

2.16.1 Analyse von Proteinen durch Western Blot

2.16.1.1 Isolierung von Proteinen aus Säugetierzellen

Für die Untersuchungen mittels Western Blot wurden Zellen nach Stimulation zweimal mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1 x Laemmli-Puffer lysiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturplatten gelöst, 2 s im Eppendorf-Gefäß sonifiziert und 5 min bei 95 °C denaturiert.

2.16.1.2 Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine aus dem Zell-Lysat erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dazu wurde ein Sammelgel (5 % Acrylamid) auf ein Trenngel (7.5 bis 12 % Acrylamid) gegossen. Der Gellauf erfolgte bei 200 V in einer BioRad Elektrophoresekammer (BioRad, München) mit 1 x Laufpuffer + 0.1 % SDS. Als Molekulargewichtsmarker diente ein Peroxidase-konjugierter hochmolekularer Proteinstandard (New England Biolabs).

2.16.1.3 Transfer von Proteinen

Die Proteine wurden mittels einer „Semi-Dry“-Blotting Apparatur (BioRad, München) auf eine Polyvinyliden Difluoride Membran (PVDF, Millipore, ImmobilonP, Sigma, Deisenhofen) transferiert. Der Transfer erfolgte mit Blotpuffer mit insgesamt 12 V für 30 min.

2.16.1.4 Hybridisierung und Detektion von Proteinen

Zur Sättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in TBSTM prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit Primärantikörper (1:1.000) in 10 ml TBSTM für 1-2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach 3 x 10 min Waschen in TBST erfolgte die Hybridisierung mit Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern (1:5.000) in TBSTM für 1 h bei Raumtemperatur.

Nach 3 x 10 min Waschen in TBST wurden die Proteine mittels Lumi-Light Western Blotting Substrat (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Angaben des Herstellers detektiert. Bei dieser Methode werden mit der, bei der Oxidation von Luminol durch H₂O₂ entstehenden Lichtemission, die Stellen mit Peroxidaseaktivität auf der Membran

nachgewiesen. Die Chemilumineszenz wird durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (HyperfilmTM ECLTM, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) sichtbar gemacht.

Zur internen Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde während der Hybridisierung ein monoklonaler β -Actin-Antikörper (1: 3000) zugesetzt.

Tabelle 10: im Western-Blot verwendete Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
COX-2 polyklonal, anti-rabbit	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
β -Actin monoklonal, anti-mouse AC-74	Sigma, Deisenhofen

2.16.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) mit Hilfe eines "BioRad Protein Assay Dye Reagent" (BioRad, München) bestimmt. Als Standard wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin hergestellt. Die photometrische Bestimmung der Proben erfolgte 20 min nach Zugabe des Bradfordreagenzes in einem ELISA-Reader Modell 550 (BioRad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.17 Bestimmung von cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP-Assay)

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurden die Zellen bis zur Konfluenz in 24-Loch Platten kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit 1 x HBSS-Puffer gewaschen und für 10 min bei 37 °C mit 200 μ l 1 mM IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin, Sigma, Deisenhofen; Phosphodiesterase-Hemmstoff) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen jeweils für 10 min bei 37 °C, mit den in den Experimenten angegebenen Substanzen stimuliert. Am Ende der Inkubationszeit wurde der Überstand von den Zellen abgesaugt und die Reaktion durch Zugabe von 200 μ l eiskaltem Ethanol (96%) gestoppt. Dieser wurde bei 37 °C verdampft und anschließend 300 μ l RIA-Puffer pro Loch zugegeben. Die Platte wurde über Nacht bei -80 °C eingefroren und der Überstand nach dem Auftauen zentrifugiert. Der Gehalt an zyklischen Nukleotiden im Überstand wurde mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt (Steiner et al., 1972). Zur Proteinbestimmung wurden die Zellen mit 200 μ l 0.1 M NaOH versetzt und für 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Der Proteingehalt der Zellsuspension wurde anschließend mittels der Bradford-Methode (2.16.2) bestimmt. Die Adenylat-Zyklase Aktivität wurde in pmol cAMP / mg Protein x 10 min angegeben.

Table 11: im cAMP-Assay verwendete Substanzen

Substanz	Wirkung	Hersteller
Iloprost	IP-Rezeptor Agonist	Schering, Berlin
Forskolin	Adenylatzyklase-Aktivator	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
M&B28767	EP ₃ -Rezeptor-Agonist	Rhône-Poulenc Rorer, Vitry sur Seine, Frankreich
Butaprost	EP ₂ -Rezeptor Agonist	Bayer, Middlesex, England
Ono AE-1329	EP ₄ -Rezeptor Agonist	Ono Pharmaceuticals, Osaka, Japan

2.17.1 Desensibilisierungsversuche

Zur Desensibilisierung des Prostacyclin-Rezeptors wurden die Zellen in 24-Loch Platten kultiviert und für die angegebenen Zeiten mit Iloprost (100 nM) vorinkubiert. Nach jeder Inkubationsperiode wurde ein cAMP-Assay wie unter 2.17 beschrieben durchgeführt.

2.18 Bestimmung von 6-keto-PGF_{1α}

Das von hSMC freigesetzte PGI₂ wurde in Form des stabilen Hydrolyseprodukts 6-keto-PGF_{1α} gemessen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Substanzen in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Nach Ende der Versuchszeit wurden die hSMC zweimal mit serumfreien DMEM / PS gewaschen und für weitere 30 min in frischem DMEM / PS inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und der Gehalt von neu gebildetem 6-keto-PGF_{1α} mittels RIA (Schrör und Seidel, 1988) bestimmt. Die Zellen wurden anschließend mit 1 x Laemmli-Puffer lysiert und die Expression der COX-2 im Western-Blot (siehe 2.16) untersucht.

2.19 Statistik

Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von n Einzelerperimenten angegeben. Unterschiede zwischen den einzelnen Experimenten wurden hinsichtlich ihrer Signifikanz mit dem One-way Analysis of Variance (ANOVA)- und einem nachfolgenden Bonferroni-Test überprüft. Das Signifikanzniveau p für α wurde mit 0.05 festgelegt. Die statistische Berechnung erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad InStat, Version 3.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

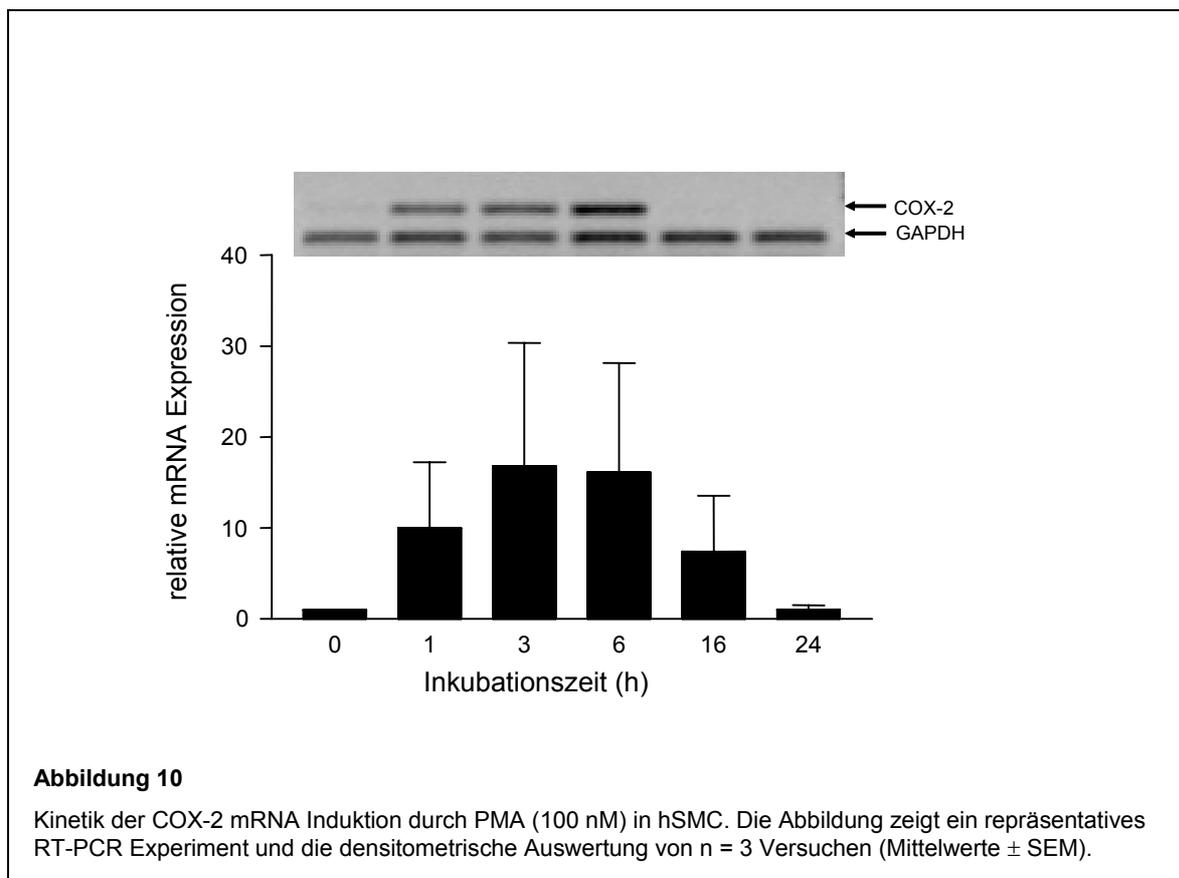
Bei Original-Abbildungen von RT-PCRs und Western-Blots wurde jeweils ein repräsentatives Experiment von n unabhängigen Versuchen mit ähnlichem Ergebnis dargestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Regulation der COX-2 in humanen glatten Gefäßmuskelzellen

3.1.1 Induktion der COX-2 mRNA

Proinflammatorische und mitogene Stimuli wie Endotoxine, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Phorbolester, führen bekanntermaßen zur Induktion des COX-2 Gens in zahlreichen Zell-Linien. Zur Analyse der zeitabhängigen Induktion der COX-2 mRNA in hSMC wurde zunächst der Einfluss des Phorbolesters PMA, einem PKC-Aktivator, getestet. Die Zellen wurden für 0-24 h mit PMA (100 nM) inkubiert, und die Expression der COX-2 mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Die Induktion der COX-2 mRNA durch PMA erfolgte zeitabhängig über einen Zeitraum von 1-6 h und kehrte nach 16 h wieder auf Basalwerte zurück (Abb. 10), wobei eine eintretende Desensibilisierung der PKC durch PMA nicht ausgeschlossen werden kann (Rapoport et al., 1995; Beasley, 1997).



Neben proinflammatorischen und mitogenen Stimuli können Prostaglandine ebenfalls einen regulatorischen Einfluss auf ihr eigenes Synthese-Enzym ausüben, wie z.B. für Monozyten, Makrophagen, Keratinocyten, Endothelzellen und Fibroblasten beschrieben (Hinz et al., 2000a und b; Maldve et al., 2000; Schrör et al., 2002). Über eine Regulation der COX-2 durch PGI₂ und seine chemisch stabilen Mimetika, ist in humanen glatten Gefäßmuskelzellen bisher jedoch wenig bekannt. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von Iloprost auf die COX-2 Expression in hSMC untersucht. Die Stimulation von hSMC mit dem stabilen PGI₂-Mimetikum Iloprost (100 nM) führte zu einer zeitabhängigen Induktion von COX-2 mRNA (Abb. 11) mit einer vergleichbaren Kinetik wie nach PMA-Stimulation. Im Vergleich zu PMA war die Induktion der COX-2 durch Iloprost jedoch schwächer. Diese Ergebnisse zeigen, dass neben "klassischen" Stimuli der COX-2 Expression, wie Phorbol ester, auch Prostaglandine (Iloprost) in hSMC eine Induktion von COX-2 mRNA bewirken.

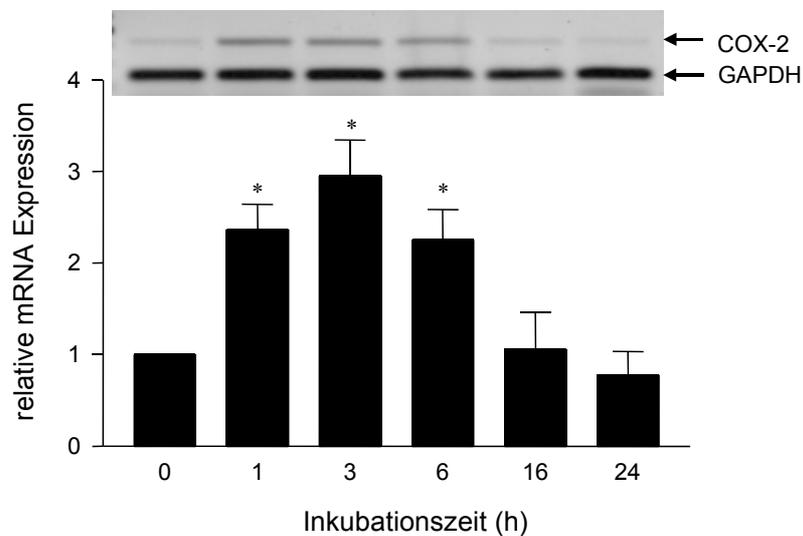


Abbildung 11

Kinetik der COX-2 mRNA Induktion durch Iloprost (100 nM) in hSMC. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives RT-PCR Experiment und die densitometrische Auswertung von n = 4 Versuchen (Mittelwerte \pm SEM; * = Signifikanz vs. Kontrolle).

Zur Kontrolle wurde der Einfluss von Iloprost auf die Expression der konstitutiven COX-1 Isoform in hSMC untersucht. Im Gegensatz zur COX-2 blieb die Expression der COX-1 mRNA durch Inkubation mit Iloprost (100 nM) unbeeinflusst (Abb. 12). Die relative mRNA Expression blieb über den gesamten Stimulationszeitraum von 1–24 h unverändert.

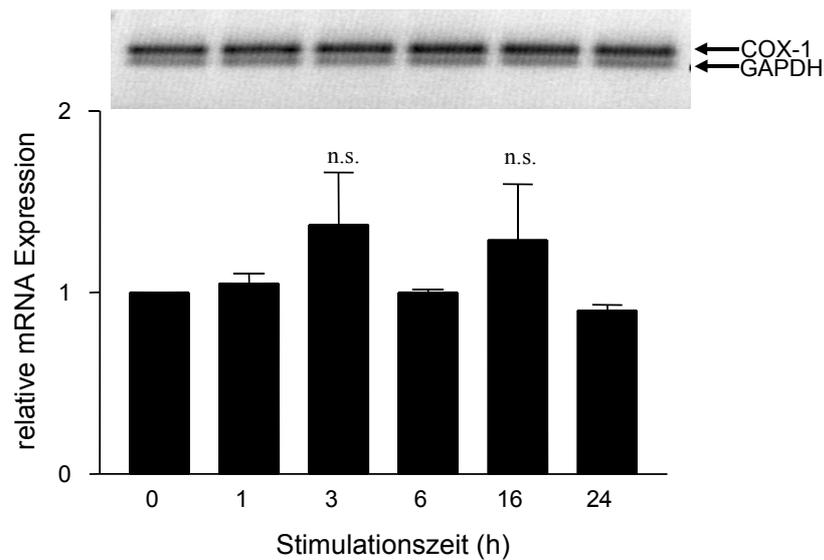
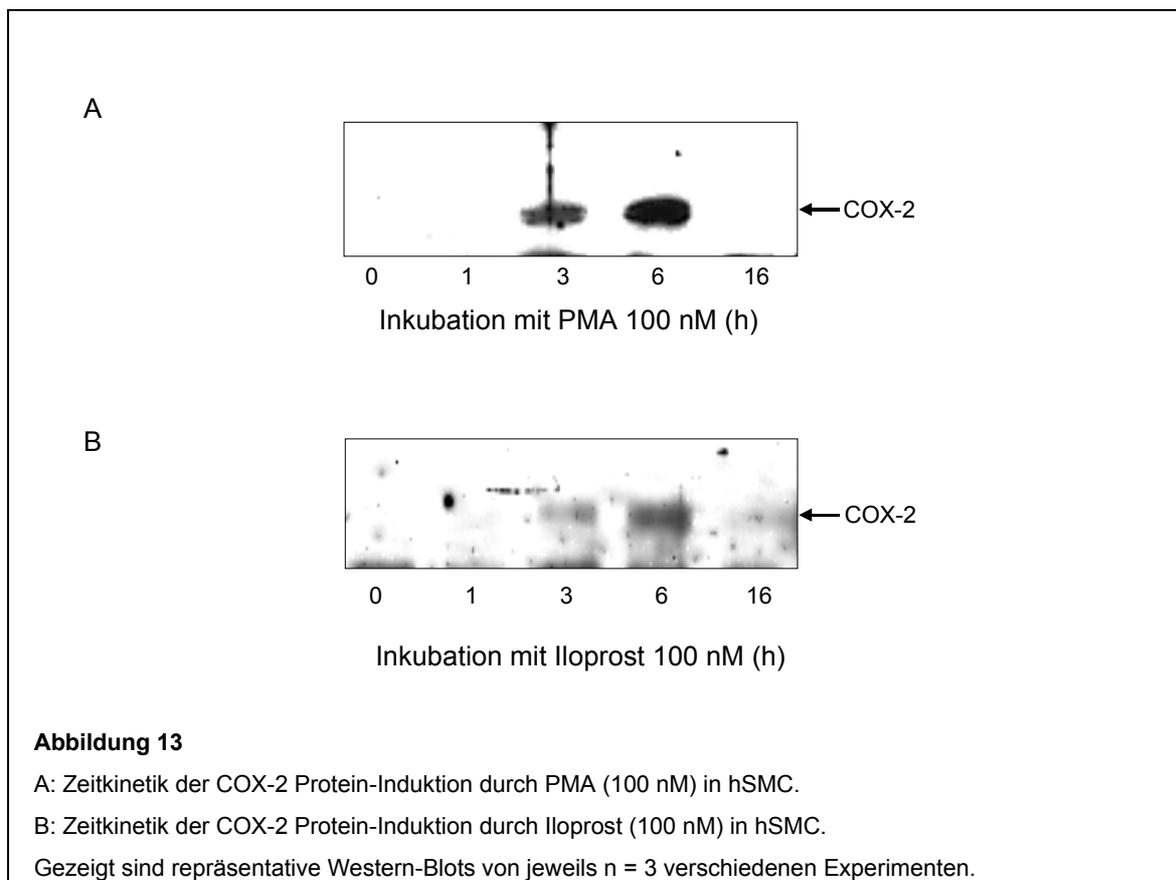


Abbildung 12

Einfluss von Iloprost (100 nm) auf die Expression der COX-1 mRNA in hSMC. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives RT-PCR Experiment und die densitometrische Auswertung von $n = 3$ Versuchen (Mittelwerte \pm SEM; n.s. = nicht signifikant).

3.1.2 Induktion von COX-2 Protein und PGI₂-Synthese

Nach erfolgreichem Nachweis der COX-2 mRNA-Induktion, wurde die Expression der COX-2 auf Proteinebene im Western-Blot untersucht (Abb. 13). In Analogie zu den Ergebnissen der RT-PCR Experimente erfolgte eine transiente Expression von COX-2 Protein durch PMA (100 nM) und Iloprost (100 nM). COX-2 Protein wurde unter dem Einfluss beider Stimuli über einen Zeitraum von 3-6 h exprimiert, wobei die PMA-induzierte COX-2-Expression stärker war, als die Induktion durch Iloprost. Nach 16-stündiger Stimulation kehrte die Expression des COX-2 Proteins wieder auf Basalwerte zurück.

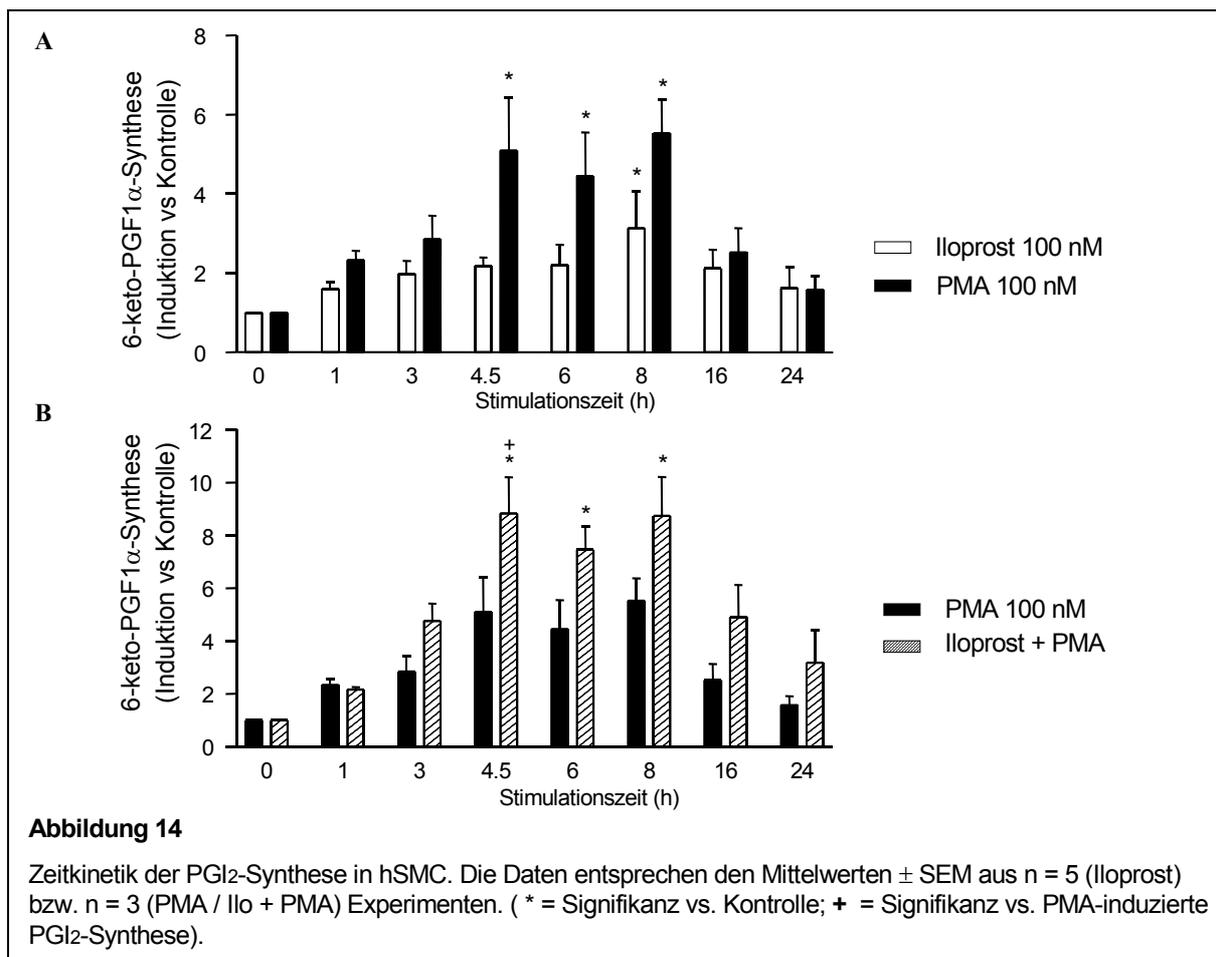


Zur Überprüfung der funktionellen Konsequenz der COX-2 Induktion, wurde die Synthese von PGI₂, dem hauptsächlich gebildeten Prostaglandin in glatten Gefäßmuskelzellen, untersucht. Die Bestimmung der PGI₂-Synthese erfolgte anhand des stabilen Hydrolyseproduktes 6-keto-PGF_{1α} im Radioimmunoassay (RIA).

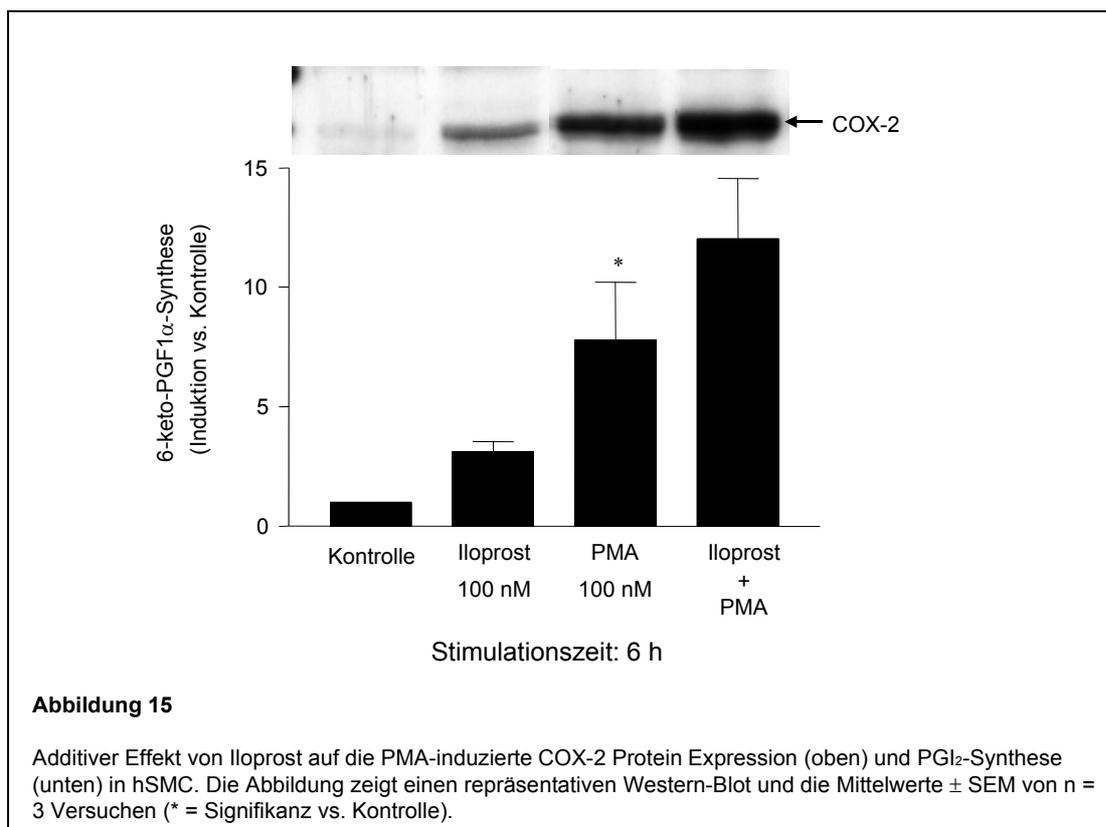
Abb. 14A zeigt die Zeitverläufe der PGI₂-Synthese unter dem Einfluss von PMA (100 nM) und Iloprost (100 nM). Iloprost bewirkte im Vergleich zu Kontroll-Zellen eine leicht verstärkte Synthese von PGI₂ mit einer signifikanten Induktion nach 8 h (3.14 ± 0.94 fache

Induktion vs. Kontrolle). In unbehandelten Kontroll-Zellen betrug die absolute PGI₂-Synthese 16.5 – 62.3 pg / ml. PMA induzierte eine signifikante Bildung von PGI₂ über einen Zeitraum von 4.5 h (5.1 ± 1.33 fache Induktion vs. Kontrolle) bis 8 h (5.53 ± 0.85 fache Induktion vs. Kontrolle). Nach 24 h kehrte die PGI₂-Synthese wieder auf Basalwerte zurück. Die Kinetik der PGI₂-Synthese unter dem Einfluss beider Stimuli korreliert somit mit den Kinetiken der COX-2 mRNA- und Protein-Expression.

Desweiteren wurde untersucht, welchen Effekt eine Stimulation mit beiden Substanzen auf die PGI₂-Synthese hat (Abb. 14B). Bei einer Ko-Inkubation von Iloprost mit PMA erfolgte eine signifikante Bildung von PGI₂ über einen Zeitraum von 4.5 h (8.83 ± 1.37 fache Induktion vs. Kontrolle) bis 8 h (8.74 ± 1.48 fache Induktion vs. Kontrolle). Im Vergleich zu der allein durch PMA-induzierten PGI₂-Synthese, war die PGI₂-Synthese unter dem kombinierten Einfluss beider Stimuli signifikant nach 4.5 h erhöht (8.83 ± 1.37 vs. 5.1 ± 1.33), was auf einen synergistischen (additiv-synergistischen) Effekt schließen lässt.



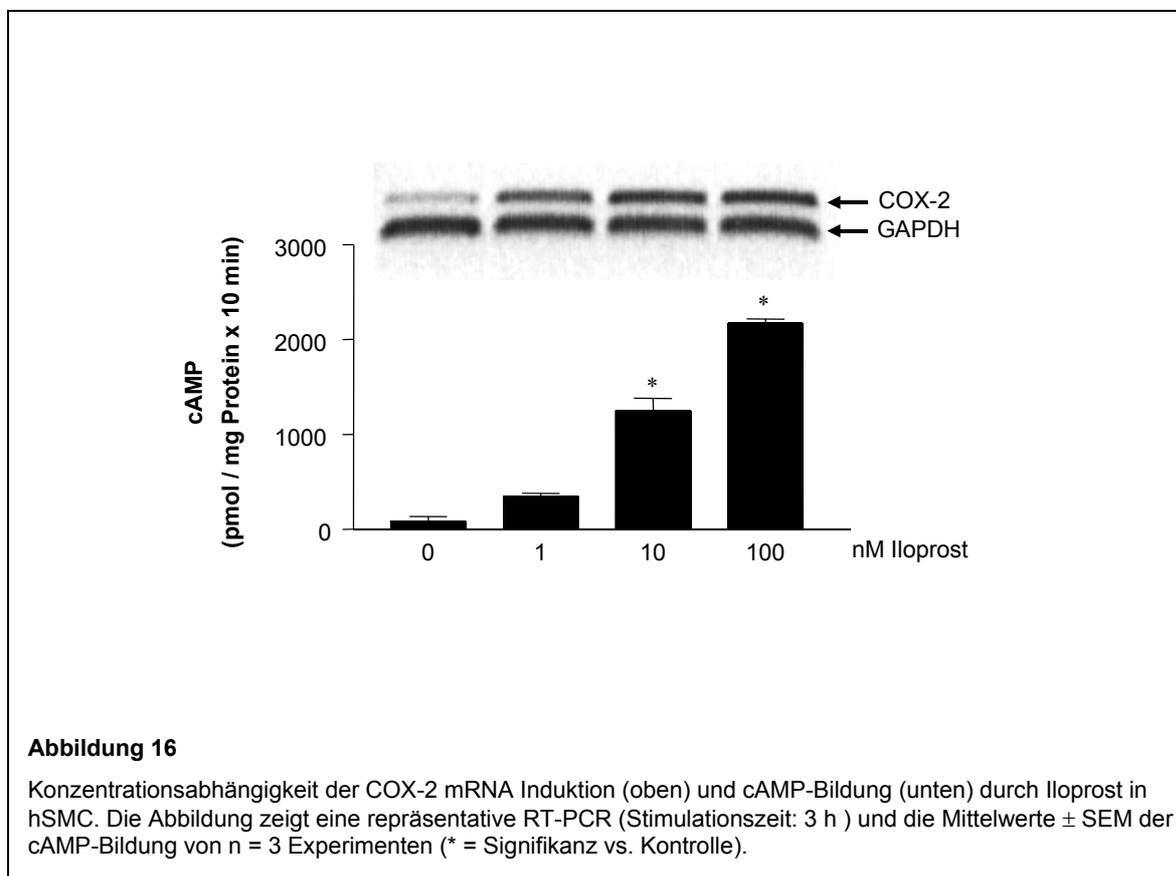
Um zu überprüfen, ob der additive Effekt von Iloprost auf die PMA-induzierte PGI₂-Synthese auf einer verstärkten Expression der COX-2 beruht, wurden hSMC mit Iloprost (100 nM), PMA (100 nM) oder Iloprost plus PMA, für 6 h stimuliert. Danach wurde die Bildung von 6-keto-PGF_{1α} im RIA bestimmt und die Expression von COX-2 Protein im Western-Blot untersucht. Wie Abb. 15 zeigt, kommt es bei Ko-Inkubation von Iloprost plus PMA zu einer vermehrten Expression von COX-2 Protein, auf die wahrscheinlich die vermehrte Bildung von PGI₂ unter dem kombinierten Einfluss beider Stimuli zurückzuführen ist.



3.1.3 Untersuchungen zum Mechanismus der COX-2 Induktion

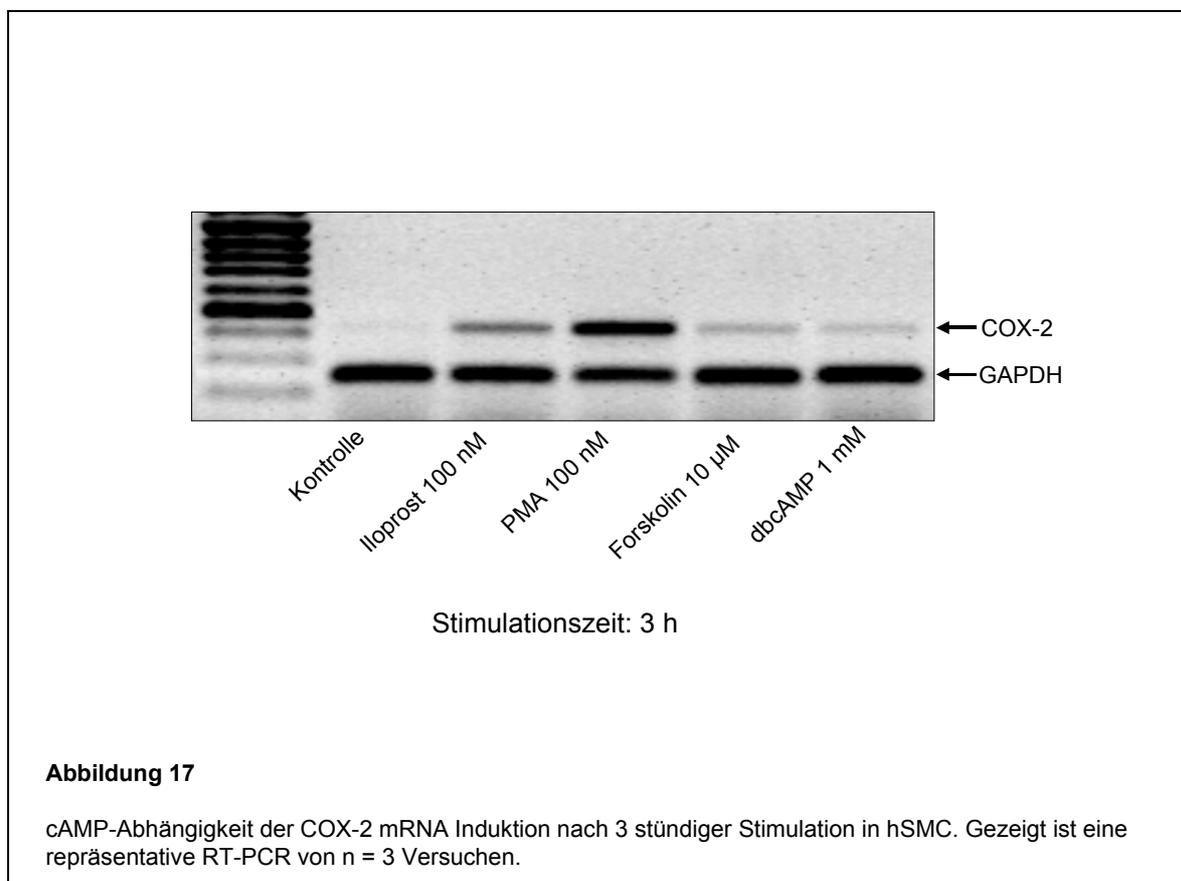
3.1.3.1 Untersuchungen zum cAMP / PKA Signaltransduktionsweg

Iloprost bindet an den IP-Rezeptor, der im vaskulären System hauptsächlich an Gs-Proteine gekoppelt ist und über eine Aktivierung der Adenylatzyklase eine Erhöhung des cAMP-Spiegels und nachfolgend die Aktivierung cAMP / PKA-vermittelter Signaltransduktionswege induziert. Es liegt daher nahe, dass es sich bei der Iloprost-vermittelten Induktion der COX-2 Expression um einen cAMP-abhängigen Mechanismus handelt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst die Induktion der COX-2 mRNA in Abhängigkeit von der Iloprost-Konzentration untersucht. Dazu wurden hSMC für 3 h mit unterschiedlichen Iloprost-Konzentrationen von 1 nM bis 100 nM stimuliert und die COX-2 mRNA Induktion mittels semiquantitativer RT-PCR (Qiagen OneStep RT-PCR-Kit) untersucht (Abb. 16, oben). Es wurde bei diesen Versuchen eine Zyklenzahl von 27 gewählt, um geringere Veränderungen der COX-2 mRNA Expression besser erfassen zu können. Zusätzlich wurde die Konzentrationsabhängigkeit der cAMP-Bildung durch Iloprost im cAMP-Assay bestimmt.



Die Ergebnisse zeigen einen konzentrationsabhängigen Anstieg des cAMP-Gehalts durch Iloprost von 86 ± 50 pmol / mg Protein x 10 min (Kontrolle) auf 351 ± 29 (1 nM), 1250 ± 130 (10 nM), bzw. 2171 ± 45 (100 nM) pmol / mg Protein x 10 min. Der Anstieg des cAMP-Gehaltes korreliert mit einer konzentrationsabhängigen Induktion von COX-2 mRNA. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass es sich bei der Iloprost-induzierten COX-2 Expression um einen cAMP abhängigen Mechanismus handelt.

Desweiteren wurde der Einfluss von Forskolin, einem direkten Aktivator der Adenylatzyklase, sowie des zell-permeablen cAMP Analogons dibutyryl-cAMP (dbcAMP) auf die Expression der COX-2 mRNA mittels RT-PCR untersucht. Abb. 17 zeigt im Vergleich den Einfluss von Iloprost (100 nM), Forskolin (10 μ M) und dbcAMP (1 mM) auf die COX-2 mRNA Induktion nach 3 h. Neben Iloprost erzeugten auch Forskolin und dbcAMP eine schwache Induktion von COX-2 mRNA, ein weiterer Hinweis darauf, dass die Iloprost-medierte Induktion der COX-2 Expression cAMP-abhängig erfolgt. Die Stimulation mit PMA (100 nM) diente in diesem Versuch als Positiv-Kontrolle.



Im nächsten Versuchsansatz wurde die Bildung von cAMP unter dem Einfluss von Iloprost (100 nM) und Forskolin (10 μ M) über 10 min im cAMP-Assay untersucht (Abb. 18). In nicht-stimulierten Kontroll-Zellen lag der basale cAMP-Spiegel bei 67 ± 40 pmol / mg Protein x 10 min. Iloprost erzeugte einen Anstieg des cAMP-Spiegels auf 1814 ± 330 pmol / mg Protein x 10 min. Im Gegensatz dazu induzierte Forskolin eine cAMP-Erhöhung auf 345 ± 62 pmol / mg Protein x 10 min, was ca. 1/5 der Iloprost-induzierten cAMP-Erhöhung entspricht. Die geringere Bildung von cAMP unter dem Einfluss von Forskolin könnte für die schwächere Induktion der COX-2 mRNA in der RT-PCR verantwortlich sein (vgl. Abb 17). Dieses Ergebnis gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass die Intensität der COX-2 Expression von der Menge des gebildeten cAMPs abhängig ist, was mit den Ergebnissen der Konzentrationsabhängigkeit der Iloprost-medierten COX-2 Induktion übereinstimmt (vgl. Abb. 16).

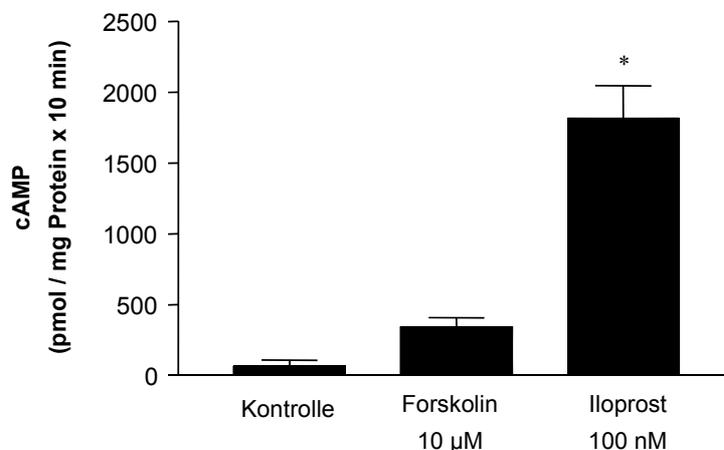
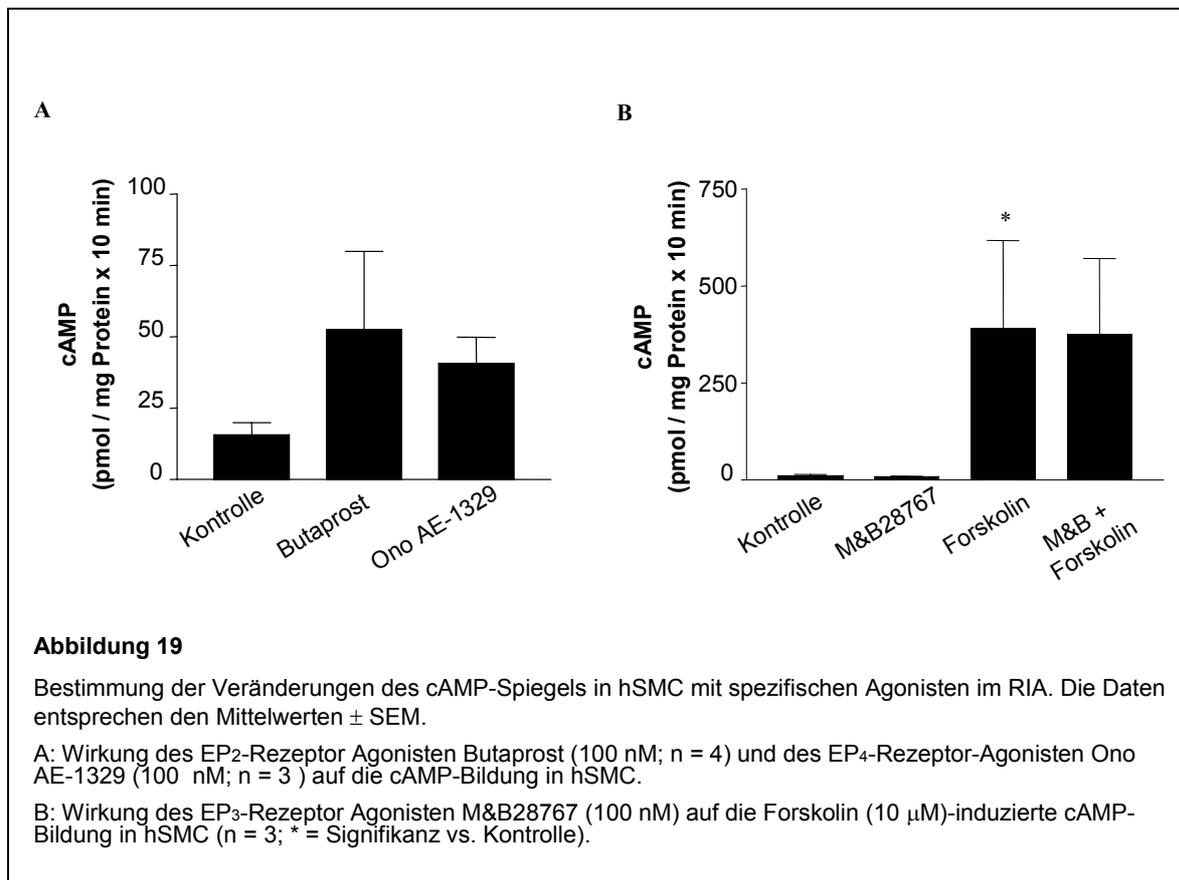


Abbildung 18

Vergleich der Forskolin- und Iloprost-medierten cAMP-Bildung in hSMC. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM von n = 3 Experimenten (* = Signifikanz vs. Kontrolle).

3.1.3.2 Nachweis funktioneller Prostaglandin-Rezeptoren auf hSMC

Iloprost ist kein rein spezifischer IP-Rezeptor Agonist, sondern kann vor allem in höheren Konzentrationen auch auf andere Prostaglandin-Rezeptoren wirken. Darunter befinden sich die Gs-gekoppelten EP-Rezeptoren EP₂ und EP₄, die Gi-gekoppelten EP₃-Rezeptoren und die Gq-gekoppelten EP₁-Rezeptoren (Narumiya et al., 1999). Der Nachweis funktioneller Prostaglandin-Rezeptoren auf hSMCs wurde im RIA mit Hilfe spezifischer Rezeptor-Agonisten und der daraus resultierenden Veränderungen des cAMP-Spiegels bestimmt. Butaprost, ein spezifischer EP₂-Rezeptor Agonist induzierte in hSMC eine leichte Erhöhung des cAMP-Spiegels von 16 ± 4 pmol / mg Protein x 10 min (Kontrolle) auf 53 ± 27 pmol / mg Protein x 10 min (Abb. 19A). Ono AE-1329, ein spezifischer EP₄-Rezeptor Agonist erzeugte einen leichten Anstieg des cAMP-Gehalts auf 41 ± 9 pmol / mg Protein x 10 min (Abb. 19A).



Zum Nachweis von Gi-gekoppelten EP₃-Rezeptoren wurde der spezifische Agonist M&B28767 eingesetzt und die hemmende Wirkung auf die Forskolin-induzierte cAMP-Bildung in hSMC untersucht (Abb. 19B). Es wurde eine Konzentration von 100 nM M&B28767 gewählt, da diese in früheren Studien zum EP₃-Rezeptor eine maximale

Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung bewirkte (Meyer-Kirchrath et al., 1999). Gegenüber Kontroll-Zellen (11 ± 2 pmol / mg Protein x 10 min) erzeugte Forskolin einen Anstieg des cAMP-Gehaltes auf 391 ± 131 pmol / mg Protein x 10 min. Bei einer Ko-Inkubation von Forskolin mit M&B28767 zeigte sich keine Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung (375 ± 114 pmol / mg Protein x 10 min), was auf eine fehlende oder sehr geringe Expression von EP₃-Rezeptoren hinweist. M&B28767 zeigte auch keinen Einfluss auf die basale cAMP-Bildung (8 ± 0.7 pmol / mg Protein x 10 min vs. Kontrolle).

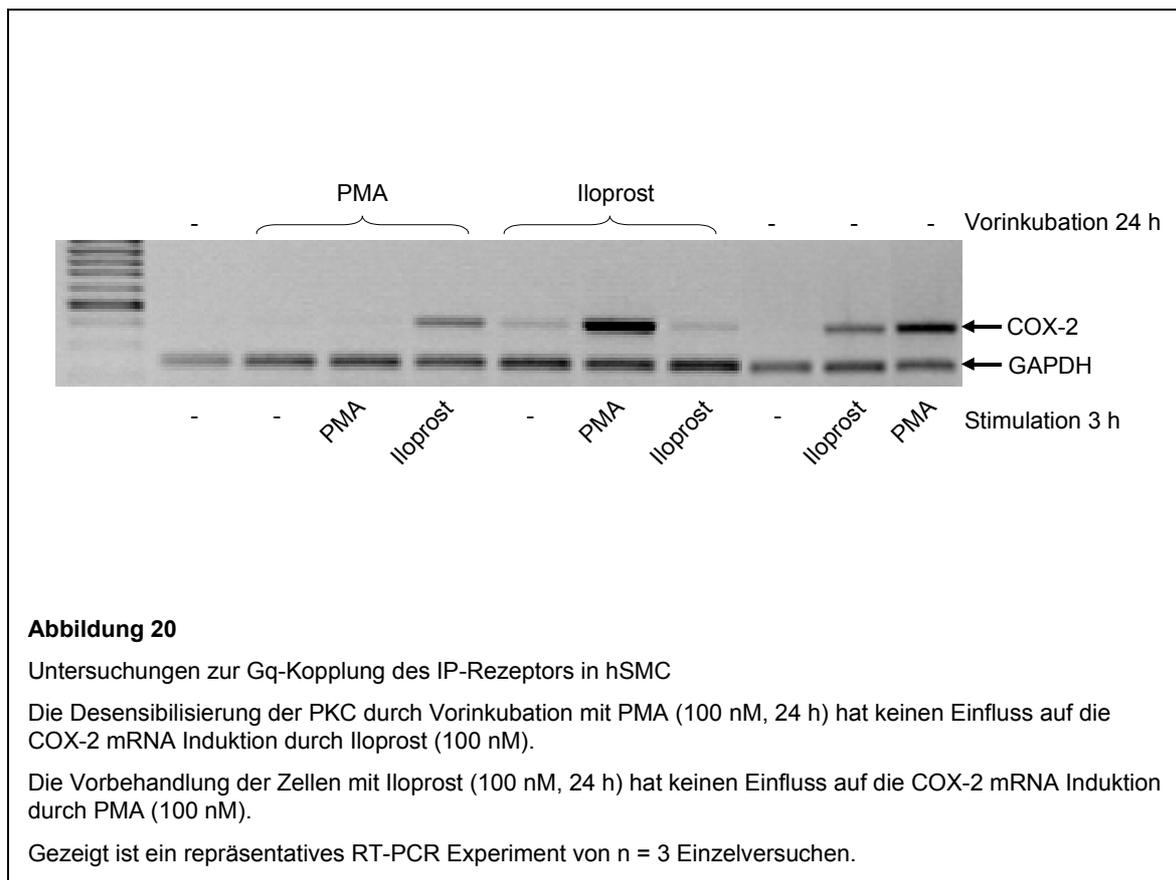
Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass im Gegensatz zum IP-Rezeptor nur sehr wenige andere funktionelle G_s-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie EP₂ und EP₄ in den hier untersuchten hSMC exprimiert werden, so dass die cAMP-abhängigen Wirkungen von Iloprost hauptsächlich über den IP-Rezeptor vermittelt werden.

3.1.3.3 Untersuchungen zum Gq / PKC Signaltransduktionsweg

Neben der Kopplung des IP-Rezeptors an G_s-Proteine, ist in einigen nicht-vaskulären Zell-Linien eine Kopplung an Gq-Proteine mit nachfolgender Stimulation der Phospholipase C beschrieben (Schwaner et al., 1992; Oka et al., 1993). Durch die Spaltung von Phosphatidylinositol-bis-Phosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) kommt es durch DAG zu einer Aktivierung der PKC. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Iloprost-medierte Induktion der COX-2 teilweise über einen Gq / PKC-abhängigen Mechanismus vermittelt wird. Um die Rolle der Gq-Kopplung bei der Induktion der COX-2 durch Iloprost zu untersuchen, wurden hSMC für 24 h mit PMA (100 nM) oder Iloprost (100 nM) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 3 h mit frisch zugesetztem PMA oder Iloprost inkubiert und die COX-2 mRNA Expression mittels RT-PCR analysiert.

Abb. 20 zeigt, dass nach 24 h die PMA-induzierte COX-2 mRNA Expression auf Kontroll-Niveau zurückgekehrt war. Eine erneute Stimulation mit PMA (100 nM) erzeugte keine Induktion von COX-2 mRNA, wahrscheinlich aufgrund einer Desensibilisierung der PKC durch PMA (Rapoport et al., 1995; Beasley, 1997). Die Desensibilisierung der PKC durch PMA hatte jedoch keinen Einfluss auf die Iloprost-medierte COX-2 mRNA Induktion. Diese war mit der Induktion in nicht-vorbehandelten Kontroll-Zellen vergleichbar. Umgekehrt konnte in hSMC die für 24 h mit Iloprost vorbehandelt wurden, durch erneute Stimulation mit Iloprost keine Induktion der COX-2 mRNA Expression erzeugt werden. Die COX-2 mRNA Induktion durch PMA blieb durch die Vorbehandlung mit Iloprost unbeeinflusst. Diese war wiederum mit der Induktion in nicht-vorbehandelten Zellen vergleichbar. Diese Ergebnisse

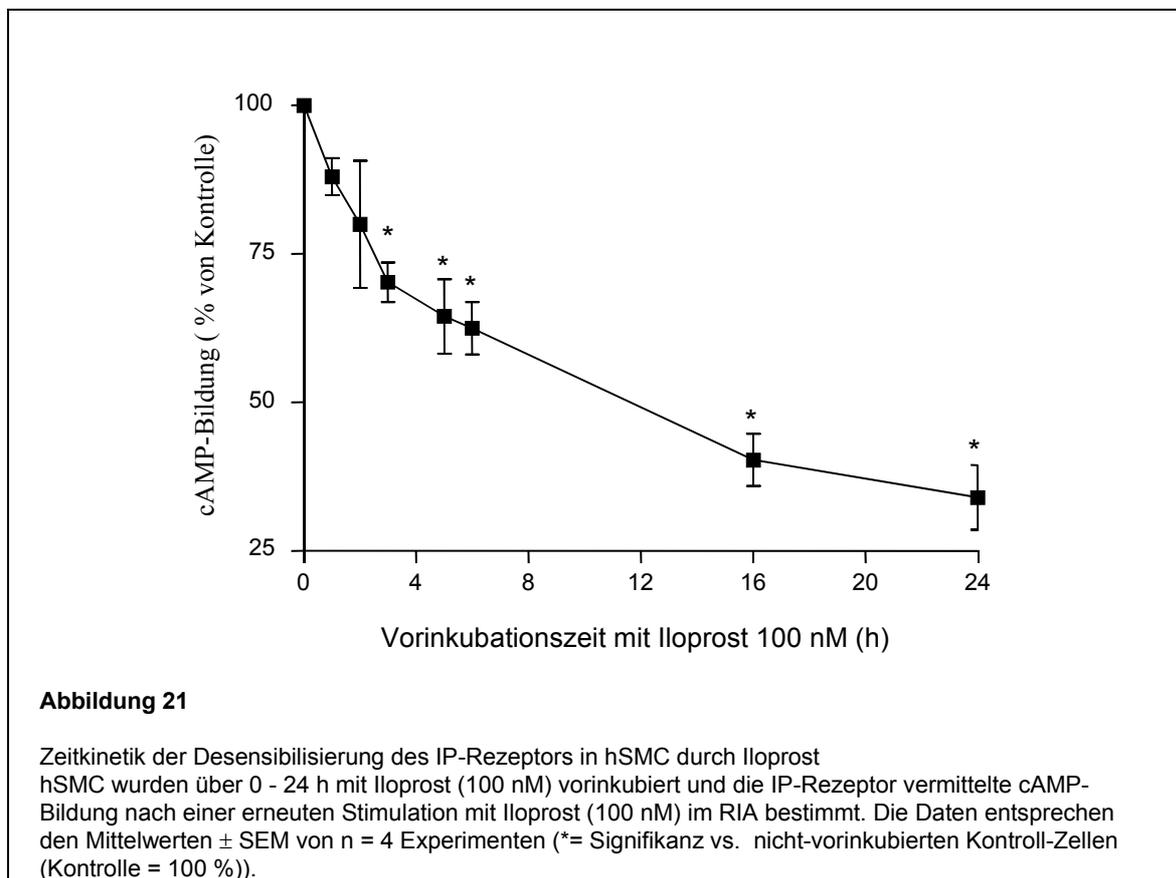
zeigen, dass die Iloprost-vermittelte Induktion der COX-2 mRNA nicht über den Gq- / PKC-Signaltransduktionsweg vermittelt wird. Desweiteren lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass nach einer Vorinkubation von 24 h mit Iloprost eine Desensibilisierung des IP-Rezeptors erfolgt (Nilius et al., 2000), womit die ausbleibende Induktion der COX-2 mRNA bei erneuter Zugabe von Iloprost erklärt werden könnte.



3.1.3.4 Untersuchungen zur Desensibilisierung des IP-Rezeptors

Die Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. So tritt z.B. bei einer kontinuierlichen Stimulation des IP-Rezeptors mit einem spezifischen Agonisten eine Desensibilisierung des Rezeptors ein, die sich durch eine verminderte Signaltransduktion und damit in einer verminderten cAMP-Bildung äußert (Smyth et al., 2000; Nilius et al., 2000). Da die Induktion der COX-2 mRNA durch Iloprost konzentrationsabhängig, also abhängig von der Menge des gebildeten cAMPs erfolgt, ist es denkbar, dass die eintretende Desensibilisierung des IP-Rezeptors beim Abschalten der COX-2 Expression nach langfristigen Iloprost-Stimulationen eine Rolle spielen könnte. Die Desensibilisierung des IP-Rezeptors in hSMC wurde daher im cAMP-Assay untersucht. Dazu

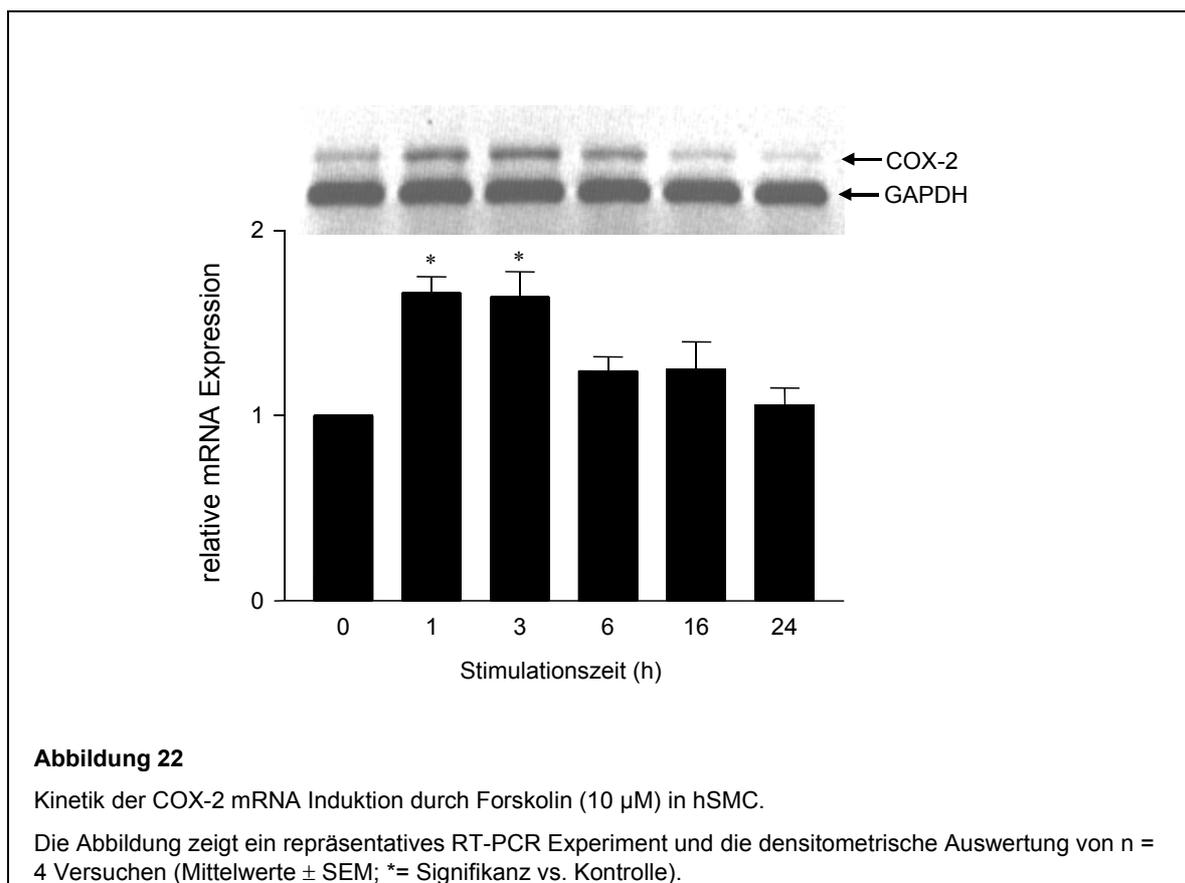
wurden die Zellen über 0–24 h mit Iloprost (100 nM) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, erneut mit Iloprost stimuliert und über 10 min die IP-Rezeptor vermittelte cAMP-Bildung gemessen (Abb. 21). Die cAMP-Bildung in nicht-vorinkubierten Kontroll-Zellen wurde als maximale (= 100 %) cAMP-Bildung betrachtet und die cAMP-Bildung in den Iloprost-vorbehandelten Zellen wurde zu diesem Wert in Relation gesetzt. Verglichen mit Kontroll-Zellen (2012 ± 163 pmol / mg Protein x 10 min) setzte nach einer Vorinkubation von 3 h eine signifikante Verminderung der cAMP-Bildung auf 70 % ein. Nach 6 h war die cAMP-Bildung auf 62 % (1260 ± 143 pmol / mg Protein x 10 min) reduziert, nach 24 h auf 34 % (698 ± 150 pmol / mg Protein x 10 min). Diese Daten belegen somit eine Desensibilisierung des IP-Rezeptors in hSMC, die mit einer verminderten Bildung von cAMP einhergeht.



Betrachtet man allerdings die Absolut-Werte der cAMP-Bildung, so scheint die Menge des gebildeten cAMPs nach langfristiger Iloprost-Stimulation jedoch nicht allein der ausschlaggebende Faktor für das Abschalten des COX-2 mRNA Signals zu sein. So induziert

Iloprost z.B in einer Konzentration von 1 nM in nicht-vorbehandelten Zellen eine Expression der COX-2 mRNA. Im RIA ergab sich bei dieser Konzentration ein Anstieg des cAMP-Gehalts auf 351 ± 29 pmol / mg Protein x 10 min (siehe Abb. 16). Im Vergleich dazu induzierte Iloprost nach 24 stündiger Vorinkubation einen Anstieg des cAMP-Spiegels auf 698 ± 150 pmol / mg Protein x 10 min, erzeugte jedoch keine Induktion von COX-2 mRNA. Somit werden nach 24 stündiger Vorinkubation noch ausreichende Konzentrationen von cAMP gebildet, die in nicht-vorbehandelten Zellen eine Induktion von COX-2 mRNA bewirken.

Desweiteren wurde die Kinetik der COX-2 mRNA-Induktion mit Forskolin ($10 \mu\text{M}$) in der RT-PCR (Qiagen OneStep RT-PCR-Kit) untersucht (Abb. 22). Forskolin, als rezeptor-unabhängiger Aktivator der Adenylat-Zyklase, erzeugte eine zeitabhängige Induktion der COX-2 mRNA, die mit der Kinetik der COX-2 mRNA Induktion durch Iloprost vergleichbar war (vgl. Abb. 11).



Dieses Ergebnis spricht ebenfalls gegen eine maßgebliche Beteiligung der IP-Rezeptor Desensibilisierung an der Regulation der Iloprost-medierten COX-2 mRNA Expression.

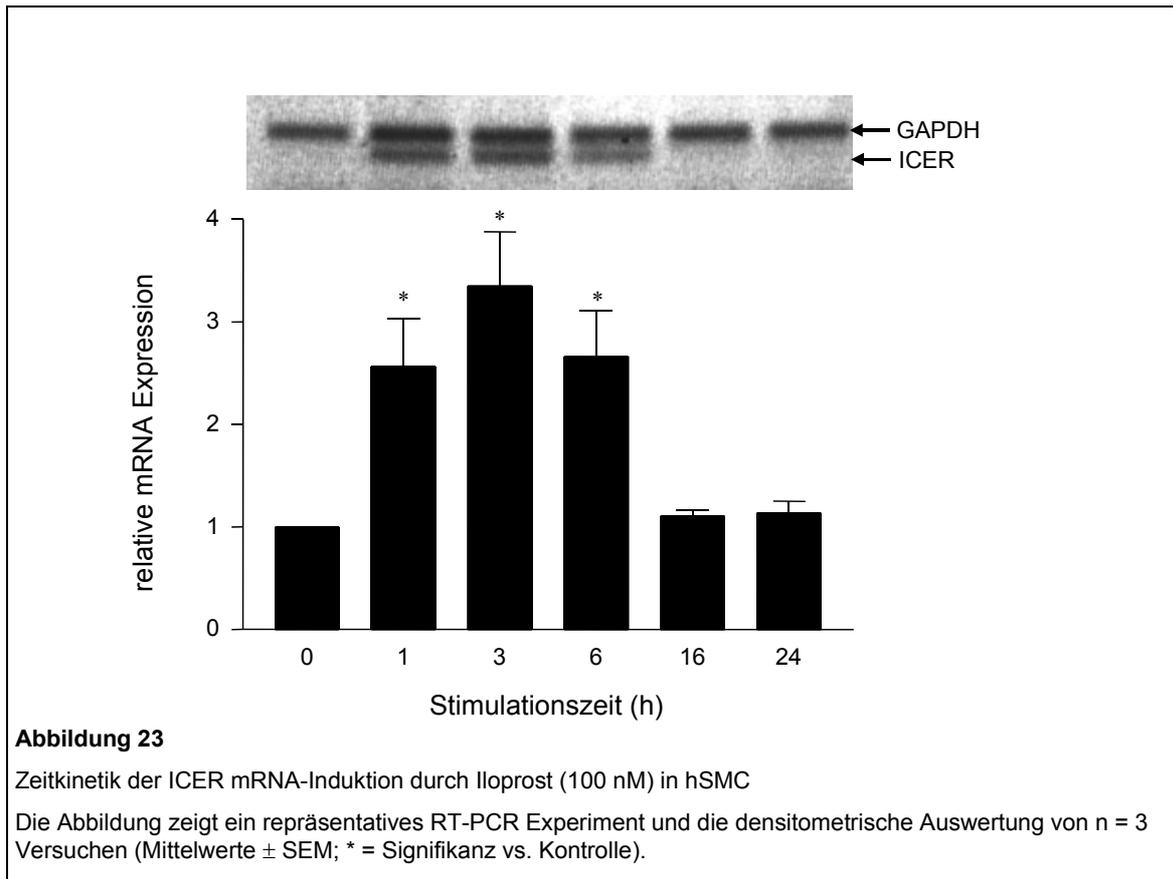
Vielmehr müssen an der Regulation der COX-2 mRNA Expression andere Mechanismen beteiligt sein, die zum Abschalten bzw. zur fehlenden Neuaktivierung der COX-2 Expression führen.

3.1.3.5 Untersuchungen zur Regulation des Transkriptions-Repressors Inducible cAMP Early Repressor (ICER)

Die Kontrolle der COX-2 Expression wird durch verschiedene posttranskriptionelle Mechanismen reguliert. So besitzt die COX-2 mRNA in ihrer 3' untranslatierten Region verschiedene Polyadenylierungs-Signale und Instabilitätssequenzen (AUUUA-Sequenzen), die eine Degradation des Transkriptes bewirken, womit die zeitabhängige Expression von COX-2 mRNA und Protein erklärt werden kann. Einen weiteren möglichen Regulations-Mechanismus bietet die Induktion von Transkriptions-Repressoren. Für die Regulation cAMP-induzierbarer Gene ist in diesem Zusammenhang die Induktion von ICER beschrieben (Foulkes et al., 1991; Molina et al., 1993).

ICER wird cAMP-abhängig über einen internen Promotor des CREM-Gens (cAMP responsive element modulator) induziert, der einen Cluster von vier hintereinander geschalteten CRE-Bindestellen enthält. ICER blockiert spezifisch die Transkription cAMP-induzierbarer Gene, indem es als Homo- oder Heterodimere mit CREB- oder CREM-Proteinen, an die CRE-Elemente der entsprechenden Promotoren bindet. Dabei kommt es über einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus auch zur Repression des ICER-Promotors (Molina et al., 1993).

Die Induktion von ICER unter dem Einfluss von Iloprost wurde mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Es zeigte sich, vergleichbar zur COX-2 Kinetik, eine transiente Induktion von ICER mRNA zwischen 1 und 6 h (Abb. 23). Die Induktion von ICER könnte daher einen Regulations-Mechanismus der Iloprost-medierten COX-2 Expression darstellen. Denkbar wäre eine Repression des COX-2 Promotors durch ICER z.B. nach einer langfristigen Stimulation mit Iloprost (16-24 h), womit das Ausbleiben einer erneuten Iloprost-medierten Induktion von COX-2 mRNA begründet werden könnte.



3.2 Genexpressions-Analysen mit Iloprost an hSMC

3.2.1 Genexpressions-Analysen der Einzelexperimente

In der Genexpressions-Analyse wurden diverse Kriterien, die der Qualitätssicherung der Array-Experimente dienen, bestimmt (Tabelle 12). Darunter befinden sich der Vergleich der "Background-Values" der Einzelexperimente, die Kontrolle der Hybridisierungsqualität des Array-Experiments über den "Absolut Call" der Spike-Kontrollen bioB, bioC, bioD und cre, sowie die Kontrolle der Qualität der in-vitro Transkription und cDNA-Synthese über die Quotienten der "Average Difference" (AD)-Werte der "Housekeeping"-Kontrollen GAPDH und Actin. Wie aus Tabelle 12 zu entnehmen ist, bestehen zwischen den "Background Values" der Einzelexperimente keine großen Differenzen, d.h. die Signalintensitäten die durch Autofluoreszenz der Arrayoberfläche, oder durch nicht-spezifische Bindungen der cRNA und der SAPE-Lösung zustande kommen, sind in allen 4 Einzelexperimenten vergleichbar. Die "Spike"-Kontrollen bioB, bioC, bioD und cre haben in allen 4 Einzelexperimenten im "Absolut Call" den Status "Present". Somit ist für jedes Array-

Experiment eine ausreichende Hybridisierungsqualität gegeben. Die Quotienten der AD-Werte der "Housekeeping"-Kontrollen (AD 3'/5'GAPDH und 3'/5'Actin) geben Hinweise auf die Qualität der in-vitro Transkription (IVT) und sollten zwischen 1 und 2 liegen. Die Quotienten der "Housekeeping"-Kontrollen lagen in den 4 Array-Experimenten zwischen 0.94 und 1.78, was darauf hinweist, dass die IVT-Reaktionen effizient waren, bzw. dass die mRNA während der cDNA-Synthese weitgehend vollständig transkribiert wurde.

Tabelle 12: Übersicht über die Qualitätskontrollen der Array-Experimente

	<i>Kontrolle 1</i>	<i>Iloprost 1</i>	<i>Kontrolle 2</i>	<i>Iloprost 2</i>
Background Value	344	329	379	405
Spike Kontrollen	<i>Absolut Call</i>	<i>Absolut Call</i>	<i>Absolut Call</i>	<i>Absolut Call</i>
bioB	Present	Present	Present	Present
bioC	Present	Present	Present	Present
bioD	Present	Present	Present	Present
cre	Present	Present	Present	Present
Housekeeping- Kontrollen				
AD 3'/5'GAPDH	1.15	1.46	0.94	1.04
AD 3'/5'Actin	1.35	1.78	0.97	1.00

3.2.2 Vergleichende Genexpressions-Analyse

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene unter dem Einfluss von Iloprost in hSMC (100 nM, 6 h) wurde eine vergleichende Genexpressions-Analyse der Array-Experimente durchgeführt (siehe 2.10.2). Es wurden jeweils die Kontroll-Experimente mit den entsprechenden Iloprost-Experimenten verglichen: Iloprost 1 vs. Kontrolle 1 (= Experiment 1); Iloprost 2 vs. Kontrolle 2 (= Experiment 2). In Tabelle 13 sind die Ergebnisse der vergleichenden Analyse beider Experimente dargestellt. Es wurden insgesamt 93 Gene gefunden, deren Expression unter dem Einfluss von Iloprost in mindestens einem Experiment um den Faktor ≥ 2 verändert wurden. Die quantitativen Veränderungen der Expression sind als "Fold Change" (FC) angegeben. Es wurden nur solche Gene berücksichtigt, die im Vergleich zur Kontrolle in beiden Experimenten einen "Difference Call" (DC) von entweder "Increase" (I) oder "Decrease" (D) aufwiesen. Gene die einen DC von "Marginal Increase", "No Change", oder "Marginal Decrease" aufwiesen sind nicht aufgeführt (Ausnahme: M27281, daher in der Tabelle mit * gekennzeichnet). Desweiteren sind in der Tabelle

angegeben, die "Average Difference" (AD) Werte (quantitativer Parameter der Expression der Transkripte) und der "Absolut Call" (AC) (qualitativer Parameter für die Detektion eines Transkripts). Unter den 93 Genen war die Expression von 46 Genen im Vergleich zur Kontrolle vermindert (negativer FC, D) und von 47 Genen erhöht (positiver FC, I). Die Gene wurden mit den entsprechenden Accession-Nummern (Acc-Nr.) für eine bessere Übersicht in funktionelle Gruppen einsortiert.

Tabelle 13: Ergebnisse der vergleichenden Genexpressions-Analysen

Rot-markierte Accession-Nummern weisen auf Gene hin, die in dieser Arbeit einer weiteren Analyse unterzogen wurden. Blau-markierte Accession-Nummern weisen auf Gene hin, die im ersten Teil der Arbeit analysiert wurden und durch die Array-Analyse nochmals bestätigt wurden.

GEN ACC-NR.	BESCHREIBUNG	EXPERIMENT 1				EXPERIMENT 2			
		AD	AC	DC	FC	AD	AC	DC	FC
Wachstumsfaktoren / Hormone									
U25997	stanniocalcin precursor (STC)	4759,5	P	I	24,8	2283,6	P	I	13,7
M92934	connective tissue growth factor	14060	P	D	-3,3	4734,6	P	D	-8
X57579t	activin beta-A subunit	18287	P	I	2,9	11017	P	I	3
U43142	vascular endothelial growth factor related protein (VRP)	45,2	A	D	-2,6	46,4	A	D	-7,6
*M27281	vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor)	894,2	A	I	3	1934,4	P	NC	1,7
D14874	adrenomedullin	1716,8	P	D	-2,1	1826,8	P	D	-1,8
X52599	beta nerve growth factor	422,1	A	D	-2,3	404,9	P	D	-3
Zell-Zyklus									
U61836	putative cyclin G1 interacting protein	1498,4	P	I	7	3352,6	P	I	17
U05681	proto-oncogene BCL3 gene	1812,9	P	I	2,7	3533,4	P	I	3
L13698	gas1 gene	4265,7	P	I	2,5	2074,5	P	I	2,5
M60974	Human growth arrest and DNA-damage-inducible protein (gadd45)	1430,9	P	D	-2,6	795,9	P	D	-6
Immunsystem									
M26683	Monocyte Chemotactic Protein 1	2950,9	P	D	-5,9	299,8	P	D	-9,6
Y00081	(BSF-2/IL6) gene for B cell stimulatory factor-2	3378,2	P	I	4,5	3145,2	P	I	1,9
X04500	gene for prointerleukin 1 beta	1655,4	P	I	4,4	812,3	P	I	5,1

X97748	PTX3 gene promotor region	6057,8	P	D	-3,9	14167	P	D	-3,1
X04602	interleukin BSF-2 (B-cell differentiation factor)	3078,7	P	I	3,3	4111,3	P	I	1,8
M63838	interferon-gamma induced protein (IFI 16)	448,9	P	D	-2,5	364,5	P	D	-2,5
U59863	TRAF-interacting protein I-TRAF	253,7	P	D	-2,6	258,8	P	D	-2,8
Protein Kinasen									
HG2167- HT2237	Protein Kinase Ht31, cAMP-dependent	1975,9	P	I	2,9	1706,5	P	I	2,5
X76104	DAP-kinase	641,7	P	D	-2,1	248,4	P	D	-2,8
Phosphatasen									
X68277	protein tyrosine phosphatase (MKP-1)	14982	P	I	4,4	10354	P	I	2,8
X82676	tyrosine phosphatase	96,1	A	D	-2,4	-20,5	A	D	-2,3
GTPasen									
S82240	RhoE=26 kda GTPase homolog	1045,5	P	D	-5,9	686,1	P	D	-5,8
M12174	ras-related rho mRNA	834,5	P	I	3,2	1757,7	P	I	5,7
Phosphodiesterasen									
U40372	3',5 cyclic nucleotide phosphodiesterase	-41,1	A	D	-4,9	425,7	P	D	-2,7
L20971	phosphodiesterase	593,9	P	I	3,8	156,8	A	I	2
Proteasen									
U60521	protease proMch6 (Mch6)	1049,5	P	I	4,8	1195,2	P	I	7,5
Rezeptoren									
U12767	mitogen induced nuclear orphan receptor (MINOR)	4001,4	P	I	19,7	893,3	P	I	5,6
U67784	orphan G protein-coupled receptor	1744,4	P	I	9	2074,3	P	I	5,4
X01060	transferrin receptor	18251	P	I	4	9397,5	P	I	1,9
M11507	transferrin receptor	8799,1	P	I	3,7	5525,4	P	I	3,2
HG4582- HT4987	Glucocorticoid Receptor, Beta	214,6	P	D	-3,1	334,6	P	D	-2,5
Y07909	Progression Associated Protein	384,7	P	D	-3,1	443,3	P	D	-3,7
M21574	platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) mRNA	3829	P	D	-2,1	2869,9	P	D	-2,2
M27492	interleukin 1 receptor mRNA	5730,8	P	I	1,8	3220,7	P	I	2
L20859	leukemia virus receptor 1 (GLVR1)	4334,3	P	I	1,7	3444,1	P	I	2
M97675	transmembrane receptor (ror1)	1565,5	P	D	-1,8	711,3	P	D	-4,3
Transkriptionsfaktoren									
U70663	zinc finger transcription factor hEZF (EZF)	2203,9	P	I	12,2	1624,7	P	I	2,4

S68271	CREM=cyclic AMP-responsive element modulator	1274,5	P	I	6,9	1907	P	I	8,5
D15050	transcription factor AREB6	1749,4	P	I	6,4	1773,5	P	I	3,8
D89377	MSX-2	1145,9	P	I	6,1	891,8	P	I	5,6
D14826	hCREM (cyclicAMP-responsive element modulator) type 2 protein	1189,5	P	I	5,6	1390,9	P	I	7,4
X51345	jun-B mRNA for JUN-B protein	2696,8	P	I	5,5	3917,8	P	I	5,9
U20734	transcription factor junB (junB)	1014,9	P	I	5,2	2057,6	P	I	6,2
M60721	homeobox gene	-326,8	A	D	-4,8	189,7	A	D	-4,2
U65093	msg1-related gene 1 (mrg1)	1005	A	D	-2,4	1593,9	P	D	-3,6
U44975	DNA-binding protein CPBP (CPBP)	806,3	A	D	-4	-60,4	A	D	-3,2
X60486	H4/g gene for H4 histone	136,4	A	D	-3,9	-132,1	A	D	-3,1
L13391	helix-loop-helix basic phosphoprotein (G0S8)	600	P	I	3,9	1279,4	P	I	7,7
M69043	MAD-3 mRNA encoding I κ B-like activity	4584,6	P	I	2,7	3242,3	P	I	2,3
U59831	transcription factor, forkhead related activator 4 (FREAC-4)	359,1	A	D	-3	847,3	P	D	-1,9
D43638	MTG8a protein	241,6	A	D	-2,5	146,8	A	D	-3,6
M97935	transcription factor ISGF-3	2389,6	P	D	-1,6	162,1	A	D	-3,2
Nukleasen									
U88964	HEM45	1106,9	P	I	3,3	1179,2	P	I	3,7
Transporter									
M20681	Human glucose transporter-like protein-III (GLUT3)	1958	P	I	5	4928,2	P	I	3,6
U51478	sodium/potassium-transporting ATPase beta-3 subunit	21438	P	I	3,3	14106	P	I	1,9
Zytoskelett									
HG2259-HT2348	Tubulin, Alpha 1, Isoform 44 - Also Represents: X06956	6602,9	P	I	13	7691,8	P	I	14,5
X06956	HALPHA44 gene for alpha-tubulin	4310,5	P	I	8,5	6145,6	P	I	12,5
U47634	beta-tubulin class III isotype (beta-3)	4132,1	P	I	3,5	3877,9	P	I	5,3
HG4322-HT4592	Tubulin, Beta	2631,5	P	I	2,7	4692,4	P	I	2,5
Extrazellular-Matrix									
U62015	Cyr61	109,5	A	D	-17,1	265,9	A	D	-18,8
M31166	tumor necrosis factor-inducible (TSG-14) mRNA	3209,7	P	D	-3	7858,8	P	D	-2
U54804	Has2	390,7	P	I	2,6	1811,8	P	I	9

Lipide / Lipidumsatz										
M64497	apolipoprotein AI regulatory protein (ARP-1)	329,2	P	D	-2,2	500,4	P	D	-3,5	
U04636	Cyclooxygenase-2	321,7	P	I	2,8	935,1	P	MI	4,7	
X58377	adipogenesis inhibitory factor	588,9	P	I	4,3	867,5	P	I	6,1	
Hämostase										
J03764	plasminogen activator inhibitor-1 gene, exons 2 to 9	6530,1	P	D	-4,1	7882,3	P	D	-4,8	
X04729	plasminogen activator inhibitor type 1 N-terminus	4040,2	P	D	-2,5	4506,7	P	D	-3,7	
Antioxidantien										
X06985	heme oxygenase	22267	P	I	2,3	8677,9	P	I	2,4	
metabolische Enzyme										
S52028	cystathionine gamma-lyase {clone HCL-1}	1552,2	P	I	7,8	654,7	P	I	3,8	
U94332	osteoprotegerin (OPG) mRNA	1073	P	D	-3,7	2444,1	P	D	-2	
X16396	NAD-dependent methylene tetrahydrofolate dehydrogenase cyclohydrolase (EC 1.5.1.15)	798,6	P	D	-2,2	1831,2	P	D	-2	
D50840	ceramide glucosyltransferase	644,8	P	D	-2,8	1637,9	P	D	-3,1	
Tumorgenese										
U43916	tumor-associated membrane protein homolog (TMP)	138,9	A	D	-5,1	586,7	P	D	-1,9	
U28749	high-mobility group phosphoprotein isoform I-C (HMGIC)	56,4	A	D	-4	96,7	A	D	-2,3	
U16954	(AF1q) mRNA	6138	P	I	3	6029,2	P	I	2,3	
X82209	MN1 mRNA	3054	P	I	1,7	5236,4	P	I	2	
M74088	APC	189,2	A	D	-2,2	152,1	A	D	-2,5	
M80244	E16 mRNA	3474	P	I	4	12483	P	I	5,3	
L33930	CD24 signal transducer	1214,6	P	I	3,8	535	P	I	3,8	
HG2724-HT2820	Oncogene Tls/Chop, Fusion Activated	732,8	P	D	-3,4	478,6	A	D	-12,7	
HG3342-HT3519	Id1 - also represents: S78825	6078,5	P	I	2,3	3706,1	P	I	2,3	
Y11306	hTcf-4 gene extracted from H.sapiens mRNA for beta catenin/TCF-4	627,1	P	I	1,8	2043,5	P	I	2,3	
U53446	mitogen-responsive phosphoprotein DOC-2	3376,8	P	D	-1,9	2951,3	P	D	-2,9	
U53445	ovarian cancer downregulated myosin heavy chain homolog (Doc1)	1067,9	P	D	-1,7	548,7	P	D	-2	

Signaltransduktion										
U32114	caveolin-2	1267,2	P	D	-1,5	2121,5	P	D	-2	
U43899	signal transducing adaptor molecule STAM	572,7	P	D	-2,1	550,3	P	D	-2,2	
U27768	RGP4 mRNA	1374	P	D	-4,1	1614,1	P	D	-5	
Andere / Unbekannte										
D31888	mRNA for KIAA0071 gene	715,8	P	I	3,4	1095,6	P	I	2	
D14695	mRNA for KIAA0025 gene	1314,7	P	D	-2,8	2162,9	P	D	-2,8	
U35048	TSC-22 protein	6814,1	P	I	2,3	3355,5	P	I	2	
D50917	mRNA for KIAA0127 gene	477,2	P	D	-2,5	576,7	P	D	-2,5	
HG3111- HT3287	Autoantigen (Gb:S67069)	59,8	A	D	-2,8	1,8	A	D	-1,7	
D50911	mRNA for KIAA0121 gene	3627,7	P	I	2,3	3623,2	P	I	1,7	
K02574	purine nucleoside phosphorylase (PNP)	5355,2	P	I	2,3	4368,6	P	I	1,6	
S73591	brain-expressed HHCPA78 homolog	3199,2	P	D	-1,9	2735,8	P	D	-2,1	
U40992	heat shock protein hsp40 homolog	89	A	D	-1,8	235,1	A	D	-2,9	

3.2.3 Überprüfung und Verifizierung der Array Daten mittels RT-PCR Analyse

Zur Überprüfung der Array-Daten und für eine weitere Analyse der Iloprost-mediierten Genregulation, wurde die Expression 8 verschiedener Gene mittels RT-PCR untersucht. Darunter befinden sich 3 Gene mit proatherogenen Eigenschaften (CYR61; MCP-1 und PAI-1), deren Expression durch Iloprost vermindert wurde, 3 Gene die mit atheroprotektiven Wirkungen von Iloprost assoziiert werden können (MKP-1, VEGF, hEZF) und deren Expression unter dem Einfluss von Iloprost erhöht wurde. Weiterhin wurden 2 Gene untersucht (HAS-2, STC), deren Expression durch Iloprost erhöht wurde, aber deren physiologischen Bedeutung, bzw. Funktion in hSMCs nicht eindeutig geklärt ist.

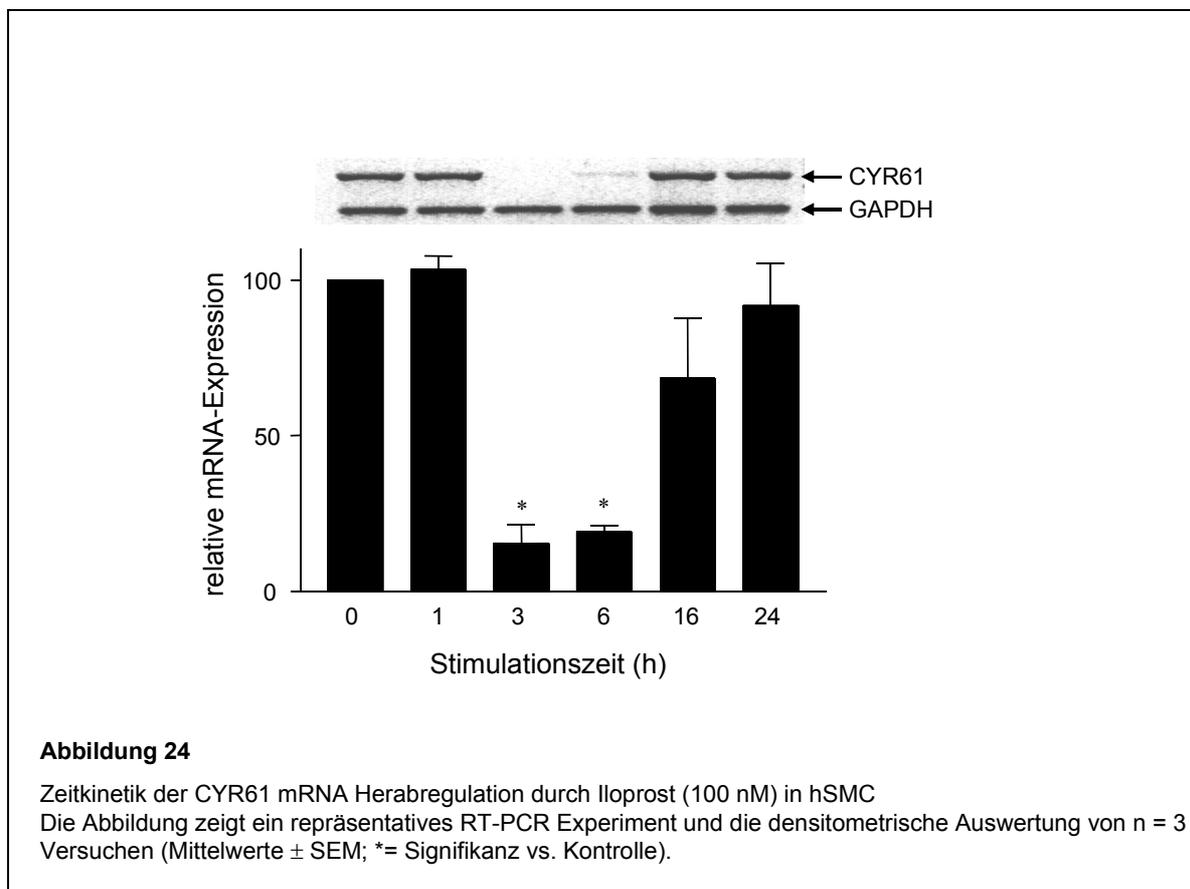
3.2.3.1 Cystein rich angiogenic Protein (CYR61)

CYR61 (Acc-Nr. U62015) ist ein "immediate early gene" dass z.B. durch Serum und Wachstumsfaktoren induziert werden kann (Chen et al., 2000). CYR61 gehört zur sogenannten CCN (CYR61, CTGF, NOV) Familie; es handelt sich dabei um sekretorische Proteine, die mit der extrazellulären Matrix (ECM) assoziiert sind (Brigstock 1999). CYR61 vermittelt die Adhäsion und Migration von Fibroblasten und Endothelzellen und unterstützt ausserdem die Wachstumsfaktor-induzierte DNA-Synthese in Fibroblasten (Kireeva et al.,

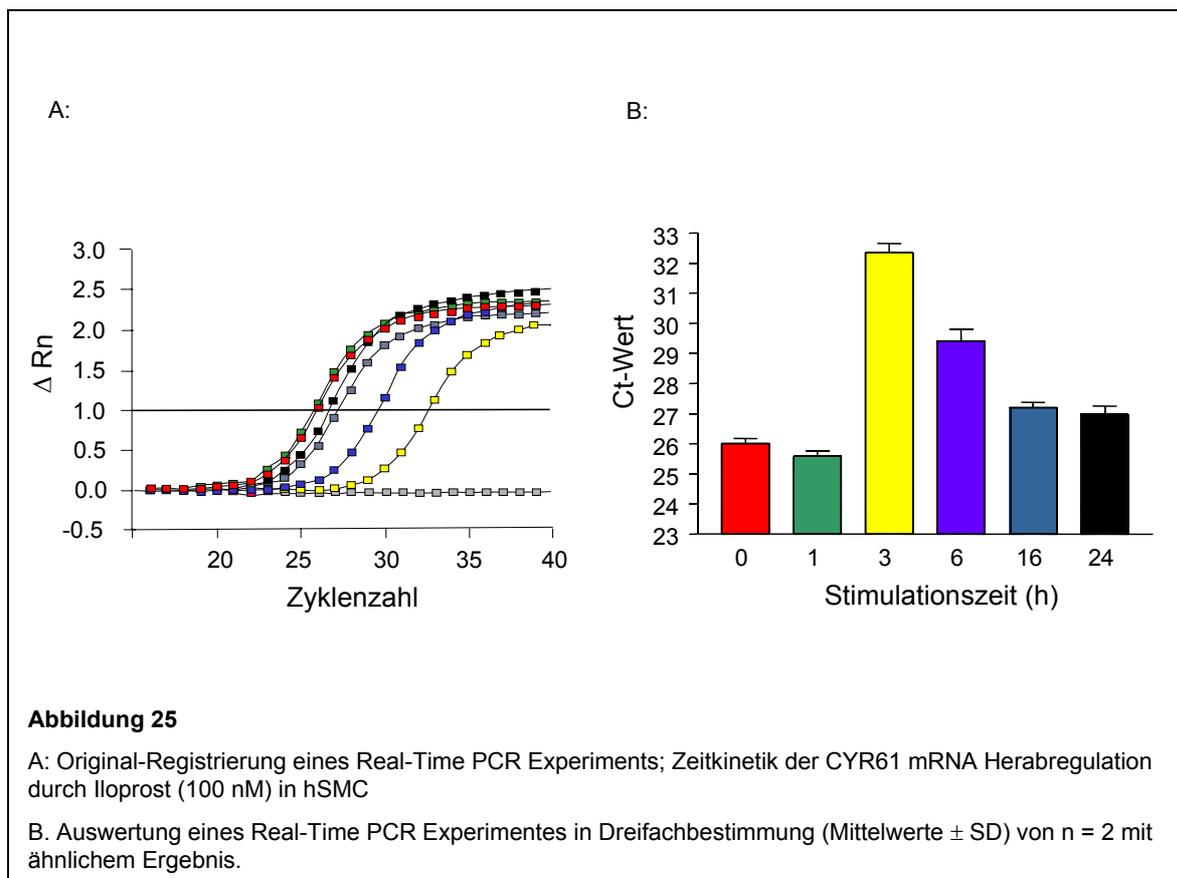
1996; Chen et al., 2001). In der Neointima von Arterien, die durch Ballon-Dilatation verletzt wurden, konnte eine starke Expression von CYR61 nachgewiesen werden, was auf eine Beteiligung an der Entstehung von Restenosen hinweist (Wu et al., 2000). Desweiteren ist für den Connective Tissue Growth Factor (CTGF), einem weiteren Mitglied der CCN-Familie, eine erhöhte Expression in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen worden (Oemar et al., 1997).

3.2.3.1.1 Herabregulation der CYR61 mRNA Expression durch Iloprost

Nach den Ergebnissen der Array-Analyse wird die Expression von CYR61 durch die Stimulation mit Iloprost (100 nM) stark vermindert. In der vergleichenden Genexpressions-Analyse ergab sich ein "Fold Change" von -17.7 (Experiment 1) bzw. -18.8 (Experiment 2). Mittels RT-PCR wurde die zeitabhängige Herabregulation der CYR61 mRNA durch Iloprost untersucht (Abb. 24). Es zeigte sich eine starke Abnahme der relativen CYR61 mRNA-Expression über einen Zeitraum von 3-6 h. Nach 24 stündiger Stimulation mit Iloprost kehrte die CYR61 Expression wieder auf Basalwerte zurück.

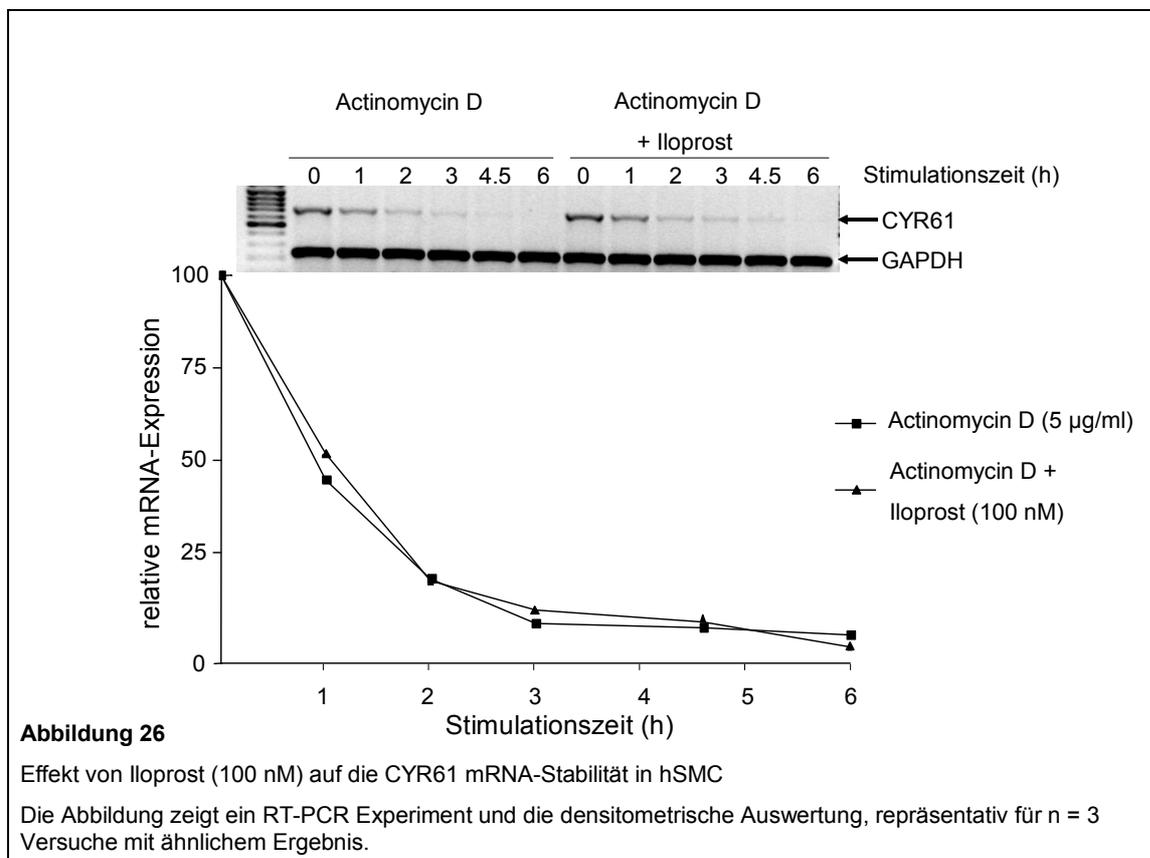


Die zeitabhängige Herabregulation der CYR61 mRNA durch Iloprost (100 nM) wurde desweiteren mittels Real-Time PCR an zwei unabhängigen RNA-Präparationen überprüft. In der Original-Registrierung der Real-Time Experimente (Abb. 25A) zeigte sich eine deutliche Rechtsverschiebung der Kurven für die 3 und 6 h–Werte nach Iloprost-Stimulation, was auf eine Abnahme der CYR61 mRNA hinweist. Nach 16 stündiger Stimulation zeigten die Kurven wieder einen ähnlichen Verlauf wie die Kurven der Kontrolle. In der Auswertung ergab sich im Vergleich zur Kontrolle (26.01 ± 0.17 , Versuch 1; 25.1 ± 0.74 , Versuch 2) nach 3 stündiger Iloprost-Stimulation eine Erhöhung der Ct-Werte auf 32.36 ± 0.3 (Versuch 1) und 28.97 ± 0.96 (Versuch 2). Nach 6 stündiger Iloprost-Stimulation ergaben sich Ct-Werte von 29.41 ± 0.34 (Versuch 1) und 27.91 ± 0.15 (Versuch 2). Die Ct-Werte sind umgekehrt proportional zur Menge des Transkriptes, d.h. je weniger Transkript vorliegt, desto höher sind die Ct-Werte. Die Daten aus den Real-Time Experimenten stimmen somit gut mit den Daten aus den RT-PCR Analysen überein und zeigen, dass die in dieser Arbeit verwendeten RT-PCR Analyse eine geeignete Methode zur Verifizierung der Array-Daten darstellt.



3.2.3.1.2 Untersuchungen zum Mechanismus der Herabregulation der CYR61 mRNA Expression durch Iloprost

Die Herabregulation der CYR61 mRNA durch Iloprost könnte auf zwei Mechanismen zurückzuführen sein. Entweder wird die Transkription des CYR61 Gens gehemmt, oder es erfolgt eine Destabilisierung der CYR61 mRNA und somit ein verstärkter Abbau des Transkriptes. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde der Einfluss des Transkriptions-Inhibitors Actinomycin D auf die Halbwertszeit der CYR61 mRNA untersucht. Dazu wurden hSMC entweder mit Actinomycin D (5 µg/ml) allein oder zusammen mit Iloprost (100 nM) für 1–6 h inkubiert und die Abnahme der CYR61 mRNA mittels RT-PCR analysiert. In An- oder Abwesenheit von Iloprost zeigten sich ähnliche Kinetiken für die Abnahme der relativen CYR61 mRNA-Expression (Abb. 26). Bei Actinomycin D behandelten hSMC betrug die Halbwertszeit der CYR61 mRNA ca. 52 min. In Gegenwart von Iloprost lag die Halbwertszeit bei ca. 62 min. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Iloprost-medierte Herabregulation der CYR61 mRNA nicht auf einer verstärkten Degradation des Transkriptes beruht, sondern auf einer Inhibition der CYR61-Transkription zurückzuführen ist.



Zur Überprüfung, ob es sich bei der Hemmung der CYR61-Expression durch Iloprost ebenfalls um einen cAMP-abhängigen Mechanismus handelt, wurde der Einfluss von Forskolin und dbcAMP mittels RT-PCR untersucht (Abb. 27). Durch Forskolin (10 μ M) und dbcAMP (1 mM) wurde eine vergleichbare Reduktion der CYR61 mRNA erreicht wie durch Stimulation mit Iloprost (100 nM). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Iloprost-medierte Herabregulation der CYR61 mRNA cAMP-abhängig erfolgt.

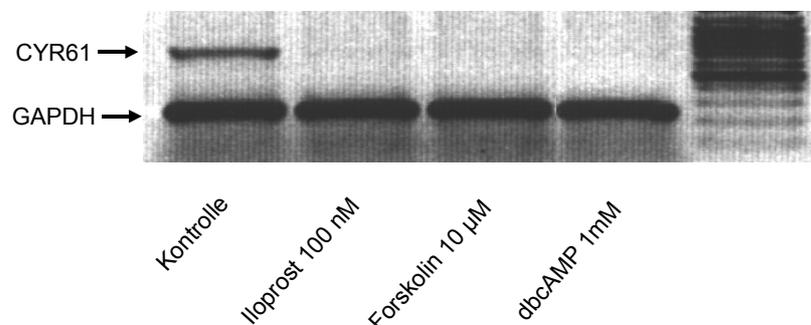


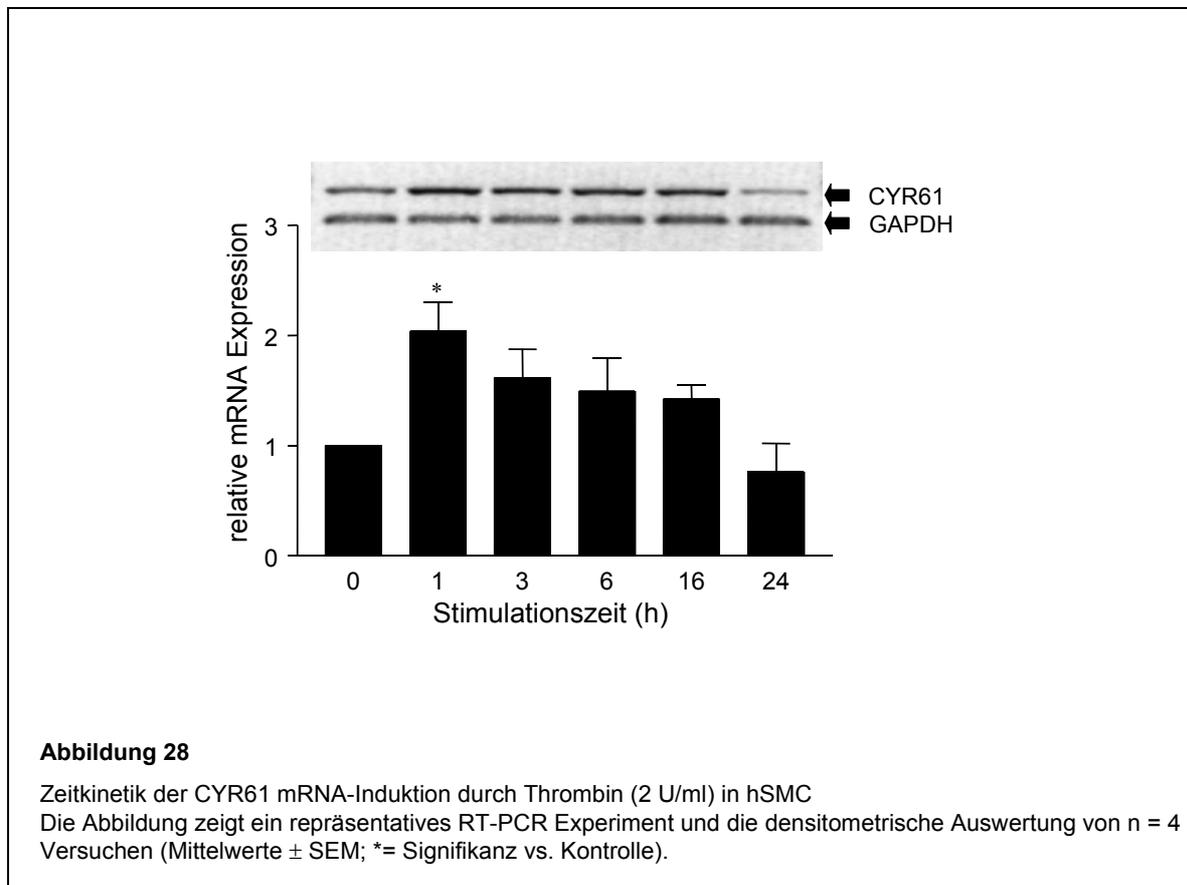
Abbildung 27

cAMP-Abhängigkeit der CYR61 mRNA Herabregulation nach 3 stündiger Stimulation in hSMC
Gezeigt ist ein repräsentatives RT-PCR Experiment von $n = 3$ mit ähnlichem Ergebnis.

3.2.3.1.3 Effekt von Thrombin auf die CYR61 mRNA Expression

Die Serin-Protease Thrombin ist nicht nur ein Teil der Blutgerinnungskaskade, sondern auch ein potenter Stimulus für die Mitogenese und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (Nelken et al., 1992). Da über die Regulation von CYR61 in humanen glatten Gefäßmuskelzellen nur wenig bekannt ist, wurde im folgenden Versuch der Einfluss von Thrombin auf die Expression von CYR61 mittels RT-PCR untersucht (Abb. 28). Für die Stimulation wurde Thrombin in einer Proliferations-fördernden Konzentration von 2 U/ml eingesetzt (Bydlowski et al., 1998; Patterson et al., 1999). Thrombin (2 U/ml) erzeugte eine transiente Aufregulation

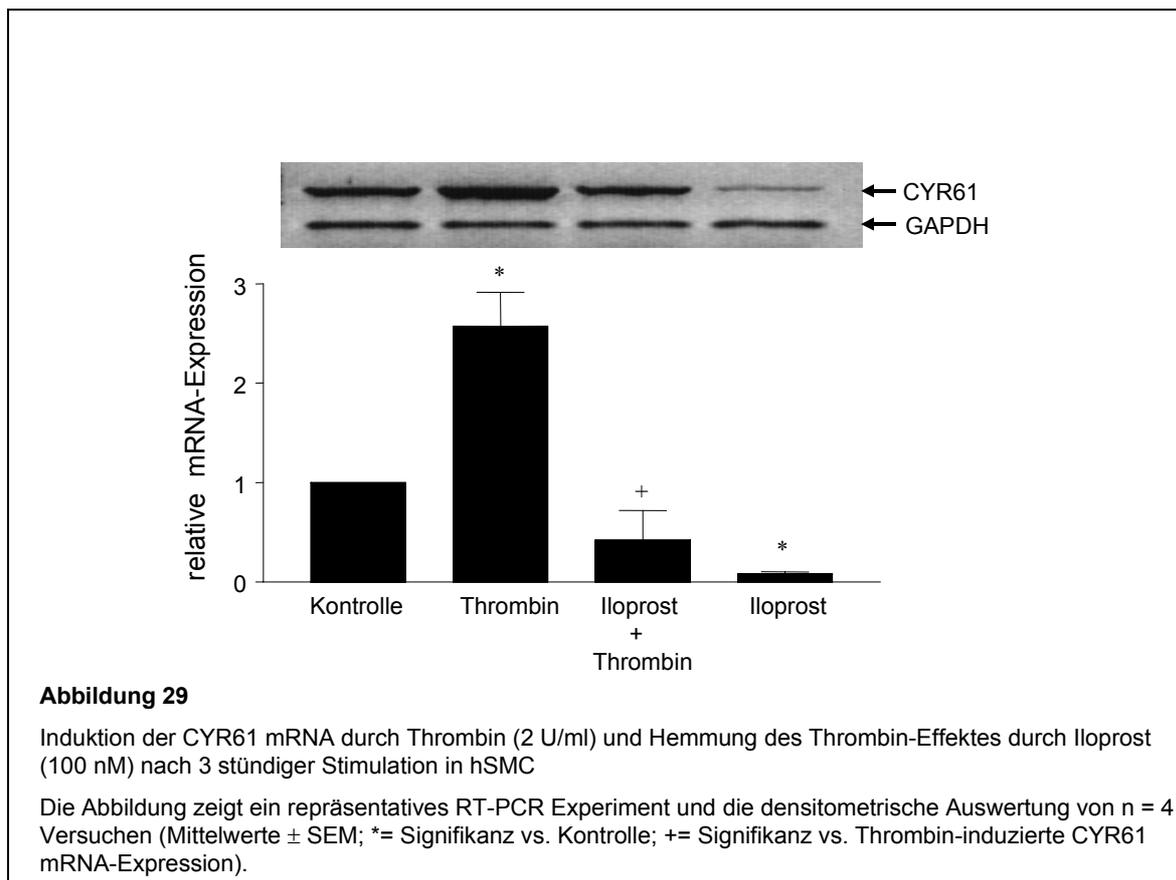
der CYR61 mRNA Expression über einen Zeitraum von 1-16 h. Nach 24 h erreichte das CYR61 mRNA-Niveau wieder Basalwerte.



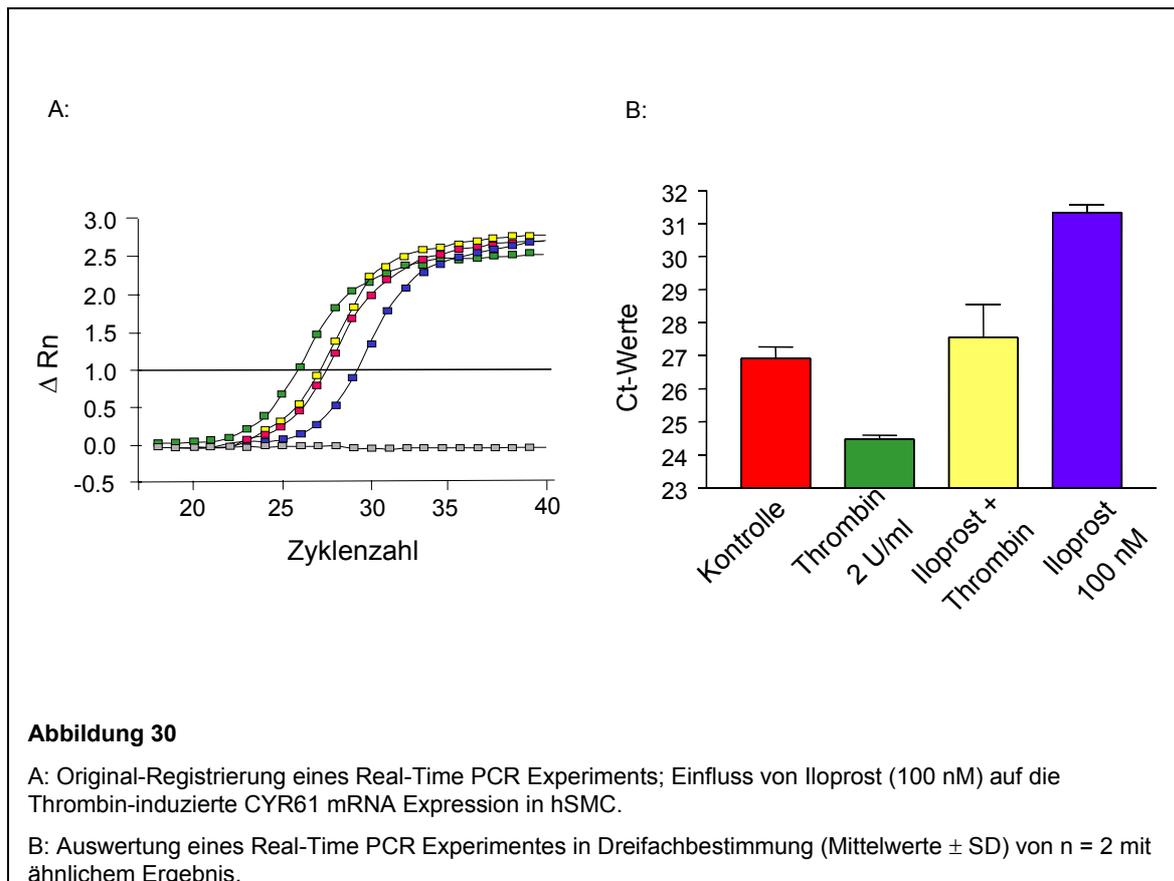
3.2.3.1.4 Effekt von Iloprost auf die Thrombin-induzierte CYR61 mRNA Expression

Nachdem eine Aufregulation der CYR61 mRNA durch Thrombin gezeigt werden konnte, wurde im folgenden Versuch der Effekt von Iloprost auf die Thrombin-induzierte CYR61 mRNA untersucht (Abb. 29). Nach 3 stündiger Stimulation von hSMC mit Thrombin (2 U/ml) erfolgte eine Erhöhung der relativen CYR61 mRNA-Expression um den Faktor 2.45 ± 0.25 gegenüber Kontroll-Zellen. Bei Ko-Inkubation mit Iloprost (100 nM) wurde die Thrombin-vermittelte Induktion der CYR61 mRNA komplett gehemmt; gegenüber Kontroll-Zellen betrug die relative CYR61 mRNA-Expression 0.61 ± 0.27 . Iloprost alleine verringerte die relative CYR61 mRNA-Expression auf 0.09 ± 0.02 vs. Kontrolle. Diese Daten zeigen, dass Iloprost nicht nur die basale Expression von CYR61 vermindert, sondern auch der Aufregulation der CYR61 mRNA durch Thrombin entgegenwirken kann. Die Iloprost-medierte Herabregulation der CYR61 mRNA, sowie die Hemmung der Thrombin-

induzierten CYR61-Expression könnten somit einen möglichen Mechanismus für die antiproliferativen und antimigratorischen Wirkungen von Iloprost darstellen. Interessanterweise wurde auch die Expression von CTGF (Acc-Nr. M92934) durch Iloprost in hSMC vermindert. In der vergleichenden Genexpressions-Analyse ergab sich ein "Fold Change" von -3.3 (Experiment 1) bzw. -8 (Experiment 2).



Der Effekt von Thrombin auf die CYR61 mRNA Induktion, sowie der Einfluss von Iloprost auf die Thrombin-induzierte CYR61 Expression wurde in der Real-Time PCR nochmals an zwei unabhängigen RNA-Präparationen überprüft und bestätigt (Abb. 30). Im Gegensatz zu nicht-behandelten Kontroll-Zellen (Ct-Wert 26.92 ± 0.34 Versuch 1; 27.23 ± 0.21 Versuch 2) ergab sich nach Stimulation mit Thrombin (2 U/ml; 3 h) eine Verringerung der Ct-Werte auf 24.48 ± 0.11 (Versuch 1) bzw. 25.91 ± 0.18 (Versuch 2) was auf eine Induktion der CYR61 mRNA durch Thrombin hinweist. Bei einer Ko-Inkubation von Thrombin mit Iloprost erreichten die Ct-Werte wieder Kontroll-Niveau (27.55 ± 1.0 Versuch 1; 26.87 ± 0.28 Versuch 2). Die Ergebnisse der Real-Time PCR korrelieren somit gut mit den Ergebnissen aus der RT-PCR-Analyse.

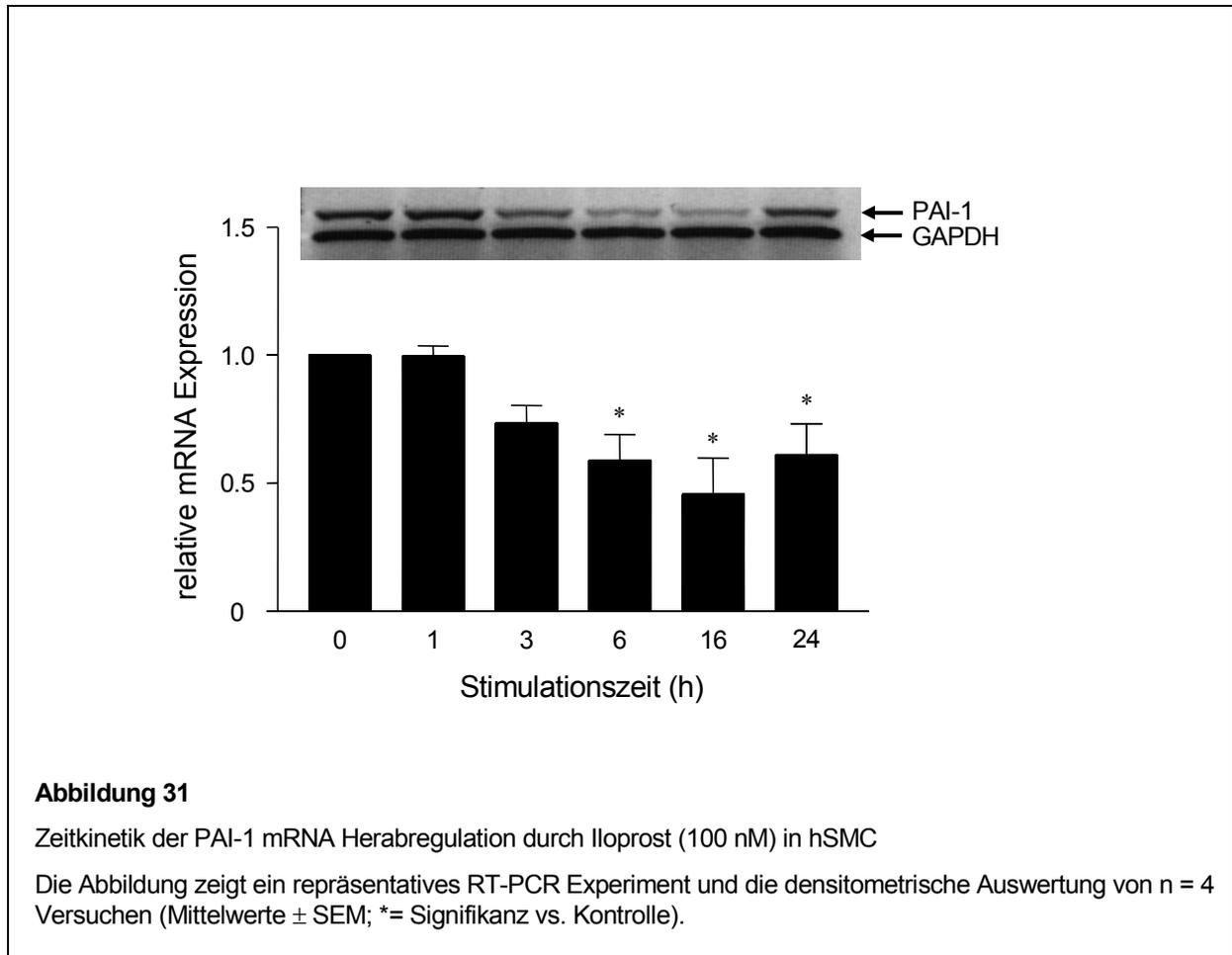


3.2.3.2 Plasminogen Activator-Inhibitor I (PAI-1)

PAI-1 ist ein 50 kDa Glycoprotein, das von vaskulären Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen gebildet wird (Eitzman et al., 1997) und im Plasma und in Thrombozyten zu finden ist. PAI-1 ist der primäre physiologische Inhibitor des "tissue-type Plasminogen-Aktivators" (tPA) und hemmt die Spaltung und somit Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin, welches für den Abbau von Fibrin verantwortlich ist. Erhöhte PAI-1 Spiegel im Plasma und in der Gefäßwand sind mit vaskulären Erkrankungen wie der Atherosklerose und dem Myokard-Infarkt assoziiert (Schneidermann et al., 1992; Sobel et al., 1998). Darüber hinaus fördert eine verminderte fibrinolytische Aktivität den Prozess der Atherogenese, da die Entstehung von Thromben und die Ablagerung von Fibrin in atherosklerotische Läsionen begünstigt wird (Nordt et al., 1999).

Die Expression von PAI-1 (Acc-Nr. J03764) wurde unter dem Einfluss von Iloprost vermindert und könnte somit einen antiatherosklerotischen Effekt darstellen. In der vergleichenden Genexpressions-Analyse ergab sich ein "Fold Change" von -4.1 (Experiment 1) bzw. -4.8 (Experiment 2). Im folgenden Versuch wurde die zeitabhängige Herabregulation

der PAI-1 mRNA durch Iloprost (100 nM) untersucht (Abb. 31). Es zeigte sich eine Abnahme der relativen PAI-1 mRNA-Expression zwischen 6 und 24 h, mit der stärksten Reduktion nach 16 stündiger Stimulation mit Iloprost.

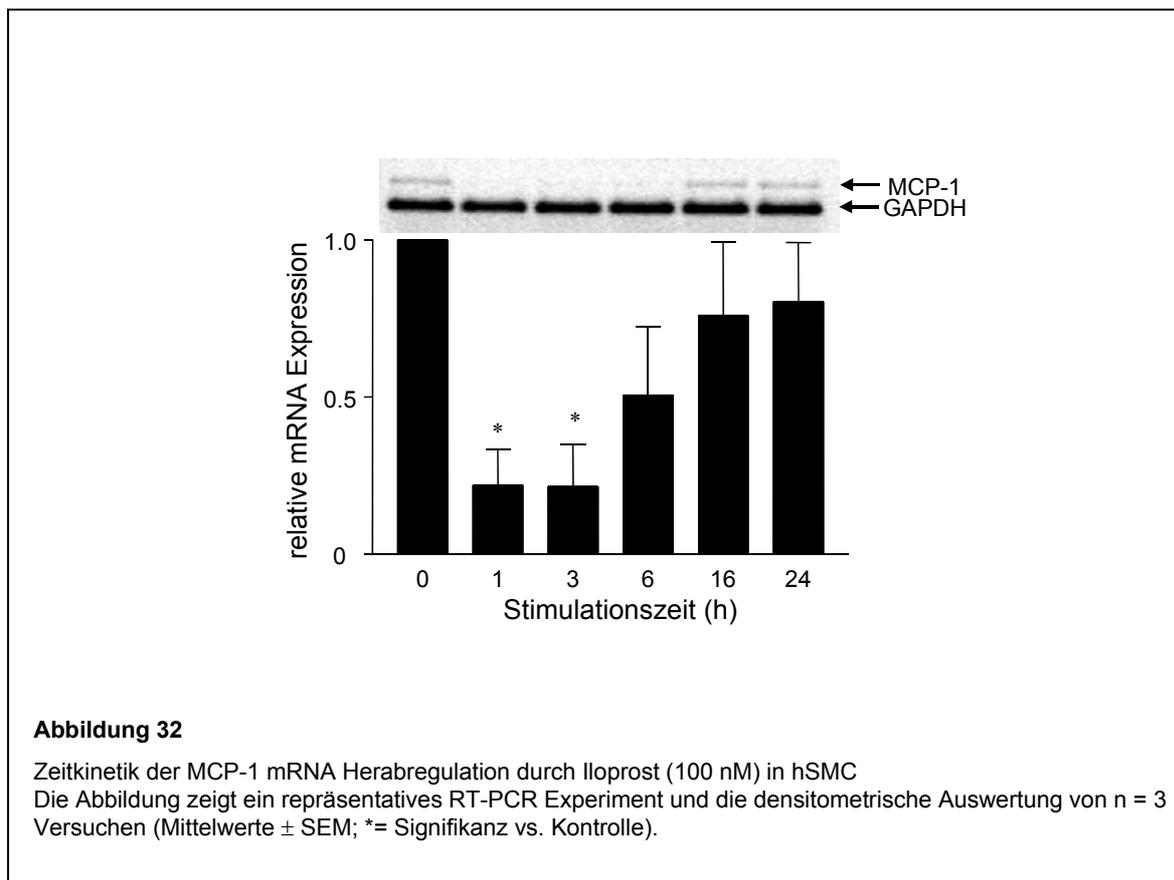


3.2.3.3 Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1)

Chemotaktische Zytokine (Chemokine) sind lösliche Proteine mit einer molekularen Masse von 8 – 16 kDa. Chemokine werden aufgrund ihrer Position von Cystein (C)-Seitenketten in in 3 Subgruppen unterteilt: Alpha (C-X-C), Beta (C-C) und Gamma (C). Die Chemokine der Beta-Subgruppe, darunter MCP-1, sind potente chemotaktische Stimuli für Monozyten (Valente et al., 1984). Die Anlockung von Monozyten nach einer Schädigung der Endothel-Zellschicht, sowie die Migration von Monozyten in die Gefäßwand wird als initialer Schritt bei der Entstehung der Atherosklerose angesehen (Blankenberg et al., 2001).

Die Expression von MCP-1 (Acc-Nr. M26683) wurde unter dem Einfluss von Iloprost (100 nM, 6 h) vermindert und könnte einen weiteren Aspekt der atheroprotektiven Wirkung

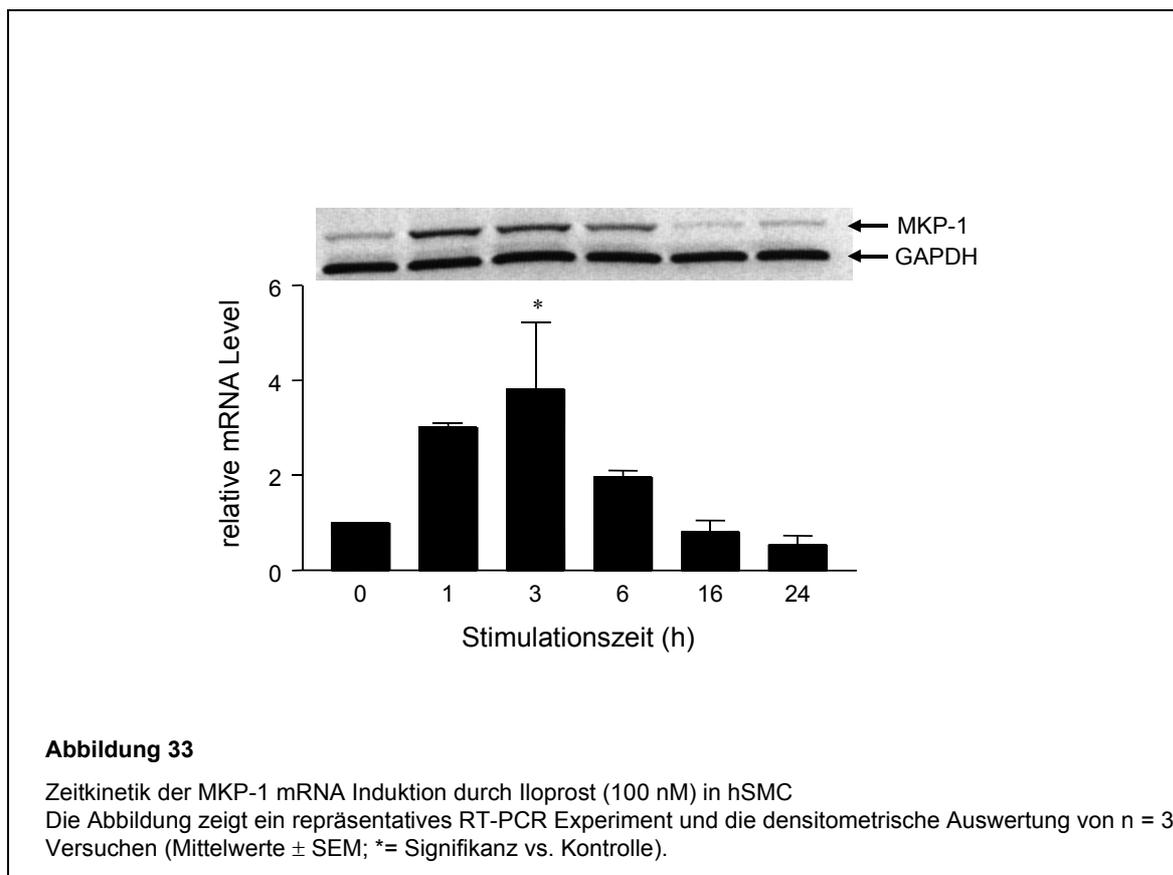
von Iloprost darstellen. In der vergleichenden Genexpressions-Analyse ergab sich ein "Fold Change" von -5.9 (Experiment 1) bzw. -9.6 (Experiment 2). In der RT-PCR Analyse ergab sich eine zeitabhängige Abnahme der relativen mRNA Expression zwischen 1 und 6 h, mit der stärksten Reduktion nach 1-3 h (Abb. 32). Nach 24 stündiger Stimulation erreichte die relative MCP-1 mRNA Expression nahezu wieder Kontroll-Werte.



3.2.3.4 MAP-Kinase Phosphatase-1 (MKP-1)

Die MKP-1 (CL100) ist eine dualspezifische-Phosphatase (DSP), die zur Superfamilie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) gehört. Die dualspezifischen Phosphatasen sind "immediate early genes" deren Genexpression schnell durch Wachstumsfaktoren und zellulären Stress induziert werden kann (Keyse et al., 1992; Charles et al., 1992). Die MKP-1 inaktiviert durch Dephosphorylierung die Signaltransduktions-Kaskaden von Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) wie der Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK; Duff et al., 1995), der c-Jun N-terminal Kinase (JNK; Chu et al., 1996) und der p38 MAPK (Liu et al., 1995). Die Induktion von MKPs wird daher als Gegenregulations-Mechanismus angesehen, womit proliferativen Stimuli entgegen gewirkt werden kann.

Die Expression der MKP-1 (CL100, Acc-Nr. X68277) wurde in hSMC durch Stimulation mit Iloprost (100 nM) induziert. In der Array-Analyse ergab sich ein "Fold Change" von 4.4 (Experiment 1) bzw. 2.8 (Experiment 2). In der RT-PCR Analyse (Abb. 33) zeigte sich eine zeitabhängige Induktion der MKP-1 mRNA über einen Zeitraum von 1-6 h, mit einer maximalen Induktion nach 3 stündiger Stimulation mit Iloprost. Die relative mRNA-Expression kehrte nach 16 h wieder auf Ausgangswerte zurück. Diese Ergebnisse zeigen, dass Iloprost eine Induktion der MKP-1 bewirkt, was auf einen antiproliferativen Wirkungsmechanismus schließen lässt.



3.2.3.5 Human epithelial / endothelial zinc finger transcription factor (hEZF)

hEZF ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der aufgrund seiner hochkonservierten C-terminalen Region mit drei Cystein₂-Histidin₂ Zinkfinger-Motiven und einer Prolin-reichen N-terminalen Domäne zur Krüppel-Familie der Transkriptionsfaktoren gezählt wird (Anderson et al., 1995). Die Krüppel-ähnlichen Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Genregulation wie z.B. Zell-Wachstum und Differenzierung. hEZF ist das humane Homolog des "gut-enriched Krüppel-like factor" der Maus (GKLF), der eine wichtige Rolle bei der Regulation der Wachstumsarretierung durch Repression der Cyclin D1 Expression spielt

(Shie et al., 2000). Shields et al., (1996) zeigten in wachstums-arretierten Fibroblasten eine starke Expression von GKLf, während in Fibroblasten die sich in der exponentiellen Phase der Zell-Proliferation befanden, die Expression von GKLf am geringsten war. Darüberhinaus wurde durch Überexpression des GKLf-Gens in den Fibroblasten eine Inhibition der DNA-Synthese beobachtet. Für humane Endothelzellen ist ebenfalls eine Expression von hEZF als Transkriptions-Repressor beschrieben (Yet et al., 1998). In glatten vaskulären Gefäßmuskelzellen ist über eine Expression von hEZF nichts bekannt. In den vergleichenden Genexpressions-Analysen zeigte sich eine gesteigerte Expression von hEZF (Acc-Nr. U70663) nach Iloprost-Stimulation (100 nM). Es ergab sich ein "Fold Change" von 12.2 (Experiment 1), bzw. 2.4 (Experiment 2). Die Analyse der hEZF-Expression in der RT-PCR (Abb. 34) zeigte eine zeitabhängige Erhöhung der relativen mRNA-Expression über einen Zeitraum von 1–6 h. Die Erhöhung der hEZF-Expression in hSMC durch Iloprost gibt einen weiteren Hinweis auf die IP-Rezeptor vermittelte Wachstums-Inhibition.

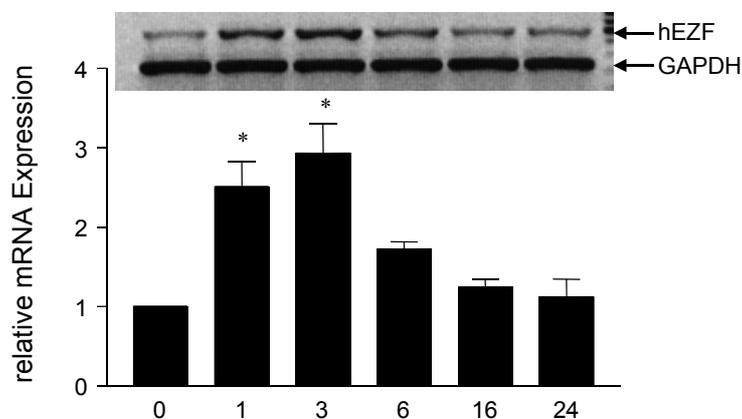


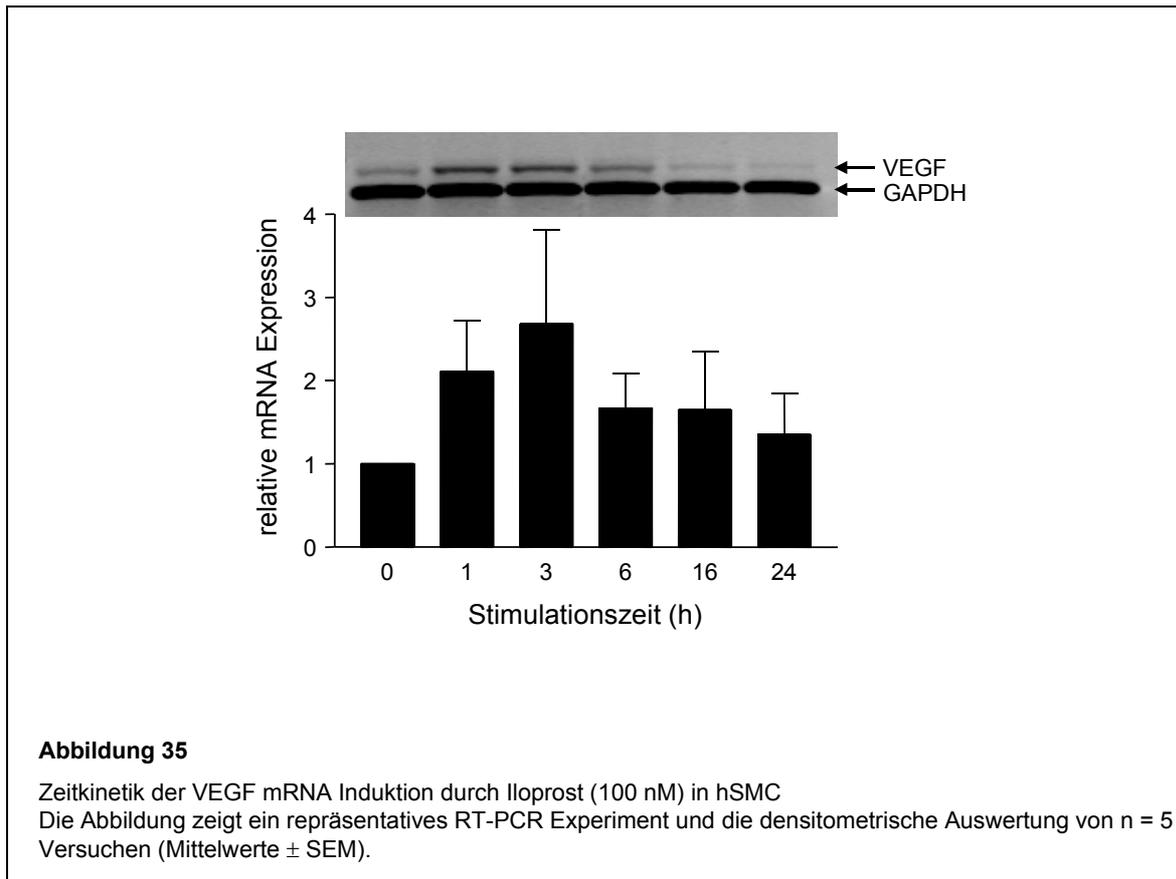
Abbildung 34

Zeitkinetik der hEZF mRNA Induktion durch Iloprost (100 nM) in hSMC
Die Abbildung zeigt ein repräsentatives RT-PCR Experiment und die densitometrische Auswertung von n = 4 Versuchen (Mittelwerte \pm SEM; * = Signifikanz vs. Kontrolle).

3.2.3.6 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

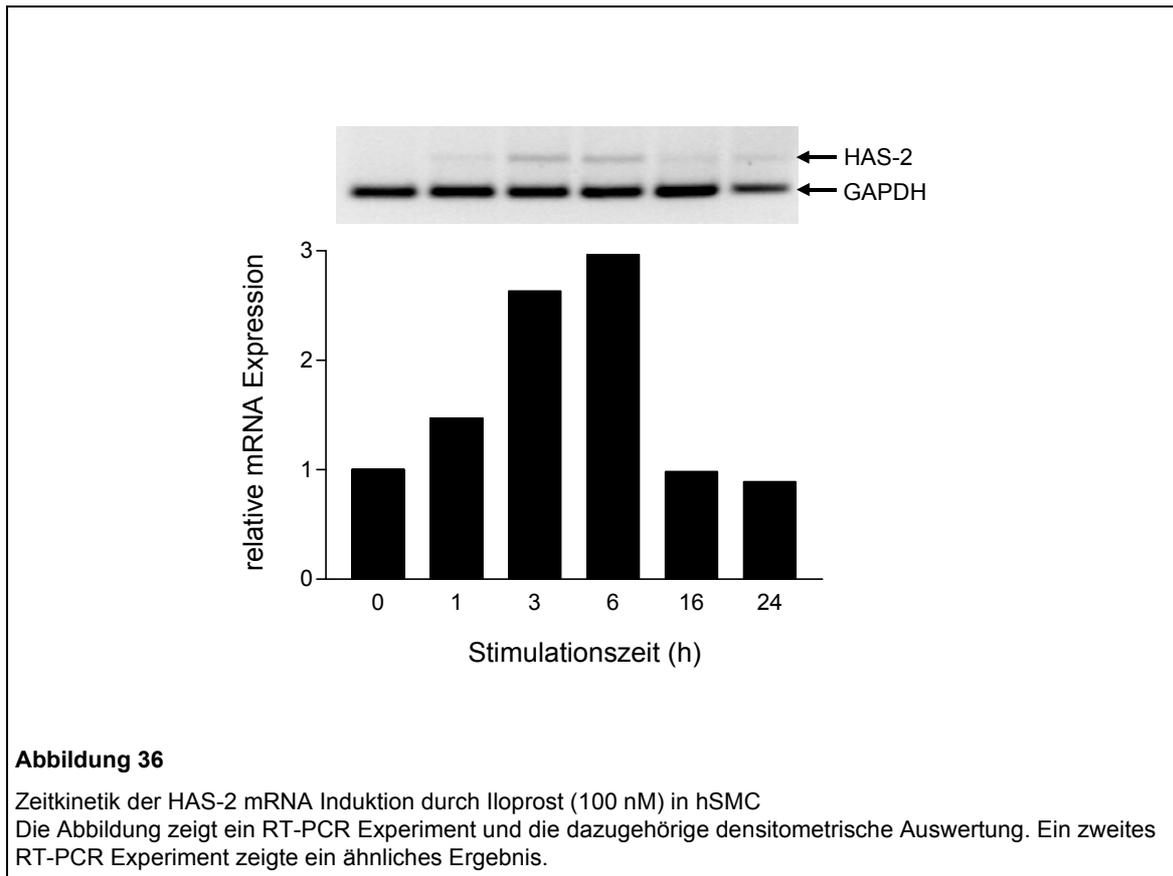
VEGF ist ein Angiogenese-Faktor, der zur Gruppe der Peptid-Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF gehört. Die Bildung von VEGF erfolgt hauptsächlich in vaskulären glatten Muskelzellen und wird durch verschiedene Faktoren wie Hypoxie, Wachstumsfaktoren und Zytokine induziert (Brogi et al., 1994; Stavri et al., 1995). VEGF scheint eine Schlüsselrolle bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen zu spielen, die mit postnataler Angiogenese assoziiert werden, wie z.B. Krebs, rheumatische Arthritis und kardiovaskuläre Erkrankungen (Folkman, 1995). Neben den pathophysiologischen Aspekten wurde in letzter Zeit auch ein vasoprotektiver Effekt von VEGF beschrieben. VEGF wirkt über spezifische Rezeptoren, welche hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert werden. VEGF induziert die NO- und PGI₂-Synthese in Endothelzellen, woraus sich atheroprotektive Effekte wie Proliferations-Hemmung von SMC, Inhibition der Plättchen-Aggregation, sowie Inhibition von Leukozyten-Interaktionen mit dem Endothel und Vasodilatation der Gefäße ergeben (Überblick Zachary 2001).

In der Array-Analyse ergab sich für VEGF (Acc-Nr. M27281) in einem Experiment eine Erhöhung der VEGF-Expression unter dem Einfluss von Iloprost mit einem "Fold Change" von 3.0 (Experiment 1). Im zweiten Experiment blieb die Expression von VEGF laut vergleichender Analyse unverändert; der "Difference Call" war dementsprechend "No Change". Da die Induktion von VEGF durch Iloprost jedoch ein interessanter Befund war, wurde dieses Gen weiterhin in der RT-PCR analysiert. In der Tabelle ist die Acc-Nr. von VEGF mit * markiert, da eigentlich für die weiteren Analysen nur Gene berücksichtigt wurden, die in beiden Experimenten einen "Difference Call" von entweder "Increase" oder "Decrease" aufwiesen. In der RT-PCR Analyse (Abb. 35) ergab sich durch Stimulation mit Iloprost (100 nM) eine zeitabhängige Induktion der VEGF mRNA über einen Zeitraum von 1–6 h.



3.2.3.7 Hyaluronsäure-Synthase 2 (HAS-2)

Hyaluronsäure (HA), ein Heparin-ähnliches Glycosaminglycan, ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix, das in atherosklerotischen Läsionen aufreguliert wird (Evanko et al., 1998; Riessen et al., 1996). HA ist der hauptsächliche Ligand für den Adhäsionsrezeptor CD44, der überwiegend auf inflammatorischen und vaskulären Zellen exprimiert wird. Nach der Bindung von HA an CD44 werden je nach Molekulargewicht der Hyaluronsäure gegensätzliche Wirkungen vermittelt. HA mit niedrigem Molekulargewicht induziert die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (Evanko et al., 1999; Cuff et al., 2001) während hochmolekulare Hyaluronsäure die Proliferation glatter Muskelzellen hemmt (Papakonstaninou et al., 1995). In hSMC induzierte Iloprost (100 nM) eine Erhöhung der Hyaluronsäure-Synthase Expression (Acc-Nr. U54804). In der vergleichenden Array-Analyse ergab sich ein "Fold Change" von 2.6 (Experiment 1) bzw. 9.0 (Experiment 2). In der RT-PCR Analyse (Abb. 36) induzierte Iloprost eine zeitabhängige Induktion der relativen HAS-2 mRNA Expression zwischen 1 und 6 h, die auch nach 24 h noch leicht erhöht war.



3.2.3.8 Stanniocalcin (STC)

Stanniocalcin ist ein Glycoprotein-Hormon, das zuerst in Knochenfischen identifiziert wurde, wo es den Calcium- und Phosphathaushalt reguliert. Ein erhöhter Plasmagehalt an Calcium induziert die Sekretion von Stanniocalcin, womit die Aufnahme von Calcium vermindert wird (Wagner et al., 1991). Eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von Calcium wird als primärer neurotoxischer Mechanismus bei Hirnschädigungen, z.B. durch Ischämie angesehen (Siesjö und Bengtsson, 1989; Kristian und Siesjö 1998). Zhang et al., (2000) zeigten in ischämischen Hirngeweben von Mensch und Ratte eine verstärkte Expression von Stanniocalcin. Darüberhinaus schützte eine gesteigerte Expression von STC in neuronalen Zellen nach Hypoxie vor einem toxischen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Induktion von STC wird daher als protektiver Schutzmechanismus bei Ischämie / oxidativem Stress angesehen.

In hSMC wurde die Expression des Stanniocalcin-Precursors (Acc-Nr. 25997) durch Stimulation mit Iloprost (100 nM) stark induziert. In der vergleichenden Array-Analyse ergab sich ein "Fold Change" von 24,8 (Experiment 1), bzw. 13,7 (Experiment 2). In der RT-PCR Analyse (Abb. 37) induzierte Iloprost eine zeitabhängige Induktion der relativen STC-

Precursor mRNA, mit einem Maximum zwischen 3 und 16 h. Nach 24 stündiger Stimulation kehrten die STC-Precursor mRNA Expression wieder auf Basalwerte zurück.

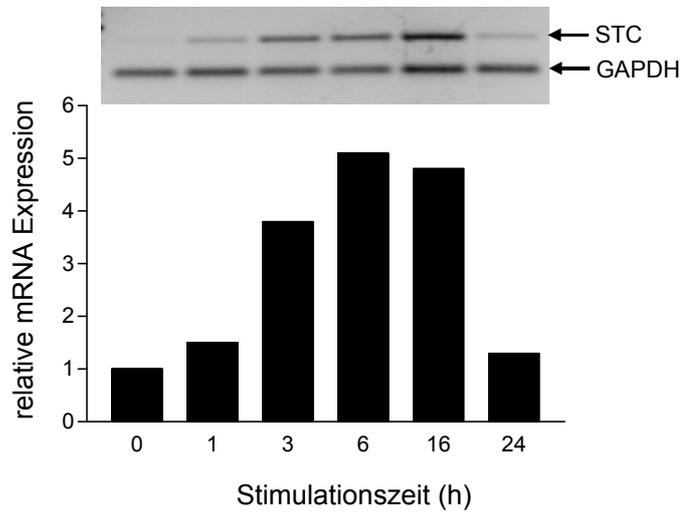


Abbildung 37

Zeitkinetik der STC-Precursor mRNA Induktion durch Iloprost (100 nM) in hSMC

Die Abbildung zeigt ein RT-PCR Experiment und die dazugehörige densitometrische Auswertung. Ein zweites RT-PCR Experiment zeigte ein ähnliches Ergebnis.

4 DISKUSSION

Die Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) sind die Schlüsselenzyme der Prostaglandin-Synthese. Der wichtigste Arachidonsäuremetabolit im vaskulären System ist das Prostacyclin (PGI₂). Die beiden Hauptwirkungen des Prostacyclins, Gefäßdilataion und Hemmung der Thrombozytenaggregation, werden über spezifische Gs-Protein gekoppelte IP-Rezeptoren vermittelt. Zahlreiche vaskuläre Erkrankungen (Bluthochdruck, Präeklampsie, Ischämie und Atherosklerose) sind mit einer Störung des Prostaglandin-Stoffwechsels assoziiert, wobei es häufig zu einer verminderten Bildung von PGI₂ und zu einer überwiegenden Synthese von vasokonstriktorisches Prostaglandinen, z.B. Thromboxan A₂ kommt (Davidge, 2001). Die Regulation der Prostaglandin-Synthese ist daher von großem Interesse. In glatten Gefäßmuskelzellen wird die Induktion der COX-2 mit einer nachfolgenden erhöhten Synthese von PGI₂ als atheroprotektiver Mechanismus angesehen, da es neben der Gefäßdilataion und Hemmung der Thrombozytenaggregation auch die Migration und Proliferation von SMC hemmt, ein Mechanismus der bei der Entstehung der Atherosklerose und bei Gefäßverschlüssen (Stenosen) von großer Bedeutung ist.

4.1 Regulation der COX-2 in humanen SMC

4.1.1 Regulation der COX-2 Expression durch Iloprost und PMA

Der erste Teil der Arbeit befasste sich mit der Regulation der induzierbaren Cyclooxygenase-2 durch das stabile Prostacyclin-Mimetikum Iloprost und durch den Phorbolster Phorbol-12-myristate-13-acetat (PMA). Es ist bekannt, dass die Expression der COX-2 durch zahlreiche Faktoren wie Zytokine (Maier et al., 1990), Endotoxine (Xie et al., 1992), Interleukine (Ristimäki et al., 1994), Wachstumsfaktoren (Habenicht et al., 1985; O'Banion et al., 1992) und Phorbolster (Kujubu et al., 1991; Inoue et al., 1995) induziert werden kann. Phorbolster sind Tumorpromotoren, die aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Diacylglycerin direkte Aktivatoren der Proteinkinase C darstellen. In dieser Arbeit wurde PMA zum einen als Positiv-Kontrolle der COX-2 Induktion, andererseits zur Nachahmung von PKC-abhängigen proatherogenen "inflammatorischen" Stimuli eingesetzt.

Die zeitabhängige Induktion der COX-2 Expression in hSMC wurde mittels RT-PCR und Western-Blot analysiert. PMA bewirkte eine transiente Expression von COX-2 mRNA und -Protein mit einem Maximum zwischen 3 und 6 h. Nach 16 h kehrte die Expression der COX-2 auf Kontroll-Niveau zurück. Das gleiche zeitliche Expressionsmuster zeigte sich bei

der Stimulation der hSMC mit Iloprost. Im Vergleich zu PMA war die Iloprost-induzierte COX-2 Expression jedoch schwächer. Die transiente Expression der COX-2 ist ein typisches Merkmal für sog. "immediate early" Gene, zu deren Familie die COX-2 gehört (Hershman 1991). Ähnliche zeitliche Expressionsmuster der COX-2 sind in zahlreichen Arbeiten mit unterschiedlichen Zell-Linien und Stimuli beschrieben worden: z.B. an Fibroblasten, die mit Serum- (Kujubu et al., 1991; O'Banion et al., 1992) oder PDGF-FF (Winn et al., 1993) stimuliert wurden, an PMA-behandelten Endothelzellen (Hla und Neilson 1992), an Serum-stimulierten SMC der Ratte (Pritchard et al., 1994), sowie an Interleukin 1 β (IL1 β)-stimulierten Monozyten (O'Banion et al., 1992). Die transiente Induktion der COX-2 mit einer schnellen Rückkehr zum Basalwert ist auf verschiedene post-transkriptionelle Mechanismen zurückzuführen. In ihrem 3'-untranslatierten Ende der COX-2 mRNA befinden sich z.B. mehrere Instabilitäts-Sequenzen (AUUUA), über die eine Degradation des mRNA-Transkriptes (Evetts et al., 1993; Ristimäki et al., 1994), sowie eine Inhibition der Translation vermittelt wird (Dixon et al., 2000). Desweiteren müssen Mechanismen wie z.B. die Desensibilisierung der PKC bei andauernder PMA-Stimulation (Rapoport et al., 1995; Beasley, 1997) in Betracht gezogen werden, die ebenfalls zu dem zeitabhängigen Expressionsmuster der COX-2 mRNA beitragen könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass im Gegensatz zur COX-2, die Expression der COX-1 mRNA in hSMC über den gesamten Stimulationszeitraum mit Iloprost unverändert blieb, was auf die konstitutive Funktion dieses Isoenzym hinweist.

Neben der Induktion der COX-2 mRNA und -Protein Expression durch PMA und Iloprost wurde auch ein funktioneller Nachweis der COX-2 Aktivität erbracht. Mittels Radioimmunoassay (RIA) wurde die Synthese von Prostaglandinen nach Stimulation von hSMC mit PMA und Iloprost bestimmt. Als Hauptprodukt der Prostaglandin-Synthese wurde PGI₂ in Form seines stabilen Hydrolyseproduktes 6-keto-PGF_{1 α} identifiziert. PGI₂ wird durch das Enzym PGI₂-Synthase aus PGH₂ gebildet (Narumiya 1999) und ist in der Literatur als das charakteristische von SMC gebildete Prostaglandin beschrieben (Baenzinger et al., 1979; Smith 1986).

Ein weiterer COX-2 Metabolit in hSMC ist PGE₂, welches entweder enzymatisch durch die PGE₂-Isomerase (Jakobsson et al., 1999) gebildet wird, oder durch spontane Isomerisierung entsteht (Nugteren et al., 1980). Im Gegensatz zu 6-keto-PGF_{1 α} konnte PGE₂ in Form seines chemisch stabilen Metaboliten bicyclo-PGE₂ nur marginal nachgewiesen werden, d.h. die

PGE₂-Konzentrationen waren in den Experimenten oft nicht nachweisbar oder lagen an der untersten Nachweisgrenze des RIA und wurden daher nur initial bestimmt (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu anderen Studien an glatten Gefäßmuskelzellen, die eine überwiegende Produktion von PGE₂, gefolgt von PGI₂ zeigten (Bishop-Bailey et al., 1997 und 1998; Pritchard et al., 1994; Karim et al., 1997). Für die PGE₂-Isomerase ist in hSMC eine Induktion durch IL-1 β , TNF α , PMA und LPS beschrieben worden (Soler et al., 2000; Jakobson et al., 1999). Die hier vorliegenden Ergebnisse weisen daher darauf hin, dass in den hier untersuchten SMC entweder keine PGE₂-Isomerase exprimiert wird, oder unter den gewählten Bedingungen nicht induziert wird. Da SMC konstitutiv PGI₂-Synthase exprimieren (Smith 1986) erfolgt die hier gezeigte gesteigerte PGI₂-Synthese in Abhängigkeit von der COX-2 Induktion, was durch die Korrelation der PGI₂-Synthese mit dem zeitlichen Verlauf der COX-2 mRNA und -Protein Expression bestätigt wird. Die Stimulation der hSMC mit Iloprost und PMA führte zu einer gesteigerten PGI₂-Synthese mit einem Maximum zwischen 4.5 und 8 h und kehrte nach 16 h wieder auf Basalwerte zurück.

Bei einer Ko-Inkubation von hSMC mit PMA und Iloprost zeigte sich ein additiv-synergistischer Effekt auf die PGI₂-Synthese. Wie im Western-Blot gezeigt wurde, basiert der synergistische Effekt von Iloprost und PMA auf einer gesteigerten COX-2 Protein Expression. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei einer Ko-Inkubation von Iloprost mit PDGF-BB gemacht (Daten nicht gezeigt). Der Synergismus dieser beiden Stimuli lässt vermuten, dass die PKA- und PKC-Signaltransduktionswege auf transkriptioneller Ebene zusammenwirken und zu einer gesteigerten Expression der COX-2 führen. Eine ähnliche Beobachtung zur synergistischen Induktion der COX-2 wurde mit Lipopolysacchariden (LPS) und PMA von Inoue et al., (1995) an vaskulären Endothelzellen gezeigt. Diese basierte auf einer Beteiligung der Transkriptionsfaktor-Bindestellen NF-IL6 (nuklear factor für interleukin 6) und CRE (cAMP responsive element), die sich im humanen COX-2 Promotor befinden (Kosaka et al., 1994).

Der synergistische Effekt von Iloprost und PKC-Aktivatoren auf die COX-2 Induktion in hSMC mit einer einhergehenden erhöhten Synthese von Prostacyclin könnte die Situation von inflammatorischen Prozessen z.B. bei atherosklerotischen Gefäßveränderungen, oder nach vaskulärer Zellschädigung widerspiegeln. Dort wirken eine Vielzahl von Stimuli, wie proinflammatorische Zytokine, Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) und Wachstumsfaktoren auf

die glatten Gefäßmuskelzellen ein (Ross, 1999), die schließlich eine gesteigerte COX-2 Expression induzieren können (Review Vane et al., 1998). Diese Hypothese wird durch verschiedene Befunde unterstützt. So wurde in humanen atherosklerotischen Läsionen z.B. eine gesteigerte Expression der COX-2 nachgewiesen, während in gesunden Gefäßen nur COX-1 exprimiert wurde (Schönbeck et al., 1999). Zudem konnte nach einer Gefäßverletzung, über mehrere Tage eine gesteigerte COX-2 Expression nachgewiesen werden (Rimarachin et al., 1994). Desweiteren zeigten Belton et al., (2000) an Patienten mit schwerer Atherosklerose eine gesteigerte Prostacyclin-Synthese in atherosklerotischen Plaques. Bei Patienten-Studien mit COX-2 Inhibitoren wurde aber auch gezeigt, dass an gesunden Probanden ca. 70 % der endogenen Prostacyclin-Synthese durch die COX-2 erfolgt (McAdam et al., 1999; Catella-Lawson et al., 1999). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Induktion der COX-2 durch Iloprost mit einer nachfolgenden gesteigerten Synthese von Prostacyclin in hSMC, sowie der synergistische Effekt von PMA auf die COX-2 Expression und Prostacyclin-Synthese, lassen auf einen regulatorischen Rückkopplungs-Mechanismus schließen. Die erhöhte Freisetzung von PGI₂ in hSMC könnte die atheroprotektiven Wirkungen von Prostacyclin, wie Inhibition der Thrombozyten-Aggregation, Inhibition der Monozyten / Makrophagen Adhäsion, sowie Hemmung der SMC-Proliferation und Migration, verstärken.

In den letzten Jahren häufen sich die Hinweise darauf, dass Prostaglandine selbst die Expression der COX-2 beeinflussen können. Allerdings sind in der Literatur sehr unterschiedliche Effekte beschrieben. So induziert PGE₂ z.B. in Makrophagen der Maus (Hinz et al., 2000) und in humanen Monozyten allein keine Induktion der COX-2, zeigt aber einen potenzierenden Effekt auf die COX-2 Expression, wenn die Zellen zuvor mit Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert wurden. In Mesangial-Zellen der Ratte (Nüsing et al., 1996), sowie an Keratinozyten der Maus (Maldve et al., 2000) wurde hingegen ein direkter Effekt von PGE₂ und anderen cAMP erhöhenden Substanzen auf die Induktion der COX-2 beschrieben, was darauf hinweist, dass die Regulation der COX-2 Expression durch Prostaglandine zellspezifisch erfolgen könnte. Die in dieser Arbeit gezeigte Induktion der COX-2 mRNA- und Protein-Expression in hSMC durch das stabile Prostacyclin-Mimetikum Iloprost stehen im Kontrast zu anderen Untersuchungen an glatten Muskelzellen. So zeigten Karim et al., (1997) an glatten Gefäßmuskelzellen des Schweins eine Hemmung der Thromboxan- bzw. bFGF (basic fibroblast growth factor)-induzierten COX-2 Expression durch PGE₂ und cAMP, während das Prostacyclin-Mimetikum Carbacyclin keine deutliche

Hemmung der induzierten COX-2 Expression zeigte. Darüber hinaus hatten PGE₂, Forskolin und dbcAMP alleine, keinen Effekt auf die COX-2 Expression. Ähnliche Befunde stammen von Bishop-Bailey (1998) an humanen SMC, die mit verschiedenen Zytokinen stimuliert wurden. Während PGE₂ eine deutliche Hemmung der Zytokin-induzierten COX-2 Expression verursachte, zeigte Cicaprost keinen Effekt. Die Diskrepanzen in der Regulation der COX-2 könnten durch Unterschiede in den Prostaglandin-Rezeptor Populationen, die auf den verschiedenen SMC-Linien exprimiert werden, zustande kommen. Die oben beschriebenen Arbeiten verwendeten PGE₂, dessen Wirkungen nach Bishop-Bailey überwiegend über den an stimulatorische G-Proteine (Gs) gekoppelten EP₂-Rezeptor vermittelt wurden. Die PGI₂-Mimetika Carbacyclin und Cicaprost hatten keinen Effekt auf die Modulation der COX-2 Expression, was vermuten lässt, dass in diesen Zell-Linien nur wenige IP-Rezeptoren exprimiert werden.

In den hier untersuchten hSMC-Linien wurden funktionelle Prostaglandin-Rezeptoren im Radioimmunoassay (RIA) mit spezifischen Agonisten bestimmt. Iloprost erzeugte eine massive Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels, was auf eine starke Expression von funktionellen IP-Rezeptoren hinweist. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der Zellen mit dem spezifischen EP₂-Rezeptor-Agonisten Butaprost, bzw. mit dem EP₄ spezifischen Agonisten Ono AE-1329 nur zu einer geringfügigen Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels, was auf eine geringe Expression dieser Gs-gekoppelten Rezeptoren (Narumiya et al., 1999) hinweist. Zur Untersuchung von funktionellen Gi-gekoppelten EP₃-Rezeptoren, wurde der spezifische Rezeptor-Agonist M&B28767 verwendet. Es zeigte sich bei Stimulation von hSMC mit M&B28767 keine Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung, was auf ein Fehlen bzw. auf eine sehr geringe Expression von EP₃-Rezeptoren hinweist, da diese vermutlich im Verlauf der Kultivierung der Zellen nicht mehr exprimiert werden (Meyer-Kirchrath, persönliche Mitteilung). Aus den hier gezeigten Daten lässt sich ableiten, dass die Iloprost induzierte Expression der COX-2 hauptsächlich durch den Gs-gekoppelten IP-Rezeptor vermittelt wird.

Neben der unterschiedlichen Expression von Rezeptoren könnten die gegensätzlichen Wirkungen von cAMP auf die Regulation der COX-2 Expression in den verschiedenen SMC-Linien darauf zurückzuführen sein, dass es nach der cAMP-abhängigen Aktivierung der PKA zur Kopplung an verschiedene Effektor-Systeme kommt, die entweder eine Transkriptions-Aktivierung oder eine Transkriptions-Hemmung bewirken. Die cAMP-abhängige Transkriptions-Aktivierung kann z.B. durch die Aktivatorproteine CREB (CRE binding protein) und CREM (cAMP responsive element modulator) vermittelt werden, die nach der

PKA-abhängigen Phosphorylierung (Aktivierung) an den Promotor des entsprechenden Gens binden und eine Aktivierung der Transkription bewirken (Lalli und Sassone-Corsi, 1994). Umgekehrt kann eine Repression von Genen durch den PKA-Signaltransduktionsweg, z.B. durch die Aktivierung von Protein-Phosphatasen, oder durch die Induktion von Repressoren erfolgen. Die Dephosphorylierung durch Protein-Phosphatasen ist z.B. ein Schlüsselmechanismus bei der Inaktivierung von CREB (Hagiwara et al., 1992).

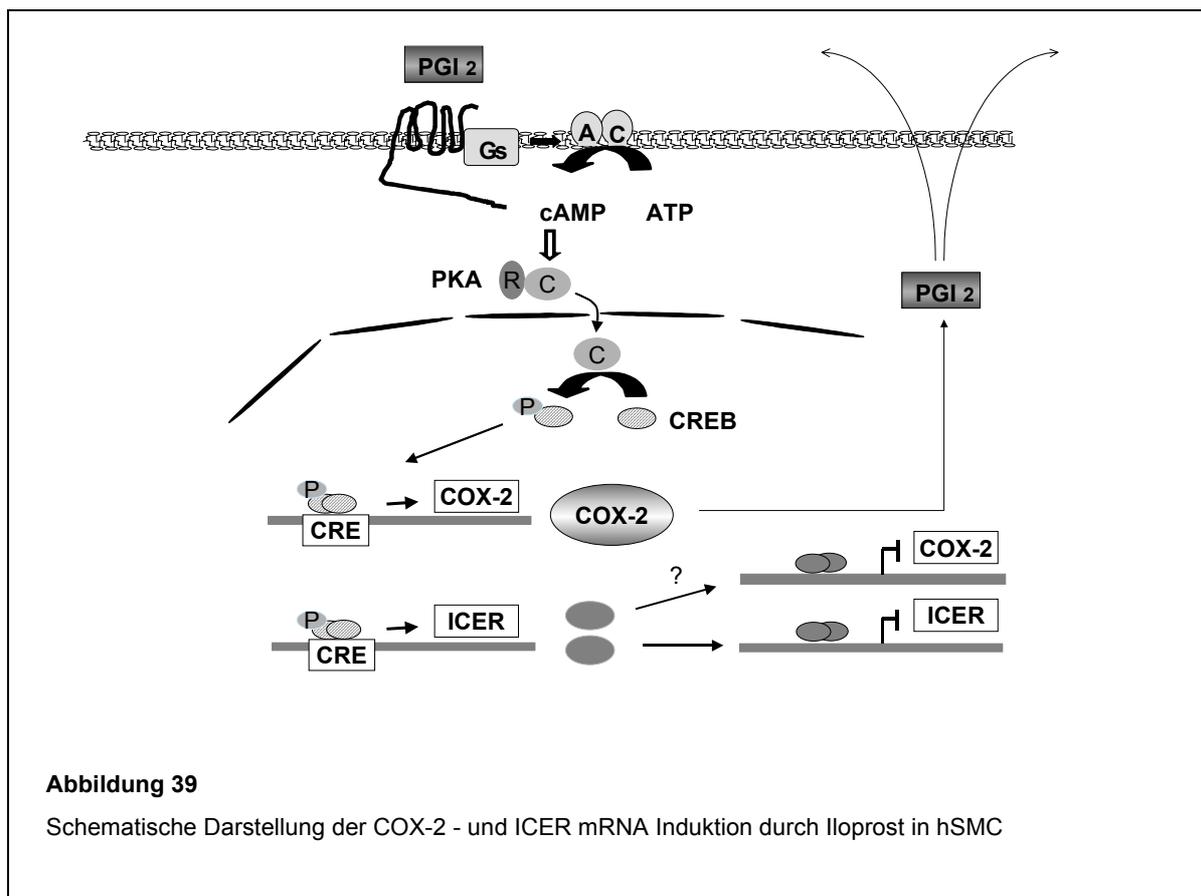
4.1.2 Untersuchungen zum Mechanismus der COX-2 Induktion durch Iloprost

In einigen früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass der IP-Rezeptor neben Gs- auch an Gq-Proteine koppeln und über die Aktivierung der Phospholipase C zu einer nachfolgenden Aktivierung der PKC führen kann (Schwaner et al., 1992; Oka et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde für die Induktion der COX-2 mRNA Expression durch Iloprost jedoch eindeutig ein Gs / cAMP-abhängiger Mechanismus nachgewiesen. cAMP ist der hauptsächlich sekundäre Botenstoff, der in Antwort auf die IP-Rezeptor Stimulation mit Iloprost synthetisiert wird. Im RIA wurde die Konzentrationsabhängigkeit der cAMP-Bildung in einem Bereich von 1 nM bis 100 nM Iloprost bestimmt. In der RT-PCR zeigte sich analog zu den RIA-Daten eine konzentrationsabhängige Induktion der COX-2 mRNA, was auf eine direkte Korrelation der COX-2 Expression zur cAMP-Bildung hinweist. Weiterhin konnte eine Induktion von COX-2 mRNA mit Forskolin, einem direkten Adenylatzyklase Aktivator, sowie mit dem zell-permeablen cAMP-Analogon dbcAMP nachgewiesen werden. Diese Daten stimmen mit Befunden an bovinen Endothelzellen überein, an denen eine Induktion der COX-2 durch cAMP nachgewiesen wurde (Samokovlisky et al., 1999). Ähnliche Beobachtungen sind auch an Keratinozyten der Maus und an Mesangial-Zellen der Ratte gemacht worden (Maldeve et al., 2000; Nüsing et al., 1996). Die Beteiligung einer Aktivierung der Proteinkinase C durch Iloprost, in der hier verwendeten Konzentration von 100 nM konnte durch Desensibilisierungsversuche der PKC weitgehend ausgeschlossen werden. Nach einer 24 stündigen Vorinkubation der hSMC mit PMA konnte keine neue Induktion von COX-2 mRNA durch eine erneute Stimulation mit PMA erzielt werden. Andererseits blieb die Induktion von COX-2 mRNA durch Iloprost nach einer Vorstimulation mit PMA unbeeinflusst. Umgekehrt ergab sich folgendes Bild: nach einer 24 stündigen Vorinkubation mit Iloprost konnte durch eine erneute Stimulation mit Iloprost keine COX-2 mRNA induziert werden, während die Induktion der COX-2 durch PMA unbeeinflusst blieb. Die Stimulation

des IP-Rezeptors mit 100 nM Iloprost führt demnach zu einer Kopplung an Gs mit nachfolgender Aktivierung des cAMP / PKA-Signaltransduktionsweges.

Die Iloprost-induzierte COX-2 mRNA Expression kann prinzipiell auf zwei verschiedene Mechanismen zurückzuführen sein, entweder auf einer Stabilisierung der COX-2 mRNA oder einer transkriptionellen Aktivierung des COX-2 Gens. In Versuchen, bei dem der Transkriptions-Inhibitor Actinomycin D vor einer Iloprost-Stimulation zugegeben wurde, konnte in RT-PCR Analysen keine Induktion von COX-2 mRNA nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass die Induktion der COX-2 mRNA durch Iloprost auf einer transkriptionellen Aktivierung des COX-2 Gens zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt). Diese basiert vermutlich auf einer cAMP / PKA abhängigen Phosphorylierung von nukleären Proteinen, die zu der Familie der CREB- bzw. ATF (activating transcription factor)-Familie der Transkriptionsfaktoren gehören (Lalli und Sassone-Corsi, 1994). Diese können über die Bindung an die CRE-Region des humanen COX-2 Promotors (Kosaka et al., 1994) die Transkription des Gens aktivieren. Diese Hypothese sollte ursprünglich in dieser Arbeit durch Promotorstudien mit COX-2 Wildtyp Promotor-Konstrukten und mit COX-2 Promotor-Konstrukten, die eine Mutation der CRE-Region aufweisen, überprüft werden. Aufgrund einer sehr niedrigen Transfektionseffizienz der hSMC (< 10 %) konnten jedoch keine Ergebnisse erzielt werden. Die Hypothese wird jedoch durch die Beobachtung unterstützt, dass Iloprost die Expression des inducible cAMP early repressors (ICER) induziert. ICER wird cAMP/ CREB-abhängig über einen internen Promotor des CREM-Gens induziert, der einen Cluster von vier hintereinander geschalteten CRE-Sequenzen enthält. ICER blockiert spezifisch die Transkription cAMP-induzierbarer Gene, indem es als Homo- oder Heterodimer mit CREB- oder CREM-Proteinen, an die CRE-Sequenzen der entsprechenden Promotoren bindet. Dabei kommt es über einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus auch zur Repression des ICER-Promotors, wodurch ein transientes ICER-Expressionsmuster entsteht (Molina et al., 1993). In Abbildung 39 ist der Mechanismus der COX-2- und ICER-Induktion durch Iloprost schematisch dargestellt. Da ICER ein potenter und spezifischer Inhibitor der cAMP-induzierten Transkription ist (Molina et al., 1993), könnte die Induktion von ICER auch eine Rolle beim "Abschalten" der Iloprost-induzierten COX-2 Transkription spielen. Dieser Mechanismus könnte vor allem bei einer kontinuierlichen Iloprost-Stimulation von 16–24 h von Bedeutung sein, so dass ICER-Proteine durch Blockade der CRE-Region im COX-2 Promotor eine erneute Induktion der COX-2 durch Iloprost verhindern könnten. Die ICER-Aktivität wird hauptsächlich durch die intrazelluläre Konzentration von ICER-Proteinen bestimmt, welche zum einen von der Transkription des ICER-Promotors und der

Degradation der ICER-Proteine abhängt. In Sertoli-Zellen, somatischen Zellen aus dem Ratten-Testis, wurde trotz einer transienten Expression von ICER mRNA, mit einer ähnlichen Zeit-Kinetik wie der hier gezeigten ICER-mRNA Expression, ICER-Protein bis zu 36 h nachgewiesen werden (Monaco et al., 1995). In verschiedenen Tumorzell-Linien ist ausserdem eine Stabilisierung von ICER-Protein durch cAMP beschrieben (Yehia et al., 2001). Eine hohe Stabilität von ICER-Proteinen könnte daher in hSMC einer Hemmung der COX-2 Induktion durch Iloprost nach langdauernder Agonisten-Stimulation zugrunde liegen.



Eine Beteiligung der IP-Rezeptor-Desensibilisierung nach einer langfristigen Agonisten-Stimulation könnte ebenfalls beim "Abschalten" der Iloprost-induzierten COX-2 Expression beteiligt sein. Obwohl hier, analog zu anderen Arbeiten (Smyth et al., 2000; Nilius et al., 2000), eine Agonisten-abhängige Desensibilisierung des IP-Rezeptors in hSMC nachgewiesen wurde, scheint diese eher eine geringe Rolle beim "Abschalten" der COX-2 Expression zu spielen: 1. der Rezeptor-unabhängige Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin bewirkte ebenfalls eine transiente Expression der COX-2 mRNA; 2. nach 24 stündiger

Desensibilisierung des Rezeptors mit Iloprost werden noch ausreichende Mengen cAMP gebildet, die in nicht desensibilisierten Zellen eine Induktion der COX-2 mRNA bewirken.

4.2 Genexpressions-Analysen mit Iloprost an hSMC

Die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (SMC) in die Intima sind ein initialer Schritt bei der Entstehung okklusiver Gefäßerkrankungen wie z.B. der Atherosklerose und bei Restenosen nach einer Angioplastie. Als Ursache werden dabei eine Dysfunktion des Endothels mit einem Verlust von protektiven Mediatoren, vor allem Prostacyclin, sowie der Einfluss von zahlreichen Wachstumsfaktoren und Zytokinen, angesehen (Ross, 1999) Die Umwandlung der SMCs von einem ruhenden, konstriktorischen in den sog. synthetischen Typ ist mit einer Veränderung von phänotypischen Markern assoziiert. Es erfolgt z.B. eine Abnahme von kontraktile Proteinen und eine Zunahme von Komponenten der Protein-Biosynthese, sowie eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen (Owens 1995; de Vries et al., 2000). Die Veränderungen in der Genexpression glatter Muskelzellen, die den vasoprotektiven Eigenschaften von Prostacyclin, nämlich Hemmung der Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen, zugrunde liegen, sind nur zum Teil geklärt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher die Wirkung von Iloprost auf die Genexpression in hSMC mittels Microarray-Technik untersucht. Unter ca. 5800 Genen wurden 92 Gene gefunden, deren Expression durch Iloprost um den Faktor ≥ 2 verändert wurde. Darunter zeigten 46 Gene eine verminderte und 47 Gene eine verstärkte Expression durch Iloprost. Es wurden viele Gene identifiziert, die eine Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation, bei inflammatorischen Prozessen, bei Interaktionen der extrazellulären Matrix und bei der Hämostase spielen und deren veränderte Expression an den vasoprotektiven Eigenschaften von Iloprost beteiligt sein können.

4.2.1 Extrazelluläre Matrix

Die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen wird durch Interaktionen zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) kontrolliert. Im gesunden Gefäß besteht die ECM überwiegend aus Kollagenfasern des Typs I, III, IV, V, VI und Laminin. Im Verlauf der Atherosklerose kommt es zu einem Abbau der ECM, sowie zu einer abnormalen Synthese und Einlagerung neuer ECM-Proteine z.B. Fibronectin. Die Zusammensetzung der ECM ist ein entscheidender Aspekt, ob SMCs in Antwort auf Wachstumsfaktoren proliferieren und

migrieren, oder ob sie in einem ruhenden Zustand verbleiben. So hemmt z.B. polymeres Typ I Kollagen die proliferative Antwort auf eine Stimulation mit PDGF, während Kollagen-Degradationsprodukte eine proliferationsfördernde Wirkung haben (Koyama et al., 1996; Raines et al., 2000).

Eine Komponente der ECM ist CYR61 (cystein-rich angiogenic Protein), ein sekretorisches, Heparin-bindendes Protein, welches Zell-Matrix-Interaktionen vermittelt und zur sogenannten CCN (CYR61, CTGF, NOV) Familie gehört (Lau und Lam, 1999). CYR61 wird von einem "immediate early" Gen kodiert, dass durch eine Vielzahl von Stimuli wie Serum, PDGF, basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Transforming Growth Factor (TGF)- β , Phorbolester und Hormone induziert werden kann (Lau und Nathans, 1985 und 1987; Brunner et al., 1991; O'Brian et al., 1990; Brigstock 1999). In Endothelzellen und Fibroblasten fördert CYR61 zusammen mit Wachstumsfaktoren wie PDGF und bFGF, verschiedene Vorgänge wie die Adhäsion, DNA-Synthese und Migration (Kireeva et al., 1996), die in hSMC als proatherogen angesehen werden. Darüberhinaus vermittelt CYR61 Veränderungen der ECM-Proteinsynthese und induziert die Angiogenese in Entwicklungs- und Wundheilungsprozessen, sowie bei der Tumorgenese (Lau und Lam 1999). In der Neointima von Angioplastie-Arterien wurde eine starke Expression von CYR61 gefunden, ein erster Hinweis auf die Beteiligung dieses Proteins bei der Entstehung von Restenosen (Wu et al., 2000). Die zellulären Effekte von CYR61 werden durch Bindung an bestimmte Adhäsionsrezeptoren, z.B. dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ vermittelt (Kireeva et al., 1998).

Über die Regulation von CYR61 in hSMC ist bisher nichts bekannt. In der Array-Analyse resultierte die Stimulation von hSMC mit Iloprost für 6 h in einer starken Herabregulation der CYR61 Expression. Die Herabregulation der CYR61 mRNA wurde in der RT-PCR und Real-time PCR bestätigt. In der Zeitkinetik ergab sich eine starke Herabregulation der CYR61 mRNA über einen Zeitraum von 3-6 h. In Versuchen mit Forskolin und dbcAMP zeigte sich ebenfalls eine Abnahme der CYR61 mRNA-Expression, was auf einen cAMP-abhängigen Mechanismus schließen lässt. Desweiteren wurde in Versuchen mit dem Transkriptions-Inhibitor Actinomycin-D gezeigt, dass die Abnahme der CYR61 mRNA Expression auf einer Inhibition der Transkription und nicht auf einer verstärkten Degradation des Transkriptes zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse stimmen mit Befunden von Ricupero et al., (1999) und Kothapalli et al., (1998) überein, die eine Transkriptionshemmung des CTGF (connective tissue growth factor)-Gens, einem weiteren Mitglied der CCN-Familie, durch PGE₂ bzw. cAMP zeigten. Die Hemmung der CYR61 Expression könnte auf der Inaktivierung von

Transkriptionsfaktoren und / oder der Induktion von Transkriptions-Repressoren (z.B. ICER), zurückzuführen sein.

In dieser Arbeit wurde eine Induktion von CYR61 mRNA in hSMC durch Thrombin nachgewiesen. Thrombin wird nach Gefäßverletzungen an Thrombozyten-Oberflächen gebildet und ist ein wirkungsvoller Stimulus für die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Zucker et al., 1998; Bretschneider et al., 1997). Ähnliche Befunde stammen von Pendurthi et al., (2000) an humanen Fibroblasten. Es wird daher angenommen, dass Thrombin eine Rolle bei der Entstehung der sogenannten Intima-Hyperplasie spielt (McNamara et al., 1993). Darüberhinaus stellt CYR61, zusammen mit CTGF, ein Adhäsionsmolekül für Thrombozyten dar, was auf eine Beteiligung dieser beiden Proteine an der Entstehung von okklusiven Thromben hinweist (Jedsadayamata et al., 1999). Die Induktion der CYR61 mRNA durch Thrombin konnte über einen Zeitraum von 1-16 h nachgewiesen werden, was mit der Kinetik der CYR61 mRNA Induktion durch Serum in Fibroblasten übereinstimmt (O'Brian et al., 1990). Desweiteren weisen Experimente mit dem Translations-Inhibitor Cycloheximid darauf hin, dass die Induktion der CYR61 mRNA keine Neusynthese von Proteinen erfordert (Daten nicht gezeigt), womit Thrombin als ein direkter Stimulus der CYR61 mRNA Induktion eingestuft werden kann. Diese Beobachtungen stimmen mit Befunden von Chambers et al., (2000) überein, die eine Cycloheximid-unabhängige Induktion von CTGF durch Thrombin nachweisen konnten. Die Effekte von Thrombin auf die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen könnten daher über eine gesteigerte Expression von CCN-Proteinen vermittelt werden. Neben der basalen CYR61 mRNA Expression, konnte auch die Aufregulation der Thrombin-induzierten CYR61 mRNA durch Iloprost gehemmt werden. Die Herabregulation der CYR61 mRNA durch Iloprost bietet daher einen neuen Ansatzpunkt für die antiproliferativen, antimigratorischen und antithrombotischen Wirkungen von Iloprost. Einen weiteren Hinweis liefert die in der Array-Analyse gemachte Beobachtung, dass die Expression von CTGF ebenfalls durch Iloprost vermindert wurde. CTGF vermittelt die gleichen Wirkungen wie CYR61 und wird z.B. in atherosklerotischen Gefäßen ca. 50-100 fach stärker exprimiert, als in gesunden Gefäßen (Oemar et al., 1997).

Weitere Komponenten der ECM sind die Hyaluronsäuren (HA). Es handelt sich dabei um Heparin-ähnliche Glycosaminglycane, welche eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zelladhäsion, Migration und Differenzierung spielen (Knutson und Knutson, 1993). Die Synthese der HA erfolgt an der Plasmamembran durch HA-Synthasen (HAS). Für HAS sind

in Säugetieren drei verschiedene, aber hoch konservierte Gene beschrieben: HAS-1, HAS-2 und HAS-3 (Übersicht Weigel et al., 1997). In einer Arbeit von Itano et al., (1999) wurde in Transfektions-Experimenten gezeigt, dass sich die drei HAS-Enzyme hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität, sowie durch die Kettenlänge der synthetisierten HA-Moleküle unterscheiden, wobei HAS-1 und HAS-2 längere HA-Ketten synthetisierten als HAS-3. Die Konzentration, sowie die Kettenlänge der HA-Moleküle ist für die physiologischen und biologischen Eigenschaften der HA von Bedeutung. So induziert HA mit niedrigem Molekulargewicht die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (Evanko et al., 1999; Cuff et al., 2001) während hochmolekulare Hyaluronsäure die Proliferation glatter Muskelzellen hemmt (Papakonstaninou et al., 1995). Die HA ist der hauptsächliche Ligand für den Adhäsionsrezeptor CD44, der überwiegend auf inflammatorischen und vaskulären Zellen exprimiert wird und die Adhäsion von Lymphozyten an das Endothel und SMCs fördert (DeGrendele et al., 1997; Lazaar et al., 1994). In atherosklerotischen Läsionen wurde eine Aufregulation von HA nachgewiesen (Evanko et al., 1998; Riessen et al., 1996), womit eine regulatorische Funktion von Hyaluronsäuren an den inflammatorischen Prozessen angenommen wird. In dieser Arbeit wurde eine Aufregulation von HAS-2 mRNA durch Iloprost in hSMC mittels Microarray-Analyse nachgewiesen. In der RT-PCR Analyse zeigte sich eine Induktion von HAS-2 mRNA mit einem Maximum zwischen 1 und 6 h, wobei nach 24 h noch eine leicht erhöhte HAS-2 mRNA Expression beobachtet wurde. Die physiologische Konsequenz der HAS-2 mRNA Induktion in hSMC ist ohne eine genauere Kenntnis der Synthesprodukte-Schwierig zu interpretieren. Papakonstantinou et al., (1995) zeigten jedoch in PDGF-stimulierten SMC eine erhöhte Sekretion von HA mit proliferationshemmenden Eigenschaften. Es wird vermutet, dass die Synthese von HA ein negativer Kontroll-Mechanismus der SMC-Proliferation darstellt. Eine Induktion des HAS-2 Enzyms könnte daher an der antiproliferativen Wirkung von Iloprost beteiligt sein.

4.2.2 Immunsystem / Chemokine

Nach einer Schädigung des Endothels kommt es zu einer erhöhten Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an die Gefäßwand. Die angelagerten Leukozyten, insbesondere Monozyten, durchwandern das Endothel und entwickeln sich im subendotheliale Zwischenraum zu Makrophagen. Dieser Vorgang ist ein initialer Schritt bei der Entstehung der Atherosklerose (Blankenberg et al., 2001). Aktivierte Monozyten / Makrophagen setzen grosse Mengen von proinflammatorischen Zytokinen frei (z.B. Interleukin-1), welche die Proliferation und Dedifferenzierung glatter Gefäßmuskelzellen induzieren können. Die

Anlagerung der Monozyten wird durch ein bestimmtes Chemokin, nämlich MCP-1 (monocyte chemotactic protein) vermittelt (Valente et al., 1984), welches hauptsächlich von geschädigten Endothelzellen und SMC sekretiert wird (Shin et al., 2002). In den Array- und RT-PCR-Analysen wurde eine starke Hemmung der MCP-1 Expression durch Iloprost nachgewiesen, womit ein weiterer vasoprotektiver Effekt von Iloprost, nämlich Hemmung der Monozyten-Anlagerung, begründet werden könnte. Ähnliche Befunde stammen von Jocks et al., (1996), die eine Hemmung der MCP-1 Expression durch PGE₁ in einem Rattenmodell der Glomerulonephritis, einer entzündlichen Erkrankung der Niere, zeigen konnten. Es wird angenommen, dass Prostaglandine als endogene Repressoren der MCP-1 Expression fungieren.

4.2.3 Wachstumsfaktoren / Hormone / Hämostase

VEGF (vascular endothelial growth factor) ist ein spezifisches Mitogen für Endothelzellen und ein wichtiger Mediator der Angiogenese während der Embryogenese (Ferrara, 1996) und bei pathophysiologischen Prozessen wie Krebs, rheumatischer Arthritis und kardiovaskulären Erkrankungen (Folkman, 1995). Die Bildung von VEGF erfolgt hauptsächlich in vaskulären glatten Muskelzellen und wird durch verschiedene Faktoren wie Hypoxie, Wachstumsfaktoren und Zytokine induziert (Brogi et al., 1994; Stavri et al., 1995). Neben den pathophysiologischen Eigenschaften, werden zunehmend vasoprotektive Effekte von VEGF beschrieben. So induziert VEGF in Endothelzellen die Synthese von protektiven Mediatoren wie NO und PGI₂ (Übersicht Zachary, 2001). In Gentransferstudien an Kaninchen mit VEGF wurde zudem eine Hemmung der Neointima-Hyperplasie beobachtet (Laitinen et al., 1997), wobei angenommen wird, dass die hemmende Wirkung durch die Induktion von NO- und PGI₂ zustande kommt. In der vorliegenden Arbeit wurde in hSMC eine Induktion der VEGF-Expression durch Iloprost in der Array- und RT-PCR-Analyse nachgewiesen, was einen regulatorischen Rückkopplungs-Mechanismus darstellen könnte, da VEGF wiederum die Synthese von PGI₂ induzieren kann. Zudem wurde von Akarasereenont et al., (2002), in humanen Endothelzellen eine Induktion der COX-2 durch VEGF nachgewiesen. Eine gesteigerte Synthese von VEGF in hSMC mit einer nachfolgenden endothelialen Bildung von NO- und PGI₂ könnte daher an den atheroprotektiven Wirkungen von Iloprost, nämlich Hemmung der SMC-Proliferation und Thrombozyten-Aggregation, beteiligt sein. Darüberhinaus ist für VEGF auch eine Induktion der antithrombotisch wirkenden Enzyme Urokinase und "tissue-type" Plasminogen-Aktivator (tPA), sowie für den prothrombotischen Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) beschrieben (Pepper et al., 1991).

PAI-1 ist der primäre physiologische Inhibitor von tPA und hemmt die Spaltung / Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin, welches für den Abbau von Fibrin aus entstandenen Thromben verantwortlich ist. Bei vaskulären Erkrankungen wird die Funktion von PAI-1 als paradox betrachtet, so sind erhöhte PAI-1 Spiegel im Plasma und in der Gefäßwand mit vaskulären Erkrankungen wie der Atherosklerose und dem Myokard-Infarkt assoziiert (Schneidermann et al., 1992; Sobel et al., 1998). Darüberhinaus fördert eine verminderte fibrinolytische Aktivität den Prozess der Atherogenese, da die Entstehung von Thromben und die Ablagerung von Fibrin in atherosklerotische Läsionen begünstigt wird (Nordt et al., 1999). Zudem wurde in tierexperimentellen Restenose-Modellen gezeigt, dass PAI-1 an der Ausbildung der Neointima nach einer Gefäßverletzung beteiligt ist (Zhu et al., 2001). Interessanterweise wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Expression von PAI-1 durch Iloprost vermindert wurde. Eine verminderte Expression von PAI-1 korreliert mit einer gesteigerten Fibrinolyse, was auf einen atheroprotektiven Mechanismus schließen lässt. Andererseits kann eine Herabregulation von PAI-1 auch proatherogene Effekte bewirken, da PAI-1 z.B. nach einer Gefäßverletzung die Migration glatter Gefäßmuskelzellen hemmt (Carmeliet, 1997).

In der Genexpressionsanalyse induzierte Iloprost in hSMC eine relativ starke Expression von Stanniocalcin (STC), einem Glycoprotein-Hormon, das zuerst in Knochenfischen identifiziert und in den letzten Jahren auch in humanen Geweben nachgewiesen wurde (Wagner et al., 1991; Wagner et al., 1995). Die primären Funktionen von Stanniocalcin beim Fisch sind die Reduktion der Calcium-Spiegel im Serum und eine Stimulation der renalen Phosphat-Reabsorption (Wagner et al., 1991; Lu et al., 1994). In humanen Geweben wie Niere und Darm werden für Stanniocalcin ähnliche regulatorische Mechanismen beschrieben (Wagner et al., 1995; Madsen et al., 1998). Darüberhinaus scheint Stanniocalcin ein wichtiger protektiver Mediator in neuronalen Geweben zu sein. Eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von Calcium wird z.B. als primärer neurotoxischer Mechanismus bei Hirnschädigungen, z.B. durch Ischämie angesehen (Siesjö und Bengtsson, 1989; Kristian und Siesjö 1998). In einer Studie an ischämischen Hirngeweben von Mensch und Ratte wurde eine verstärkte Expression von Stanniocalcin nachgewiesen. Die gesteigerte Expression von STC schützte die neuronalen Zellen vor einem toxischen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Zhang et al., 2000). Die Induktion von STC wird daher als protektiver Schutzmechanismus bei Ischämie / oxidativem Stress angesehen. Über die Regulation und Funktion von Stanniocalcin in glatten Muskelzellen ist bisher nichts bekannt. Wie in der RT-PCR Analyse gezeigt wurde, induzierte Iloprost in hSMC eine langfristige Induktion der

relativen Stanniocalcin mRNA Expression über einen Zeitraum von 1–16 h. Die Induktion von Stanniocalcin durch Iloprost könnte in Analogie zu neuronalen Zellen, einen protektiven Schutzmechanismus nach einer Zellschädigung darstellen. Weiterhin könnte Stanniocalcin an den gefäßrelaxierenden Eigenschaften von Iloprost, über eine Absenkung der intrazellulären Calcium-Konzentration in den SMCs, beteiligt sein. Die Calcium-Homöostase glatter Gefäßmuskelzellen spielt zudem eine wichtige Rolle bei der atherosklerotischen Kalzifizierung (Shioi et al., 2000; Steitz et al., 2001), die Induktion von Stanniocalcin könnte daher auch bei diesen Mechanismen von Bedeutung sein.

4.2.4 Phosphatasen / Transkriptionsfaktoren

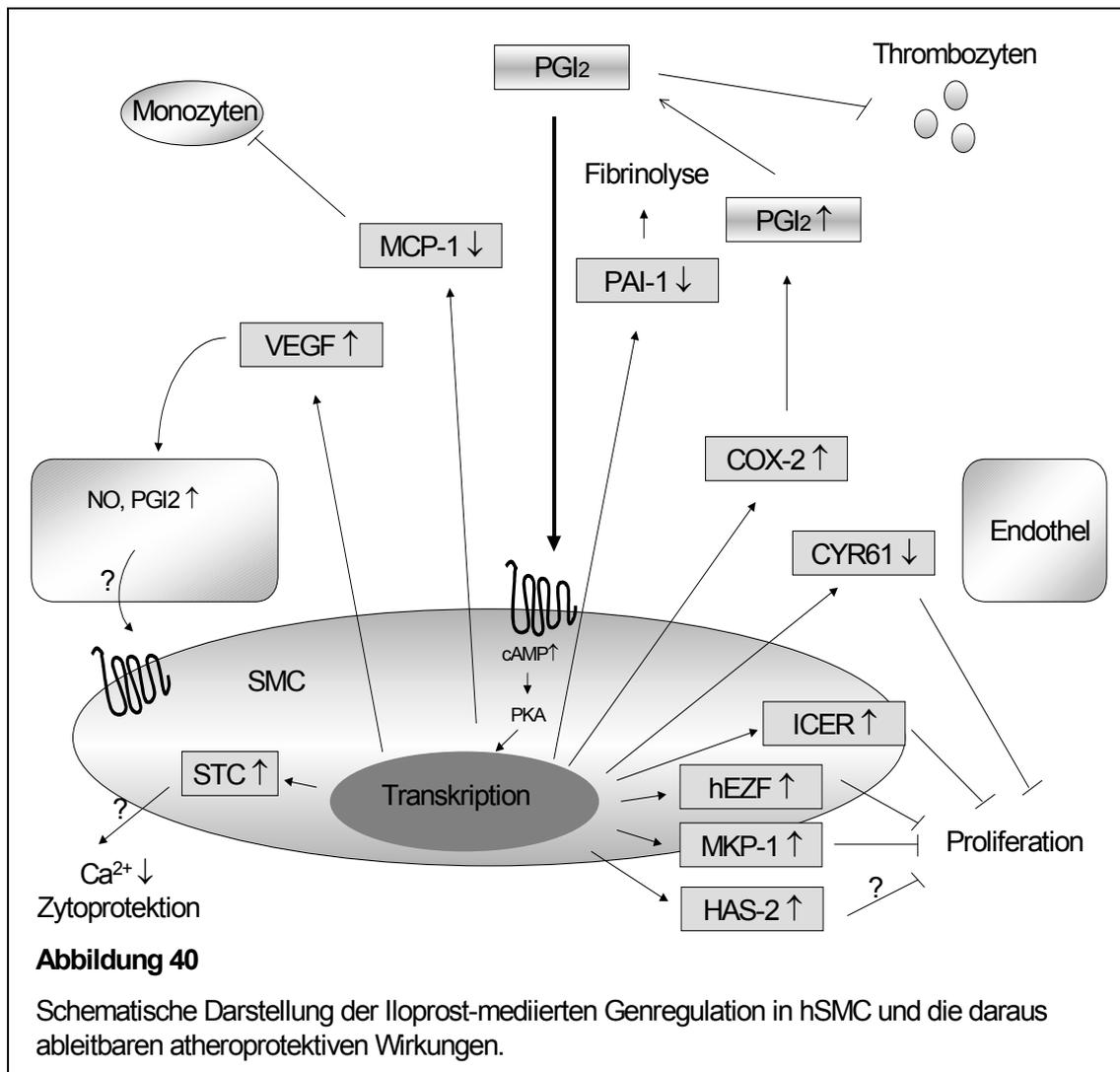
Eine der atheroprotektiven Eigenschaften von Iloprost ist die Hemmung der SMC-Proliferation. Für die zellulären Mechanismen, die diesem Effekt zugrunde liegen, wird z.B. die Hemmung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) Kaskade verantwortlich gemacht (Bornfeldt und Krebs, 1999). Die MAPK-Kaskade mediiert mitogene Prozesse, die durch Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF-BB induziert werden. Viele Studien legen nahe, dass die Hemmung der MAPK-Kaskade auf einer PKA-abhängigen Phosphorylierung der Raf-1 Kinase beruht, wodurch die Interaktion von Raf-1 mit Ras blockiert wird (Wu et al., 1993; Cook und McCormick, 1993; siehe auch 1.5.1.3, Abb. 6). In der Microarray-Analyse wurde ein weiterer Regulator der MAPK-Kaskade, nämlich die MAP-Kinase Phosphatase-1 (MKP-1) identifiziert, deren Expression unter dem Einfluss von Iloprost erhöht wurde. In SMC der Ratte wurde eine MAPK-abhängige Induktion der MKP-1 durch PDGF und Phorbol ester nachgewiesen (Bokemeyer et al., 1998), was auf einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus in der Kontrolle der MAPK-Aktivität hinweist. Die hier gezeigte Aufregulation der MKP-1 Expression durch Iloprost lässt auf einen cAMP-abhängigen Mechanismus schließen. Diese Hypothese wird durch eine Arbeit von Burgun et al., (2000) unterstützt, die eine cAMP-abhängige Expression der MKP-1 in PC-12 Zellen zeigten. Die Iloprost-induzierte MKP-1 Expression könnte somit einen weiteren "Crosstalk"-Mechanismus zwischen der PKA und der MAPK-Kaskade darstellen, der an der antiproliferativen Wirkung von Iloprost beteiligt sein könnte.

Einen weiteren Mechanismus der antiproliferativen Wirkung von Iloprost liefert das Ergebnis, dass Iloprost die Expression von Transkriptions-Repressoren induziert. In der Array-Analyse induzierte Iloprost die relative Expression des humanen epithelial / endothelial zinc finger transcription factor (hEZF). Über die Funktion von hEZF ist bisher noch relativ wenig

bekannt, es wird aber als das humane Homolog des "gut-enriched Krüppel-like factor" der Maus (GKLF) angesehen, der eine wichtige Rolle bei der Regulation der Wachstumsarretierung durch Repression der Cyclin D1 Expression spielt (Shie et al., 2000). Die Regulation von hEZF ist in hSMC bisher nicht beschrieben. In dieser Arbeit wurde in der RT-PCR Analyse eine transiente Expression von hEZF mRNA durch Iloprost über einen Zeitraum von 1–6 h nachgewiesen. Die wachstumshemmende Wirkung von EZF / GKLF wurde an Fibroblasten gezeigt, in denen das Gen überexprimiert wurde (Shields et al., 1996). In humanen Endothelzellen ist ebenfalls eine Funktion von hEZF als Transkriptions-Repressor beschrieben (Yet et al., 1998). Eine gesteigerte Expression von hEZF durch Iloprost könnte daher ebenfalls an der Wachstumsinhibition von hSMC beteiligt sein. Weiterhin bietet die Induktion von ICER (siehe 4.1.2) einen weiteren möglichen Wirkungsmechanismus für die antiproliferative Wirkung von Iloprost. Eine Hemmung der Proliferation durch ICER ist z.B. für T-Lymphozyten und Tumorzellen beschrieben (Bodor et al., 1996; Razavi et al., 1998).

Ein weiteres Gen wurde mittels Array-Analyse identifiziert, dass an der antiproliferativen Wirkung von Iloprost beteiligt sein könnten, aber nicht weiter analysiert wurde: das growth arrest specific 1 Gen (GAS-1), dessen Expression durch Iloprost induziert wurde (Acc-Nr. L13698, siehe 3.2.2). Eine Überexpression von GAS-1 induziert z.B. in Fibroblasten eine Hemmung der Proliferation (Stebel et al., 2000).

In der folgenden Abbildung sind die Effekte von Iloprost auf die Veränderung der Genexpression der verschiedenen Gene in hSMC dargestellt, die eine Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation, bei inflammatorischen Prozessen, bei Interaktionen der extrazellulären Matrix und bei der Hämostase spielen und deren veränderte Expression an den vasoprotektiven Eigenschaften von Iloprost beteiligt sein können (Abb. 40).



Ausblick

Die Genexpressions-Analyse mit Iloprost an humanen glatten Muskelzellen mittels Mikroarray-Technik, bietet neue Einblicke in die Wirkungsweise von Prostacyclin bzw. Prostacyclin-Mimetika. Die Identifizierung neuer Zielgene, die an den proliferationshemmenden und vasoprotektiven Effekten von Prostacyclin beteiligt sein könnten, liefert neue Ansätze für die Aufklärung und evtl. therapeutischen Behandlung von Gefäßkrankheiten, die hinsichtlich ihrer Relevanz und Funktion in vivo einer näheren Analyse unterzogen werden müssen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Cyclooxygenasen sind die geschwindigkeits-bestimmenden Enzyme in der Synthese der Prostaglandine aus Arachidonsäure. Das Hauptprodukt des Arachidonsäure-Stoffwechsels im Endothel und glatten Muskelzellen (SMC) großer Blutgefäße ist das Prostacyclin (PGI_2). Es wirkt vasodilatierend, hemmt die Thrombozyten-Aggregation, sowie die Proliferation und Migration von SMCs, welche kritische Vorgänge bei der Entstehung okklusiver Gefäßerkrankungen, z.B. bei der Atherosklerose, darstellen. Diese atheroprotektiven Wirkungen von PGI_2 werden über spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Plasmamembran, den Prostacyclin-Rezeptoren (IP-R) vermittelt. Nach Aktivierung von IP-R erfolgt eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und eine nachfolgende Aktivierung des Proteinkinase A-Signaltransduktionsweges, der die verschiedenen Effekte steuert. Über eine Regulation der Genexpression in SMCs, die den atheroprotektiven Wirkungen von PGI_2 zugrunde liegen, ist bisher wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Genexpressions-Analysen mittels Microarray-Technik unter dem Einfluss des PGI_2 -Mimetikums Iloprost an humanen SMC (hSMC) durchgeführt, sowie die Wirkung von Iloprost auf die induzierbare Cyclooxygenase-2 (COX-2) in hSMC untersucht.

In hSMC wurde durch Iloprost eine cAMP-abhängige Induktion von COX-2 mRNA und – Protein mit einer nachfolgenden Synthese von PGI_2 nachgewiesen, was auf einen regulatorischen Rückkopplungs-Mechanismus der COX-2 Expression durch Prostaglandine hinweist. Bei einer Ko-Inkubation von Iloprost mit dem Phorbolster PMA, einem Proteinkinase C-Aktivator, wurde eine verstärkte Expression von COX-2 Protein mit einer gesteigerten PGI_2 -Synthese gezeigt. Die Induktion der COX-2 mit einer gesteigerten Synthese von PGI_2 wird in vivo als endogener Schutzmechanismus z.B. nach einer Gefäßverletzung, angesehen.

In der Genexpressions-Analyse wurden zahlreiche Gene identifiziert, deren veränderte Expression an den atheroprotektiven Wirkungen von PGI_2 beteiligt sein können. Insgesamt wurden 9 Gene mittels RT-PCR näher analysiert. Es wurde die Induktion von Transkriptions-Repressoren, wie z.B. des humanen epithelial / endothelial zinc finger transcription factor (hEZF) und des inducible cAMP early repressors (ICER) nachgewiesen, welche z.B. die antiproliferativen Wirkungen von PGI_2 vermitteln können. Desweiteren wurde eine erhöhte Expression der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase Phosphatase-1 (MKP-1) nachgewiesen, die bekanntermaßen eine Gegenregulation der Wachstumsfaktor-vermittelten Zellproliferation bewirkt. Weiterhin wurde die Induktion des vascular / endothelial growth factors (VEGF) nachgewiesen, der die Synthese von protektiven Mediatoren wie PGI_2 und NO in Endothelzellen induzieren kann und somit ebenfalls an den protektiven Wirkungen von Iloprost beteiligt sein könnte. Die Expression von Genen, die proatherogene Prozesse, wie die Induktion der Zell-Proliferation (cystein-rich angiogenic Protein; CYR61), die Anlagerung von Monozyten (monocyte chemotactic Protein-1; MCP-1) oder die Entstehung von Thromben (Plasminogen-activator inhibitor-1; PAI-1) begünstigen, wurden durch Iloprost vermindert. Es wurden ausserdem zwei Gene identifiziert, Stanniocalcin (STC) und Hyaluronsäure-Synthase-2 (HAS-2), deren Expression durch Iloprost erhöht wurde, aber deren physiologischen Funktionen nicht eindeutig geklärt sind.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Akarasereenont PC, Techatraisak K, Thaworn A, Chottewuttakorn S. The expression of COX-2 in VEGF-treated endothelial cells is mediated through protein tyrosine kinase. *Mediators Inflamm* 2002; 11: 17-22

Alt E, Haehnel I, Beilharz C, Prietzel K, Preter D, Stemberger A, Fliedner T, Erhardt W, Schomig A. Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting: a new biodegradable stent coating releasing hirudin and the prostacyclin analogue iloprost. *Circulation* 2000; 101:1453-1458

Baenzinger NL, Becherer PR, Majerus PW. Characterization of prostacyclin synthesis in cultured human arterial smooth muscle cells, venous endothelial cells and skin fibroblasts. *Cell* 1979; 16: 967-974

Bailey SR. Coronary restenosis: A review of current insights and therapies. *Catheter Cardiovasc Interv* 2002; 55: 265-271.

Beasley D. Phorbol ester and interleukin-1 induce interleukin-6 gene expression in vascular smooth muscle cells via independent pathways. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 29: 323-330

Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 and-2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 2000; 102: 840-845

Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523, 1979

Bishop-Bailey D, Burke-Gaffney A, Hellewell P, Pepper JR, Mitchell JA. Interleukin (IL)- 1 β induced cyclo-oxygenase-2 activity inhibits expression of ICAM-1 and VCAM-1 on human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249: 44-47

Bishop-Bailey D, Hla T, Mitchell JA. Cyclo-oxygenase-2 in vascular smooth muscle. *Int J Mol Med* 1999; 3: 41-48

Blankenberg FG, Wen P, Dai M, Zhu D, Panchal SN, Tait JF, Post AM, Strauss HW, Valantine HA. Detection of early atherosclerosis with radiolabeled monocyte chemoattractant protein-1 in prediabetic Zucker rats. *Pediatr Radiol* 2001; 31 (12): 827-835

Bodor J, Spetz AL, Strominger JL, Habener JF. cAMP inducibility of transcriptional repressor ICER in developing and mature human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Science USA* 1996; 93; 3536-3541

Bokemeyer D, Lindemann M, Kramer HJ. Regulation of mitogen-activated kinase phosphatase-1 in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1998; 32: 661-667

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

Bradford M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254

- Braun M, Pietsch P, Zepp A, Schrör K, Baumann G, Felix SB. Regulation of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β induced adhesion molecule expression in human vascular smooth muscle cells by cAMP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2568-2575
- Breder CD, DeWitt D, Kraig RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* 1995; 220: 296-315
- Bretschneider E, Wittpoth M, Weber AA, Glusa E, Schrör K. Thrombin but not thrombin receptor activating peptide is mitogenic for coronary artery smooth muscle cells. *Thromb Res* 1997; 87: 493-497
- Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev* 1999; 20: 189-206
- Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994; 90: 649-652
- Brunner A, Chinn J, Neubauer M, Purchio AF. Identification of a gene family regulated by transforming growth factor β . *DNA Cell Biol* 1991; 10: 293-300
- Burgun C, Esteve L, Humblot N, Aunis D, Zwiller J. Cyclic AMP-elevating agents induce the expression of MAP kinase phosphatase-1 in PC12 cells. *FEBS Lett* 2000; 484: 189-193
- Buttery LDK, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield N, Parums DV, Yacoub MH, Polak JM. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 1996; 75: 77-85
- Bydlowski SP, Pares MM, Soares RP, Lopes AA. Stimulation of human smooth muscle cell proliferation by thrombin involves increased synthesis of platelet-derived growth factor. *Chest* 1998; 114: 236-240
- Campbell GR, Campbell JH: Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* 1985; 42: 139-162
- Campbell GR, Campbell JH, Manderson JA, Horrigan S, Rennick RE. Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:977-986
- Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Janssens S, Lupu F, Collen D, Gerard RD. Inhibitory role of plasminogen activator inhibitor-1 in arterial wound healing and neointima formation : a gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation* 1997; 96: 3180-3191
- Catella-Lawson F, McAdam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, Lasseter KC, Quan H, Gertz BJ, FitzGerald GA. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289: 735-741

- Chambers RC, Leoni P, Blanc-Brude OP, Wembridge DE, Laurent GJ. Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *J Biol Chem* 2000; 275: 35584-35591
- Charles CH, Ablner AS, Lau LF. cDNA sequence of a growth factor-inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein. *Oncogene* 1992; 7: 187-190
- Chen CC, Chen N, Lau LF. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2001; 276:10443-10452
- Chen N, Chen CC, Lau LF. Adhesion of human skin fibroblasts to Cyr61 is mediated through integrin alpha 6 beta 1 and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 2000; 75: 24953-24961
- Chuang TT, Iacovelli L, Sallese M, De Blasi A: G-Protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *TIPS* 1996; 17: 416-421
- Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. VIII International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 1994; 46: 205-229
- Cook SJ, McCormick F. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* 1993; 262: 1069-1072
- Cuff CA, Kothapalli D, Azonobi I, Chun S, Zhang Y, Belkin R, Yeh C, Secreto A, Assoian RK, Rader DJ, Puré E. The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. *J Clin Invest* 2001; 108: 1031-1040
- Darius H, Nixdorff U, Zander J, Rupprecht HJ, Erbel R, Meyer J. Effects of ciprostone on restenosis rate during therapeutic transluminal coronary angioplasty. *Agents Actions Suppl* 1992; 37: 305-311
- Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circulation* 2001; 89:650-660
- DeGrendele HC, Estess P, Siegelmann MH. Requirement for CD44 in activated T-cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 1997; 278: 672-675
- Dembinska-Kiec A, Gryglewska T, Zmuda A, Gryglewski RJ. The generation of prostacyclin by arteries and by the coronary vascular bed is reduced in experimental atherosclerosis in rabbits. *Prostaglandins* 1977; 14: 1025-1034
- de Vries CJM, van Achterberg, TAE, Horrevoets AJG, ten Cate JW, Pannekoek H. Differential display identification of 40 genes with altered expression in activated human smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 23939-23947
- DeWitt DL, Smith WL. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Science USA* 1988; 85: 1412-1416

- DeWitt DL, Meade EA. Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. *Arch Biochem Biophys* 1993; 306: 94-104
- Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmermann GA, Prescott SM. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. *J Biol Chem* 2000; 275: 11750-11757
- Eitzman DT, Fay WP, Ginsburg D. Plasminogen activator inhibitor -1. In: Becker RC, ed. *Textbook of Coronary Thrombosis and Thrombolysis*. Norwell, Mass: Kluwer Academic Publishing; 1997: 65-78
- Evanko SP, Raines EW, Ross R, Gold LI, Wight TN. Proteoglykan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β . *Am J Pathol* 1998; 152: 533-546
- Evanko SP, Angello JC, Wight T. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1004-1013
- Evetts GE, Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Simmons DL. Prostaglandin G/H isoenzyme 2 expression in fibroblasts: Regulation by dexamethasone, mitogens, and oncogenes. *Arch Biochem Biophys* 1993; 306: 169-177
- Fallier-Becker P, Rupp J, Fingerle J, Betz E: Smooth muscle cells from rabbit aorta. In: Piper HM (ed). *Cell culture techniques in heart and vessel research*. Springer Verlag New York, Berlin, Heidelberg 1990: 247-270
- Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev* 1998; 78: 53-97
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 32: 2413-2422
- Fletcher BS, Kujubu DA, Perrin DM, Hershman HR. Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J Biol Chem* 1992; 267: 4338-4344
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* 1995; 1: 27-31
- Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P. CREM-gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 1991; 64: 739-749
- Gershlik AH, Spriggins D, Davies SW, Syndercombe-Court YD, Timmins J, Timmis AD, Rothman MT, Layton C, Balcon R. Failure of epoprostenol (prostacyclin, PGI₂) to inhibit platelet aggregation and to prevent restenosis after coronary angioplasty: results of a randomised placebo controlled trial. *Br Heart J* 1994; 71: 7-15

- Habenicht AJ, Goerig M, Grulich J, Rothe D, Gronwald R, Loth U, Schettler G, Kommerell B, Ross R. Human platelet-derived growth factor stimulates prostaglandin synthesis of cyclooxygenase. *J Clin Invest* 1985; 75: 1381-1387
- Hagiwara M, Alberts A, Brindle P, Meinkoth J, Feramisco J, Deng T, Karin M, Shenolikar S, Montminy MR. Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 1992; 70:105-113
- Hanahan D. Techniques for transformation of *E. coli*. DNA cloning; A practical approach. Washington DC, IRL Press; 1985
- Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Phosphorylation sites on two domains of the 2-adrenergic receptors are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* 1989; 264: 12657-12663
- Hayes JS, Lawler OA, Walsh MT, Kinsella BT. The prostacyclin receptor is isoprenylated. Isoprenylation is required for efficient receptor-effector coupling. *J Biol Chem* 1999; 274: 23707-23718
- Hershman HR. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 281-319
- Hershman HR. Regulation of prostaglandin-synthase-1 and prostaglandin-synthase -2. *Cancer Metastasis Rev* 1994; 13: 241-256
- Hershman HR. Prostaglandin synthase-2. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1299: 125-140
- Hinz B, Brune K, Pahl A. Prostaglandin E₂ upregulates cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272: 744-748
- Hinz B, Brune K, Pahl A. Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E₂, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000, 278: 790-796
- Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7384-7388
- Inglese J, Freedman NJ, Koch WJ, Lefkowitz RJ: Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 1993; 268: 23735-23738
- Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T. Transcriptional regulation of human PGHS-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J Biol Chem* 1995; 270: 24965-24971
- Isogaya M, Yamada N, Koike H, Ueno Y, Kumagai H, Ochi Y, Okazaki S, Nishio S. Inhibition of restenosis by beraprost sodium (a prostaglandin I₂ analogue) in the atherosclerotic rabbit artery after angioplasty. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25: 947-952

- Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* 1999; 274: 25085-25092
- Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E Synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7220-7225
- Jedsadayanmata A, Chen CC, Kireeva ML, Lau LF, Lam SCT. Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Biol Chem* 1999; 274: 24321-24327
- Jocks T, Zahner G, Freudenberg J, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RAK. Prostaglandin E₁ reduces the glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti-thymocyte antibody-induced glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 897-905
- Katsuyama M, Sugimoto Y, Namba T, Irie A, Negishi M, Narumiya S, Ichikawa A. Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett* 1994; 344: 74-78
- Keyse SM, Emslie EA. Oxidative Stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosin phosphatase. *Nature* 1992; 359: 644-646
- Kireeva ML, Mo FE, Yang GP, Lau LF. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol Cell Biol* 1996;16:1326-1334
- Kireeva ML, Lam SCT, Lau LF. Adhesion of human umbilical vein endothelial cells to the immediate-early gene product CYR61 is mediated through integrin $\alpha_v\beta_3$. *J Biol Chem* 1998; 273: 3090-3096
- Knudson CB, Knudson B. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J* 1993; 7: 1233-1241
- Knudtson ML, Flintoft VF, Roth DL, Hansen JL, Duff HJ. Effect of short-term prostacyclin administration on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15: 691-697
- Kobayashi T, Kiriya M, Hirata T, Hirata M, Ushikubi F, Narumiya S. Identification of domains conferring ligand binding specificity to the prostanoid receptor. Studies on chimeric prostacyclin/prostaglandin D receptors. *J Biol Chem* 1997; 272: 15154-15160
- Kobayashi T, Ushikubi F, Narumiya S. Amino acid residues conferring ligand binding properties of prostaglandin I and prostaglandin D receptors. *J Biol Chem* 2000; 275: 24294-24303
- Koenig JA, Edwardson JM: Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *TIPS* 1997; 18: 276-287

- Kolesnikova TV, Lau LF. Human CYR61-mediated enhancement of bFGF-induced DNA synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *Oncogene* 1998; 16: 747-754
- Kornhoff M, Klein T, Seyberth HW, Nüsing RM. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol* 1997; 272: 460-468
- Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* 1994; 221: 889-897
- Kothapalli D, Hayashi N, Grotendorst GR. Inhibition of TGF-beta-stimulated CTGF gene expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle. *FASEB J* 1998; 12: 1151-1161
- Koyama H, Raines EW, Bornfeldt KE, Roberts JM, Ross R. Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors. *Cell* 1996; 87: 1069-1078
- Kraemer SA, Maede SA, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: Identification of the transcriptional start site and 5' flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* 1992; 293: 391-400
- Kraemer SA. The transcriptional regulation of murine prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 1994. Ph.D Dissertation, Michigan State University, East Lansing, Mi, USA
- Kristian T, Siesjö BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 1998; 29: 705-718
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Hershman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase / cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem*. 1991; 266: 12866-12872
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
- Lalli E, Sassone-Corsi P. Signal-transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol Chem* 1994; 269: 17359-17362
- Libby P, Warner SJ, Friedman GB. Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoid. *J Clin Invest* 1988; 81: 487-498
- Lau LF, Nathans D. Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *EMBO J* 1985; 4: 3145-3151
- Lau LF, Nathans D. Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: Coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84:1182-1186
- Lau LF, Lam SCT. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res* 1999; 248: 44-57

- Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D. Selective expression of mitogen-inducible COX in macrophages stimulated with LPS. *J Biol Chem* 1992; 267: 25934-25938
- Lefkowitz RJ, Pitcher J, Krüger K, Daaka Y. Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol* 1998; 42: 416-420
- Lefkowitz RJ, Willerson JT. Prospects for cardiovascular research. *JAMA* 2001; 285: 581-587
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ: β -Arrestin: A protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science* 1990; 248: 1547-1550
- Lu M, Wagner GF, Renfro JL. Stanniocalcin stimulates phosphate reabsorption by flounder renal proximal tubule in primary culture. *Am J Physiol* 1994; 1356-1361
- Macchia L, DiPaola R, Guerrese MC, Chiechi LM, Tursi A, Caiaffa MF, Haegstrom JZ. Expression of prostaglandin H synthase 1 and 2 in human placenta at term. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233: 496-501
- Madsen KL, Tavernini MM, Yachimek C, Mendrick DL, Alfonso PJ, Buergin M, Olsen HS, Antonaccio MJ, Thomson ABR, Fedorak RN. Stanniocalcin: a novel protein regulating calcium and phosphate transport across mammalian intestine. *Am J Physiol* 1998; 274: 96-102
- Maldve RE, Kim Y, Muga SJ, Fischer SM. Prostaglandin E₂ regulation of cyclooxygenase expression in keratinocytes is mediated via cyclic nucleotide-linked prostaglandin receptors. *J Lipid Res* 2000, 41: 873-881
- McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX-2): the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Science USA* 1999; 96: 272-277
- McNamara CA, Sarenbock IJ, Gimple LW, Fenton JW, Coughlin SR, Owens GK. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest* 1993; 91: 94-98
- Meyer-Kirchrath J, Hasse A, Schrör K. Preservation of Gi coupling of a chimeric EP₃/I-type prostaglandin (IP) receptor. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 471-476
- Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 1993, 75: 875-886
- Monaco L, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Pituitary follicle-stimulating hormone (FSH) induces CREM gene expression in Sertoli-cells: involvement in long-term desensitization of the FSH receptor. *Proc Natl Acad Science USA* 1995; 92: 10673-10677

- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976; 263: 663-665
- Nagel T, Resnick N, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1825-1834
- Nakagawa O, Tanaka I, Usui T, Harada M, Sasaki Y, Itoh H, Yoshimasa T, Namba T, Narumiya S, Nakao T. Molecular cloning of human prostacyclin receptor cDNA and its gene expression in the cardiovascular system. *Circulation* 1994; 90: 1643-1647
- Namba T, Oida H, Sugimoto Y, Kakizuka A, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S. cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signalling pathways and expression in thymic medulla. *J Biol Chem* 1994; 269: 9986-9992
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: Structures, properties and functions. *Physiol Rev* 1999; 79: 1193-1226
- Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Ann Rev Biochem* 1986; 55: 69-102
- Nelken NA, Soifer SJ, O'Keefe J, Vu TK, Charo IF, Coughlin SR. Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Clin Invest* 1992; 90:1614-1621
- Nilius SM, Hasse A, Kuger P, Schrör K, Meyer-Kirchrath J. Agonist-induced long term desensitization of the human prostacyclin receptor. *FEBS* 2000; 484: 211-216
- Nordt TK, Peter K, Ruef J, Kubler W, Bode C. Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) and its role in cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 1999; 82 Suppl 1: 14-18
- Nugteren DH, Christ-Hazelhof E. Chemical and enzymatic conversions of prostaglandin endoperoxide PGH₂. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 1980; 6: 129-137
- Numaguchi Y, Naruse K, Harada M, Osanai H, Mokuno S, Murase K, Matsui H, Toki Y, Ito T, Okumura K, Hayakawa T. Prostacyclin synthase gene transfer accelerates reendothelialization and inhibits neointimal formation in rat carotid arteries after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 727-733.
- Nüsing RM, Klein T, Pfeilschifter J, Ullrich V. Effect of cyclic cAMP and prostaglandin E₂ on the induction of nitric oxide- and prostanoid-forming pathways in cultured rat mesangial cells. *Biochem J* 1996, 313: 617-623
- O'Banion MK, Winn VD, Young DA. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Science USA* 1992; 89: 4888-4892
- Oemar BS, Werner A, Garnier JM, Do DD, Godoy N, Nauck M, Marz W, Rupp J, Pech M, Luscher TF. Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation* 1997; 95:831-839

- Ogawa Y, Tanaka I, Inoue M, Yoshitake Y, Isse N, Nakagawa O, Usui T, Itoh H, Yoshimasa T, Narumiya S, Nakao K. Structural organization and chromosomal assignment of the human prostacyclin receptor gene. *Genomics* 1995; 27: 142-148
- Oka M, Negishi M, Nishigaki N, Ichikawa A. Two types of prostacyclin receptor coupling to stimulation of adenylate cyclase and phosphatidylinositol hydrolysis in a cultured mast cell line, BNu-2c13 cells. *Cell Signal* 1993; 5: 643-650
- Okahara K, Sun B, Kambayashi J. Upregulation of prostacyclin synthesis-related gene expression by shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1922-1926
- Otto JC, Smith WL. Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2. *J Lipid Mediat Cell Signal*. 1995; 12: 139-156
- Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995; 75: 487-517
- Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Roth M, Block LH. Platelet-derived growth factor stimulates the secretion of hyaluronic acid by proliferating human vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9881-9885
- Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, Brasier AR, Bode C, Runge MS. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47 (phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1999; 274: 19814-19822
- Pereira B, Wu KK, Wang L-H. Molecular cloning and characterization of bovine prostacyclin-synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 59-66
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 902-906
- Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* 1994; 367: 243-249
- Pitcher JA, Payne ES, Csontos C, DePaoli-Roach AA, Lefkowitz RJ: The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8343-8347
- Premont RT, Inglese J, Lefkowitz RJ: Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J* 1995; 9: 175-182
- Pritchard KA, O'Banion MK, Miano JM, Vlastic N, Bhatia UG, Young DA, Stemerman MB. Induction of cyclo-oxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1994; 269: 8504-8509

- Rapoport RM, Campbell AK, Bazan E. Effects of PKC downregulation on norepinephrine- and prostaglandin F₂ alpha-induced contraction in rat-aorta. *Am J Physiol* 1995; 269: H590-H598
- Razavi R, Ramos JC, Yehia G, Schlotter F, Molina CA. ICER-II γ is a tumor suppressor that mediates the antiproliferative activity of cAMP. *Oncogene* 1998; 17: 3015-3019
- Ricupero DA, Rishikof DC, Kuang PP, Poliks C, Goldstein RH. Regulation of connective tissue growth factor expression by prostaglandin E₂. *Am J Physiol* 1999; 277: 1165-1171
- Riessen R, Wight TN, Pastore C, Henley C, Isner JM. Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon injured rat carotid arteries. *Circulation* 1996; 93: 1141-1147
- Rimarachin JA, Jacobson JA, Szabo P, Maclouf J, Creminon C, Weksler BB. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1021-1031
- Ristimäki A, Garfinkel S, Wessendorf J, Maciag T, Hla T. Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1-alpha. Evidence for post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1994; 269: 11769-11775
- Rolland PH, Jouve R, Pellegrin E, Mercier C, Serradimigni A. Alteration in prostacyclin and prostaglandin E₂ production. Correlation with changes in human aortic atherosclerotic disease. *Arteriosclerosis* 1984; 4:70-78
- Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467, 1977
- Sasaki Y, Usui T, Tanaka I, Nakagawa O, Sando T, Takahashi T, Namba T, Narumiya S, Nakao K. Cloning and expression of a cDNA for rat prostacyclin receptor. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1224: 601-605
- Schafer AI, Handin RI. The role of platelets in thrombotic and vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 1979; 22: 31-52
- Schneidermann J, Sawdey MS, Keeton MR, Bordin GM, Bernstein EF, Dilley RB, Loskutoff DJ. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6998-7002
- Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1999; 155: 1281-1291
- Schrör K. Prostaglandine und verwandte Verbindungen. Thieme Verlag, Stuttgart 1984
- Schrör K, Seidel H. Blood-vessel wall arachidonate metabolism and its pharmacological modification in a new in vitro assay system. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1988; 337: 177-182

- Schrör K, Verheggen R. Use of human post-mortem cerebral blood vessels to study vasospasm. *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9: 71-74
- Schrör K, Weber A-A. Roles of vasodilatory prostaglandins in mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Agents Actions Suppl* 1997; 67: 62-90
- Schrör K. Prostacyclin (Prostaglandin I₂) and atherosclerosis. In: Rubanyi GM, Dzau VJ: *The endothelium in Clinical Practice* 1997, New York: Marcel Dekker, Inc
- Schrör K, Zhu Y, Saunders MA, Deng WG, Xu XM, Meyer-Kirchrath J, Wu KK. Obligatory role of cyclic adenosine monophosphate response element in cyclooxygenase-2 promoter induction and feedback regulation by inflammatory mediators. *Circulation* 2002; 105: 2760-2765
- Schwaner I, Seifert R, Schultz G. The prostacyclin analogues, cicaprost and iloprost, increase cytosolic Ca²⁺ concentration in the human erythroleukemia cell line, HEL, via pertussis toxin-insensitive G-proteins. *Eicosanoids* 1992; 5: S10-S12
- Shenker A, Goldsmith, P, Unson CG, Spiegel AM. The G-protein coupled to the thromboxane A₂ receptor in human platelets is a member of the novel Gq-family. *J Biol Chem* 1991; 266: 9309-9313
- Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* 1996; 271: 20009-20017
- Shie JL, Chen ZY, Fu M, Pestell RG, Tseng CC. Gut-enriched Kruppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 2969-76
- Shioi A, Mori K, Jono S, Wakikawa T, Hiura Y, Koyama H, Okuno Y, Nishizawa Y, Morii H. Mechanism of atherosclerotic calcification. *Z Kardiol Suppl* 2000; 89 : II/75-II/79
- Siegel G, Walter A, Schnalke F, Schmidt A, Buddecke E, Loirand G, Stock G. Potassium channel activation, hyperpolarization and vascular relaxation. *Z Kardiol Suppl* 1992; 7: 9-24
- Siegel G, Emden J, Wenzel K, Mironneau J, Stock G: Potassium channel activation in vascular smooth muscle. *Adv Exp Med Biol* 1992; 311: 53-72
- Siesjö BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9: 127-140
- Shin WS, Szuba A, Rockson SG. The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. *Atherosclerosis* 2002; 160 : 91-102
- Smith WL. Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Annu Rev Physiol* 1986; 48: 251- 262
- Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 1989; 259: 315-325

- Smith CJ, Morrow JD, Robert LJ, Marnett LJ. Differentiation of monocytoid THP-1 cells with phorbol ester induces expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (COX-1). *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 787-793
- Smyth EM, Nestor PV, FitzGerald GA. Agonist-dependent phosphorylation of an epitop-tagged human prostacyclin-receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 33698-33704
- Smyth EM, Austin SC, Reilly MP, FitzGerald GA. Internalization and sequestration of the human prostacyclin receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 32037-32045
- Sobel BE, Woodcock-Mitchell J, Schneider DJ, Holt RE, Marutsuka K, Gold H. Increased plasminogen activator inhibitor type 1 in coronary artery atherectomy specimens from type 2 diabetic compared with non-diabetic patients: a potential role factor predisposing to thrombosis and its persistence. *Circulation* 1998; 97: 2213-2221
- Soler M, Camacho M, Escudero JR, Iniguez MA, Vila L. Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin E synthase. *Circ Res* 2000; 87: 504-507
- Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* 1998; 273: 9886-9893
- Stanford SJ, Pepper JR, Mitchell JA. Cyclooxygenase-2 regulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, but not interleukin-8, production by human vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:677-682
- Stavri GT, Hong Y, Zachary IC, Breier G, Baskerville PA, Yla-Herttuala S, Risau W, Martin JF, Erusalimsky JD. Hypoxia and platelet-derived growth factor-BB synergistically upregulate the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1995; 358: 311-315
- Stebel M, Vatta P, Ruaro ME, Del Sal G, Parton RG, Schneider C. The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein. *FEBS Lett* 2000; 481: 152-158
- Steiner AL, Parker CW, Kipnis DM: Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 247: 1106-1113, 1972
- Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebbersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification. *Circ Res* 2001; 89: 1147-1154
- Todaka T, Yokoyama C, Yanamoto H, Hashimoto N, Nagata I, Tsukahara T, Hara S, Hatae T, Morishita R, Aoki M, Ogihara T, Kaneda Y, Tanabe T. Gene transfer of human prostacyclin synthase prevents neointimal formation after carotid balloon injury in rats. *Stroke* 1999; 30: 419-426
- Town MH, Schillinger E, Speckenbach A, Prior G. Identification and characterization of a prostacyclin-like receptor in bovine coronary arteries using a specific and stable prostacyclin analogue, cilprost, as radioactive ligand. *Prostaglandins* 1982; 24: 61-72

- Valente A, Fowler SR, Sprague EA, Kelley JL, Suenram CA, Schwartz CJ. Initial characterization of a peripheral blood mononuclear cell chemoattractant derived from cultured arterial smooth muscle cells. *Am J Pathol* 1984; 117: 409-417
- van der Loop FT, Schaart G, Timmer ED, Ramaekers FC, van Eys GJ. Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1996;134: 401-411
- Vane JR, Bahkle YS, Botting RM. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 97-120
- Wagner GF, Milliken C, Friesen HG, Copp DH. Studies on the regulation and characterization of plasma stanniocalcin in rainbow trout. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 79: 129-138
- Wagner GF, Guiraudon CC, Milliken C, Copp DH. Immunological and biological evidence for a stanniocalcin-like hormone in human kidney. *Proc Natl Acad Science USA* 1995; 92: 1871-1875
- Weber A-A, Zucker TP, Hasse A, Bönisch D, Wittpoth M, Schrör K. Anitimitogenic effects of vasodilatory prostaglandins in coronary artery smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 1998; 93: 54-57
- Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem* 1997; 272: 13997-14000
- Weiss HJ, Turitto VT. Prostacyclin (prostaglandin I₂, PGI₂) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood* 1979; 53: 244-250
- Willis AL, Smith DL, Vigo L. Suppression of principal atherosclerotic mechanisms by prostacyclins and other eicosanoids. *Prog Lipid Res* 1986; 25: 645-666
- Winn VD, O'Banion MK, Young DA. Anti-inflammatory glucocorticoid action: inhibition of griPGHS, a new cyclooxygenase. *J Lipid Mediat* 1993 M;6: 101-111
- 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* 1993; 262: 1065-1069
- Wu KJ, Yee A, Zhu NL, Gordon EM, Hall FL. Characterization of differential gene expression in monkey arterial neointima following balloon catheter injury. *Int J Mol Med* 2000; 6:433-440
- Xu XM, Tang JL, Chen X, Wang LH, Wu KK. Involvement of two SP-1 elements in basal endothelial prostaglandin H synthase-1 promoter activity. *J Biol Chem* 1997; 272: 6943-6950
- Yang GP, Lau LF. Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. *Cell Growth Differ* 1991; 2: 351-357

Yehia G, Schlotter F, Razavi R, Alessandrini A, Molina CA. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and targets inducible cAMP early repressor to ubiquitin-mediated destruction. *J Biol Chem* 2001; 276; 35272-35279

Yet SF, McA'Nulty MM, Folta SC, Yen HW, Yoshizumi M, Hsieh CM, Layne MD, Chin MT, Wang H, Perrella MA, Jain MK, Lee ME. Human EZF, a Kruppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains. *J Biol Chem* 1998; 273(2): 1026-1031

Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: 1375-1386

Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 241-269

Zhang Z, Austin SC, Smyth EM. Glycosylation of the human prostacyclin receptor: role in ligand binding and signal transduction. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 470-477

Zhang K, Lindsberg PJ, Tatlisumak T, Kaste M, Olsen HS, Andersson LC. Stanniocalcin: A molecular guard of neurons during cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3637-3642

Zhu Y, Farrehi PM, Fay WP. Plasminogen activator inhibitor type 1 enhances neointima formation after oxidative vascular injury in atherosclerosis-prone mice. *Circulation* 2001; 26: 3105-3110

Zimmermann KC, Sarbia M, Schrör K, Weber AA. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 536-540

Zou M-H, Leist M, Ullrich V. Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries. *Am J Pathol* 199; 154: 1359-1364

Zucker TP, Bönisch D, Muck S, Weber AA, Bretschneider E, Glusa E, Schrör K. Thrombin-induced mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells is potentiated by thromboxane A₂ and involves upregulation of thromboxan receptor mRNA. *Circulation* 1998; 97: 589-595

7 VERÖFFENTLICHUNGEN

Kurzartikel (Abstracts) für Tagungen und Kongresse

Meyer-Kirchrath J, Kuger P, Debey S, Sarbia M, Schrör K

Transcriptional regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in human esophageal cancer cells; Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 361 (Suppl): R16 (2000)

41. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 21.-23. März 2000, Mainz

Debey S, Meyer-Kirchrath J, Schrör K

C-terminal coupling of EP₃-receptor to GFP does not influence signal-transduction; Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 361 (Suppl): R21 (2000)

41. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 21.-23. März 2000, Mainz

Debey S, Meyer-Kirchrath J, Schrör K

Effects of prostaglandins on COX-2 expression in human vascular smooth muscle cells and fibroblasts; Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 363 (Suppl): R16 (2001)

42. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 13.-15. März 2001, Mainz

Debey S, Braun M, Schrör K, Meyer-Kirchrath J

Microarray analysis of iloprost-induced gene expression in human smooth muscle cells; Bas Res Cardiol 96-1 (Suppl): 31 (2001)

2nd European Meeting of Vascular Biology and Medicine, 27.-29. September 2001, Ulm

Debey SN, Braun M, Schrör K, Meyer-Kirchrath J

Determination of Iloprost-induced gene expression in human vascular smooth muscle cells by microarray analysis; Circulation 104 (Suppl): 238 (2001)

American Heart Scientific Sessions, 11.-14. November 2001, Anaheim, USA

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Debey S, Meyer-Kirchrath J, Schrör K

Regulation of cyclooxygenase-2 expression by iloprost in human vascular smooth muscle cells. Role of transcription factors CREB and ICER. *Biochem Pharmacol* 2003; 65(6): 979-988

Debey S, Kirchrath L, Schrör K, Meyer-Kirchrath J

Iloprost down-regulates the expression of the growth regulatory gene CYR61 in human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* (im Druck)

Meyer-Kirchrath J, Debey S, Glandorff C, Kirchrath L, Schrör K

Gene expression profile of the Gs-coupled prostacyclin receptor in human vascular smooth muscle cells

(eingereicht)

8 DANKSAGUNG

Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit, sowie für jegliche Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Prof. Dr. Ulrich Rüther danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Besonderer Dank geht an Dr. Jutta Meyer-Kirchrath für die Betreuung der Arbeit und für die zahlreichen Diskussionen, Meinungs austausche und ermunternden Worte.

Dr. Aron Weber und Dr. Marina Braun danke ich für hilfreiche Gespräche und Ratschläge.

Bei Petra Kuger bedanke ich mich für ihre stete Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Anregung in experimentellen und computer-technischen Fragen.

Bärbel Reupert und Irmhild Rüter danke ich herzlich für die Mithilfe bei zahlreichen Experimenten. Für die Unterstützung in der Zell-Kultur bedanke ich mich bei Beate Weyrauther.

Ing. Grad. Jürgen Springer danke ich für Lösung von Problemen in technischen Angelegenheiten.

Bei Erika Lohmann und Karin Montag bedanke ich mich für die Unterstützung in allen organisatorischen Angelegenheiten, sowie bei allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie, die zu der freundlichen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Prof. Dr. Stefan Burdach und Uwe Hattenhorst danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung der Genexpressions-Analysen am Biozentrum in Halle a. S., sowie Silke Bergmann für die Betreuung an der Affymetrix-Anlage.

Recht herzlicher Dank geht auch an Dr. Lutz Kirchrath für die hilfreiche Unterstützung bei der Auswertung der Genexpressions-Analysen, sowie für die vielen anregenden Diskussionen und Ratschläge.

9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Düsseldorf, den

10 LEBENSLAUF

Svenja Debey

Lacherstr. 5A

42657 Solingen

geboren am 28.04.1972 in Solingen

Schulausbildung

August 1982 – Juni 1991:

Gesamtschule Solingen, Abschluß mit dem Abitur

Studium und Promotion

August 1991 – September 1992:

Sozialwissenschaften an der Bergischen
Universität Gesamthochschule Wuppertal

Oktober 1992 – Mai 1998:

Biologie an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf, Hauptfach Biologische Chemie
Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie und
Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf bei Prof. K. Schrör
(Thema: Analyse des Thromboxan- und EP₃-
Rezeptors des Schweins)

September 1998 - Februar 2002

Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie
und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine
Universität Düsseldorf bei Prof. K. Schrör
(Thema: Genexpressions-Analysen mit Iloprost an
humanen glatten Gefäßmuskelzellen)