

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

**Effekte von Fibrinogen auf die Mitogenese und Signaltransduktion
humaner glatter Gefäßmuskelzellen**

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Birgit Müschenborn

2004

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

gez.: Prof. Dr. Wolfgang H. M. Raab

Dekan

Referent: Prof. Dr. Karsten Schrör

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Tom P. Zucker

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4E-BP1	„eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1“
ADP	Adenosin-Diphosphat
Ang	Angiotensin II
ANOVA	„One-way Analysis of Variance“
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosin-Triphosphat
bFGF-2	„basal fibroblast growth factor-2“
BSA	Bovines Serumalbumin
CDK	„cyclin dependent kinase“
CREB	„cAMP responsive element binding protein“
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzellen
EDRF	„endothelium-derived relaxing factor“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	„epidermal growth factor“
eIF-4E	„eukaryotic initiation factor-4E“
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
ET	Endothelin
FACS	„fluorescence activated cell sorter“
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Foetales Kälberserum
FDP	Fibrinogen-Degradationsprodukt
FGF	„fibroblast growth factor“
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKHR	„forkhead family of transcription factors“
GDP	Guanosin-Diphosphat
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein

Grb2-Protein	„growth factor receptor binding protein 2“
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunden
HB-EGF	„heparin binding epidermal growth factor“
hSMC	humane glatte Gefäßmuskelzellen
HUVEC	Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen
ICAM-1	„intercellular adhesion molecule-1“
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IGF-1	„insulin-like growth factor-1“
IL	Interleukin
kDA	kilo Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
Kon	Kontrolle
LDL	„low density lipoprotein“
LFA-1	„lymphocyte function associated antigen-1“
M	molar (mol/l)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MCP-1	„monocyte chemotactic protein-1“
MEK	MAP-Kinase-Kinase (MAP/ERK-Kinase)
min	Minuten
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
mSOS	„mammalian son of sevenless“
mTOR	„mammalian target of rapamycin“
n.s.	nicht signifikant
NF κ B	„nuclear factor- κ B“
nm	nano Meter
NO	Stickstoffmonoxid
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	„phosphate-buffered saline“
PDGF	„platelet-derived growth factor“
PDK	„phosphoinositide-dependent-kinase“
PECAM-1 (CD31)	„platelet/endothelial cell adhesion molecule-1“

PGI ₂	Prostazyklin
PH	Pleckstrin-Homolog
PI	Phosphoinosit
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B (Akt)
PLC γ	Phospholipase C γ
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
PtdIns(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-Biphosphat
PtdIns(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rasGAP	ras-GTPase aktivierendes Protein
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SAP-1	„SRF accessory protein-1“
SDS	Na ⁺ -Dodecylsulfat
sec	Sekunden
SEM	„standard error of mean“
Ser	Serin
SFM	Serum-Freies-Medium
SH	Src-Homolog
SMC	glatte Gefäßmuskelzellen
SRF	„serum response factor“
TBS	„Tris-buffered saline“
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	„transforming growth factor- β “
Thr	Threonin
TNF α	„tumor necrosis factor α “
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
TXA ₂	Thromboxan A ₂
Tyr	Tyrosin
VCAM-1	„vascular adhesion molecule-1“

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	9
1.1 <u>DIE ATHEROSKLEROSE</u>	9
1.2 <u>FIBRINOGEN ALS RISIKOFAKTOR DER ATHEROSKLEROSE</u>	10
1.2.1 Struktur des Fibrinogenmoleküls	11
1.2.2 Funktion von Fibrinogen und Bedeutung in atherosklerotischen Prozessen .	12
1.2.3 Das „Intercellular Adhesion Molecule-1“(ICAM-1) als Fibrinogenrezeptor	13
1.2.3.1 Struktur von ICAM-1	13
1.2.3.2 Funktion von ICAM-1 und Bedeutung in atherosklerotischen Prozessen ..	14
1.2.4 Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin („Vitronectin-Rezeptor“) als Fibrinogenrezeptor.....	15
1.2.4.1 Struktur von $\alpha_v\beta_3$	16
1.2.4.2 Funktion von $\alpha_v\beta_3$ und Bedeutung in atherosklerotischen Prozessen.....	17
1.3 <u>DIE ROLLE DER GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN IN DER ATHEROSKLEROSE</u>	18
1.3.1 Die Entstehung der Restenose.....	18
1.3.2 Die PDGF-induzierte mitogene Signaltransduktion	19
1.3.2.1 Der ERK-Weg	19
1.3.2.2 Der Phosphoinositol-3-Kinase(PI3-Kinase)-Weg	20
1.4 <u>FRAGESTELLUNG</u>	23
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 <u>PUFFER, LÖSUNGEN UND SUBSTANZEN</u>	24
2.2 <u>ZELLKULTUR</u>	25
2.2.1 Präparation humaner glatter Gefäßmuskelzellen (hSMC)	25
2.2.2 Herstellung der Subkulturen	26
2.2.3 Stimulation von hSMC für Versuche	26
2.3 <u>DNA-SYNTHESE-MESSUNG</u>	27
2.4 <u>PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN</u>	28
2.4.1 Isolierung von Proteinen	28
2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen.....	28
2.4.3 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ..	28
2.4.4 Transfer von Proteinen (Western-Blot).....	29
2.4.5 Entwicklung von Western-Blots mittels Chemilumineszenz.....	29

2.4.6	Kontrolle der Proteinbeladung	30
2.5	<u>DURCHFLUSSZYTOMETRIE VON GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN (hSMC)</u>	31
2.6	<u>AUSWERTUNG UND STATISTIK</u>	32
3.	ERGEBNISSE	33
3.1	<u>WIRKUNG VON FIBRINOGEN AUF DIE DNA-SYNTHESE VON hSMC</u>	33
3.1.1	Stimulation der DNA-Synthese in hSMC durch Fibrinogen	33
3.1.2	Effekte auf die Fibrinogen-induzierte DNA-Synthese durch Proteinkinase- Inhibitoren	34
3.1.2.1	Hemmung des ERK-1/2 Signalweges	34
3.1.2.2	Hemmung des PI3-Kinase Signalweges.....	35
3.1.3	Effekte auf die Fibrinogen-induzierte DNA-Synthese durch Rezeptor-..... Antagonisten	36
3.1.3.1	Blockade von ICAM-1 durch spezifische Antikörper hat keinen Einfluß .. auf die Fibrinogen-induzierte DNA-Synthese	36
3.1.3.2	Blockade von $\alpha_v\beta_3$ durch Abciximab (Reopro®) hat keinen Einfluß auf... die Fibrinogen-induzierte DNA-Synthese	37
3.2	<u>WIRKUNGEN VON FIBRINOGEN AUF DIE INTRAZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTION IN hSMC</u>	38
3.2.1	Fibrinogen bewirkt die Phosphorylierung von ERK-1/2	38
3.2.1.1	Effekte auf die Fibrinogen-induzierte ERK-1/2-Phosphorylierung durch .. Rezeptor-Antagonisten	39
3.2.2	Fibrinogen bewirkt die Phosphorylierung von Akt.....	40
3.2.2.1	Effekte auf die Fibrinogen-induzierte Akt-Phosphorylierung durch..... Rezeptor-Antagonisten	42
3.2.3	Fibrinogen bewirkt die Phosphorylierung der p38-MAPK.....	43
3.2.3.1	Effekte auf die Fibrinogen-induzierte p38-Phosphorylierung durch..... Rezeptor-Antagonisten	44
3.2.4	Fibrinogen bewirkt die Expression von c-Jun.....	45
3.2.5	Wirkung von Fibrinogen auf das NFκB-System	46
3.2.5.1	Fibrinogen bewirkt keine Degradation des Inhibitorproteins IκBα	46
3.3	<u>WIRKUNG VON FIBRINOGEN AUF DIE EXPRESSION VON OBERFLÄCHEN- REZEPTOREN</u>	47
3.3.1	Fibrinogen beeinflusst nicht die basale ICAM-1-Expression auf hSMC.....	47
3.3.2	Fibrinogen beeinflusst nicht die basale $\alpha_v\beta_3$ -Expression auf hSMC	48

4. DISKUSSION	50
4.1 <u>EFFEKTE VON FIBRINOGEN AUF DIE DNA-SYNTHESE IN hSMC</u>	51
4.2 <u>EFFEKTE VON FIBRINOGEN AUF DIE SIGNALTRANSDUKTION IN hSMC</u>	53
4.2.1 Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch Fibrinogen.....	53
4.2.2 Bedeutung von ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$ in der Fibrinogen-induzierten	
Signaltransduktion.....	56
4.3 <u>BEDEUTUNG VON FIBRINOGEN FÜR DIE EXPRESSION VON OBERFLÄCHEN-</u>	
<u>REZEPTOREN</u>	60
4.3.1 Effekte von Fibrinogen auf die Expression von ICAM-1.....	61
4.3.2 Effekte von Fibrinogen auf die Expression von $\alpha_v\beta_3$	62
4.4 <u>KLINISCHE BEDEUTUNG</u>	63
5. ZUSAMMENFASSUNG	65
6. LITERATURVERZEICHNIS	67
7. VERÖFFENTLICHUNGEN	83
8. DANKSAGUNG	84
9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	86
10. LEBENSLAUF	87

1. EINLEITUNG

1.1 Die Atherosklerose

Die Pathogenese des atherosklerotischen Prozesses wurde ausführlich von Ross (1987 und 1993) beschrieben und basiert auf der „Verletzungsreaktionshypothese“ und wird heute als entzündlicher Prozess angesehen. Der Ausgangspunkt ist die durch das Endothel schädigende Risikofaktoren verursachte sog. „endotheliale Dysfunktion“. Dabei kommt es zum Verlust der physiologischen Funktion des Endothels. Die Hauptaufgaben des Gefäßendothels bestehen in der Regulation der Fließeigenschaften des Blutes, der Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten und in der Regulation des vaskulären Tonus über die Bildung von Mediatoren, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin (PGI₂), Endothelin (ET) und Angiotensin II (Ang II). Das geschädigte Endothel entwickelt Kompensationsmechanismen in Form einer Veränderung seiner normalen homöostatischen Eigenschaften. Die Folge ist eine verstärkte Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten, eine prokoagulative anstatt antikoagulative Wirkung sowie die Bildung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Dadurch wird die Einwanderung von Makrophagen und Leukozyten in den subendothelialen Raum gefördert, die wiederum Zytokine und Wachstumsfaktoren ausschütten. Durch die Adhäsion von Thrombozyten an das geschädigte Endothel oder freigelegte subendotheliale Strukturen, wie Kollagen, kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten und zur Ausschüttung thrombozytärer Speichergranula, die Zytokine und Wachstumsfaktoren enthalten. Schließlich erfolgt die Aggregation der Thrombozyten. Endothelzellen (EC) können Lipoproteine binden und durch transzellulären Transport über Vesikel vom Lumen in die Intima transportieren, dabei können sie „low density lipoprotein“ (LDL) modifizieren bzw. oxidieren. Modifiziertes LDL wird von den Makrophagen phagozytiert, die somit zu Schaumzellen werden. Die intimale Lipidakkumulation ist die erste pathologisch sichtbare Veränderung in der Arterienwand. Zusätzlich wird durch den inflammatorischen Prozess durch freigesetzte Zytokine und Wachstumsfaktoren die Migration der glatten Gefäßmuskelzellen (SMC) von der Media in die Intima, die Dedifferenzierung in den synthetischen Phänotyp und ihre Proliferation stimuliert. Dort synthetisieren sie Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie z.B. elastische Faserproteine, Kollagen und Proteoglykane. Konsekutiv kommt es zur Verdickung der Intima durch Anhäufung von zellulären Elementen und

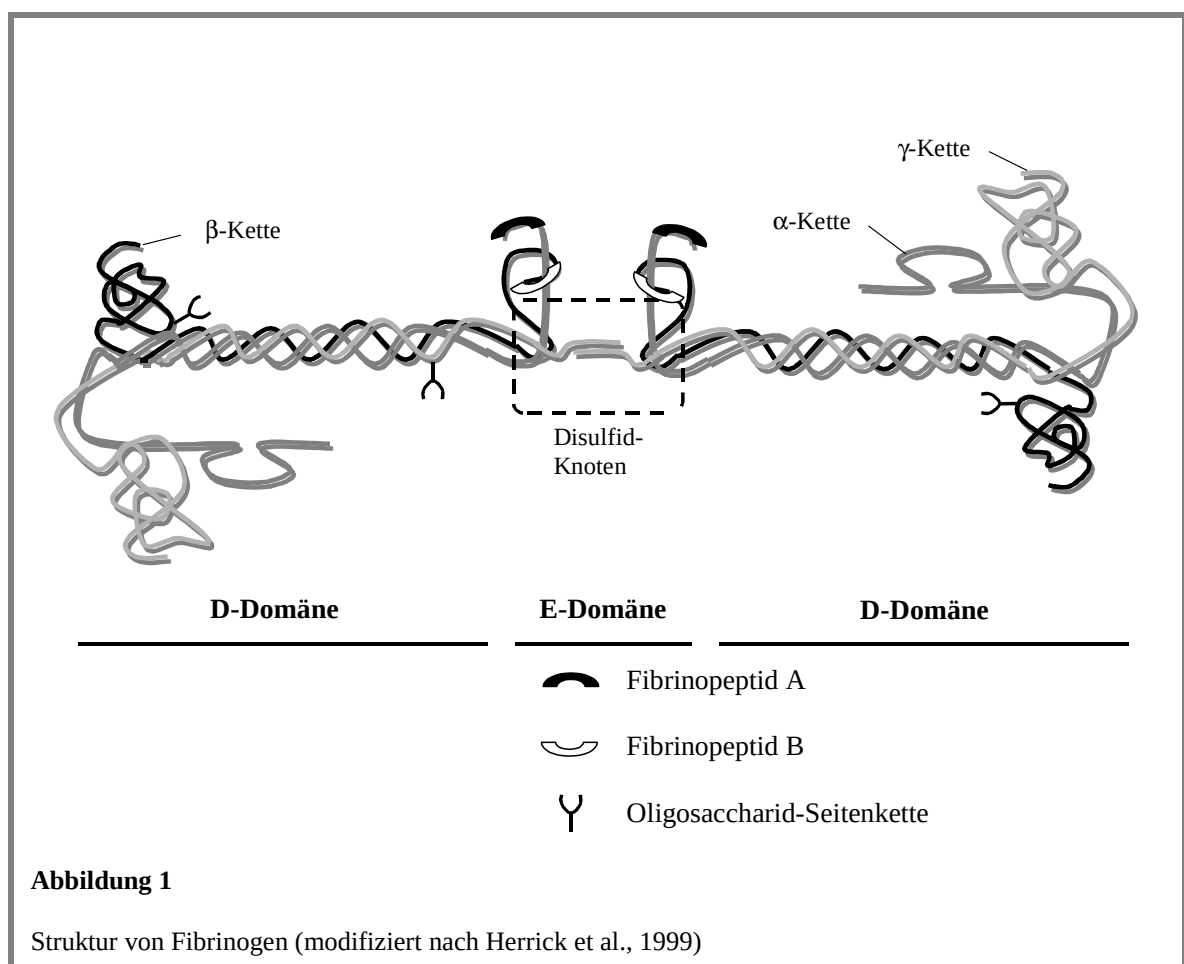
von neu gebildetem Bindegewebe, was letztlich zu einer Gefäßverengung (Stenose) führt. Die Atherosklerose der Koronargefäße manifestiert sich als Koronare Herzkrankheit (KHK), wobei flusslimitierende Koronarstenosen zu einer Myokardischämie führen können.

1.2 Fibrinogen als Risikofaktor der Atherosklerose

Zu den wichtigsten systemischen Risikofaktoren, die zur Entwicklung der Atherosklerose beitragen, gehören ein erhöhter Plasma-Cholesterinspiegel, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, fortgeschrittenes Alter, Übergewicht und Rauchen (Lefkowitz und Willerson, 2001). In den letzten Dekaden zeigte sich ein Zusammenhang zwischen verschiedenen Hämostase-Faktoren und dem Atherosklerose-Risiko. Seit der Northwick Park Heart (NPH) Studie (Meade et al., 1980 und 1986) bestätigten mehrere prospektive epidemiologische Studien eine Assoziation zwischen einem erhöhten Fibrinogen-Plasmaspiegel und atherosklerotischen Manifestationen in koronaren, peripheren und cerebralen Gefäßen (Wilhelmsen et al., 1984; Stone und Thorp, 1985; Kannel et al., 1987; Lee et al., 1999; Yarnell et al., 1991). Der Plasmaspiegel von Fibrinogen, welches in atherosklerotischen Läsionen präsent ist (Bini et al., 1989; Smith, 1993), wird durch kardiovaskuläre Risikofaktoren erhöht. Auch durch Verletzungen, Operationen, akute Infektionen und Infarkte kommt es zu einer Erhöhung des Fibrinogen-Plasmaspiegels (Montalescot et al., 1998). Als weiteren Hinweis auf eine Bedeutung von Fibrinogen als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen berichteten Scarabin et al. (2003), daß die geographischen Unterschiede des Fibrinogen-Plasmaspiegels zwischen Nordirland und Frankreich mit der Inzidenz der KHK korrelieren. Dies resultierte in einer höheren Inzidenz für Nordirland. Ebenfalls korrelieren Unterschiede in den Fibrinogen-Genotypen mit dem Risiko der KHK und peripherer arterieller Verschußkrankheit (PAVK) (Lee et al., 1999; de Maat et al., 1998).

1.2.1 Struktur des Fibrinogenmoleküls

Humanes Fibrinogen ist ein im Blut zirkulierendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 340 kDa und wird primär in den Hepatozyten synthetisiert. Als Blutkomponente liegt es in einer Konzentration von ca. 9 μM mit einer Halblebenszeit von 100 h vor. Es ist zusammengesetzt aus zwei symmetrischen Halbmolekülen, die jeweils aus drei unterschiedlichen Polypeptidketten ($\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ und γ) bestehen. Das Fibrinogenmolekül besitzt drei Domänen, zwei terminale D-Domänen (67 kDa), die beide mit einer einzelnen zentralen E-Domäne (33 kDa) über eine Tripelstrang-Anordnung der Polypeptidketten verbunden sind (Herrick et al., 1999). An den aminoterminalen Enden der $\text{A}\alpha$ - und $\text{B}\beta$ -Ketten befinden sich die Fibrinopeptide A und B, die bei Konversion von Fibrinogen in Fibrin abgespalten werden. Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung des Fibrinogenmoleküls.



1.2.2 Funktion von Fibrinogen und Bedeutung in atherosklerotischen Prozessen

Die wichtigsten Funktionen von Fibrinogen betreffen die Hämostase und bestehen in der Thrombozyten-Aggregation durch Adhäsion von Fibrinogen an Glykoprotein IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) und in der Bildung eines unlöslichen Fibringerinnsels im Endstadium der Blutgerinnungskaskade. An Gewebeläsionen wird Fibrinogen durch α -Thrombin zu Fibrin konvertiert. Dabei werden die Fibrinopeptide A und B vom aminoterminalen Ende der $A\alpha$ - und $B\beta$ -Ketten abgespalten. Nachfolgend kommt es zur spontanen Polymerisation der Fibrinmonomere, die unter Anwesenheit von Transglutaminase (Faktor XIIIa) zu einem stabilen Fibrinnetzwerk quervernetzt werden (Mosesson, 1997). Anschließend wird die Fibrinmatrix primär unter der Wirkung von Plasmin in die Fragmente X, Y, D und E gespalten. Das Fibringerinnsel dient als Gerüst für die Adhäsion, Ausbreitung, Migration und Proliferation von Zellen, was wesentlich zur Reparatur des Gewebes beiträgt. Danach wird das Fibringerinnsel aufgrund der Wirkung des fibrinolytischen Systems wieder aufgelöst. Bei der Fibrinolyse wird Fibrin(ogen) durch Plasmin proteolytisch abgebaut, wobei die Fibrinogen-Degradationsprodukte Fragment D und E entstehen.

Zusätzlich zu den thrombogenen Effekten scheint Fibrinogen weitere Eigenschaften zu besitzen, die potentiell zur Atherogenese beitragen. Fibrinogen vermittelt Interaktionen zwischen vaskulären Zellen, Thrombozyten und Leukozyten, die alle in atherosklerotische Prozesse involviert sind. Dabei bindet es an Adhäsionsmoleküle, wie $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_M\beta_2$, und „Intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) (Herrick et al., 1999; Bombeli et al., 1998 und Harley et al., 2000). Diese Zellinteraktionen sind essentiell für die Rekrutierung von Leukozyten, die zu einer Entzündungsreaktion in der Gefäßwand führen (Ross, 1999), und von Blutplättchen, die eine Quelle von Wachstumsfaktoren darstellen (Weber und Schrör, 1999). Fibrinogen und seine Degradationsprodukte scheinen die vaskuläre Proliferation zu stimulieren. Obwohl schon in den 80-iger Jahren beobachtet wurde, daß Fibrinogen die Mitogenese in hämatopoetischen Zellen induziert (Lévesque et al., 1986), wurden die Effekte von intaktem Fibrinogen auf die Mitogenese von SMC bisher nicht näher charakterisiert. Fibrin-Degradationsprodukte stellen einen proliferativen Stimulus für SMC in wachsenden atherosklerotischen Plaques dar (Smith et al., 1992) und haben eine chemoattraktive Wirkung auf Neutrophile, Fibroblasten und Monozyten (Herrick et al., 1999). Des weiteren begünstigen Fibrinablagerungen auf oder in der Intima die Migration der SMC und tragen somit zum Plaque-Wachstum bei (Smith, 1993).

Ebenfalls beeinflusst Fibrinogen die Ablagerung von Lipiden in fibrösen Plaques, Fibrin bindet Lipoprotein (a) in hoher Affinität mit konsekutiver Lipidakkumulation (Smith, 1993).

1.2.3 Das „Intercellular Adhesion Molecule-1“ (ICAM-1) als Fibrinogenrezeptor

Die Interaktionen zwischen Endothelzellen und Leukozyten über Adhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von Leukozyten in der Atherogenese (Jang et al., 1994). ICAM-1 (CD54) vermittelt die Adhäsion von Leukozyten an aktiviertes Endothel über die Bindung mit den Leukozyten-Integrinen LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$; CD18/CD11a) oder Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$; CD18/CD11b). ICAM-1 stellt auch einen Rezeptor für lösliches Fibrinogen dar (Languino et al., 1993), welches als Brückenmolekül zwischen EC und Leukozyten (Duperray et al., 1997) dient. Auf diese Weise kann Fibrinogen die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel (Altieri, 1999) und die transendotheliale Migration von Monozyten (Languino et al., 1995) fördern. Ebenfalls scheint die Interaktion von Fibrinogen mit ICAM-1 an der Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel (Bombeli et al., 1998) und an einer vasomotorischen Antwort humaner V. saphena (Hicks et al., 1996) beteiligt zu sein. Ferner wird ICAM-1 in Verbindung gebracht mit einer mitogenen Antwort auf Fibrinogen in lymphoblastoiden Zelllinien (Gardiner und D'Souza, 1997). Fibrinogen interagiert über die γ -Kette des Fibrinogenmoleküls (Altieri et al., 1995) mit der Bindungs-Domäne in der aminoterminalen Domäne von ICAM-1 (Languino et al., 1995).

1.2.3.1 Struktur von ICAM-1

ICAM-1 (CD54) ist ein 90 bis 110 kDa großes Transmembran-Glykoprotein und enthält eine Serie von fünf Immunglobulin(Ig)-artigen Domänen. Des weiteren besteht es aus einer Transmembran-Domäne (24 Aminosäuren) und einer zytoplasmatischen Domäne (28 Aminosäuren). Es enthält insgesamt 505 Aminosäuren, wovon 453 überwiegend hydrophobe Aminosäuren die Immunglobulin-Domänen bilden. In Abb. 2 ist die ICAM-1-Struktur (van de Stolpe und van der Saag, 1996) schematisch dargestellt.

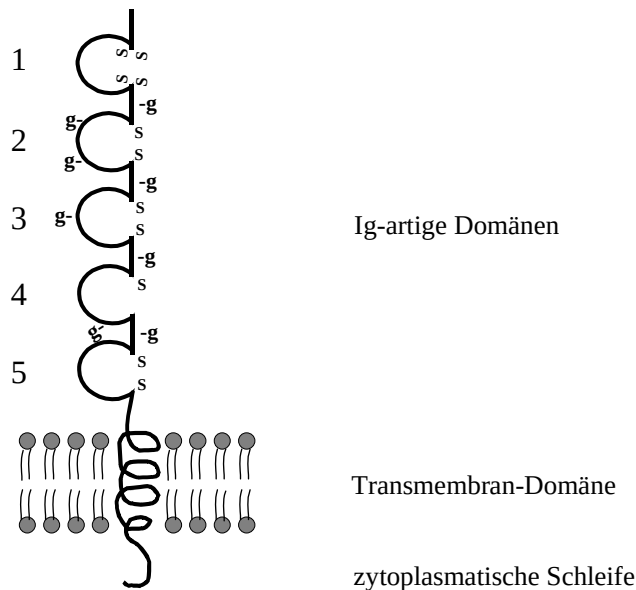


Abbildung 2

Struktur von ICAM-1 (modifiziert nach van de Stolpe und van der Saag, 1996); 1-5 = Immunglobulin (Ig)-artige Domänen; S = Schwefelatom in Disulfidbrücken; g = Glykosylierungsstellen.

1.2.3.2 Funktion von ICAM-1 und Bedeutung in atherosklerotischen Prozessen

ICAM-1 bietet als Gegenrezeptor für β_2 -Integrine der Leukozyten einen Mechanismus für die Leukozyten-Endothel-Interaktion und die Leukozytenmigration in Entzündungsgebiete. Es trägt zur Rekrutierung von Leukozyten, sowie zur Thrombozytenadhäsion am Endothel bei. Vermutlich ist es auch in proliferative Prozesse involviert. So zeigte sich im Tiermodell (Ratte) eine Hemmung der Neointimaproliferation nach Ballonangioplastie durch Antikörper gegen ICAM-1 (Yasukawa et al., 1997). In immunhistochemischen Studien konnte die Expression von ICAM-1 auf intimalen SMC im Bereich atherosklerotischer Plaques nachgewiesen werden, während SMC in der normalen unveränderten Gefäß-Media dieses Adhäsionsmolekül nicht exprimieren (Jang et al., 1993). Als Hauptfunktion fördert ICAM-1 die interzelluläre Kommunikation über die Adhäsion von Zellen. Diese ICAM-1-abhängige Adhäsion ist bedeutend in der afferenten und efferenten Immunantwort, einschließlich der Antigen-Präsentation, der T-Zell-abhängigen Antikörper-Antwort, der T-Zell-Proliferation und der zellvermittelten Zytotoxizität. ICAM-1 spielt eine wichtige Rolle in inflammatorischen Prozessen, einschließlich Atherosklerose, Asthma

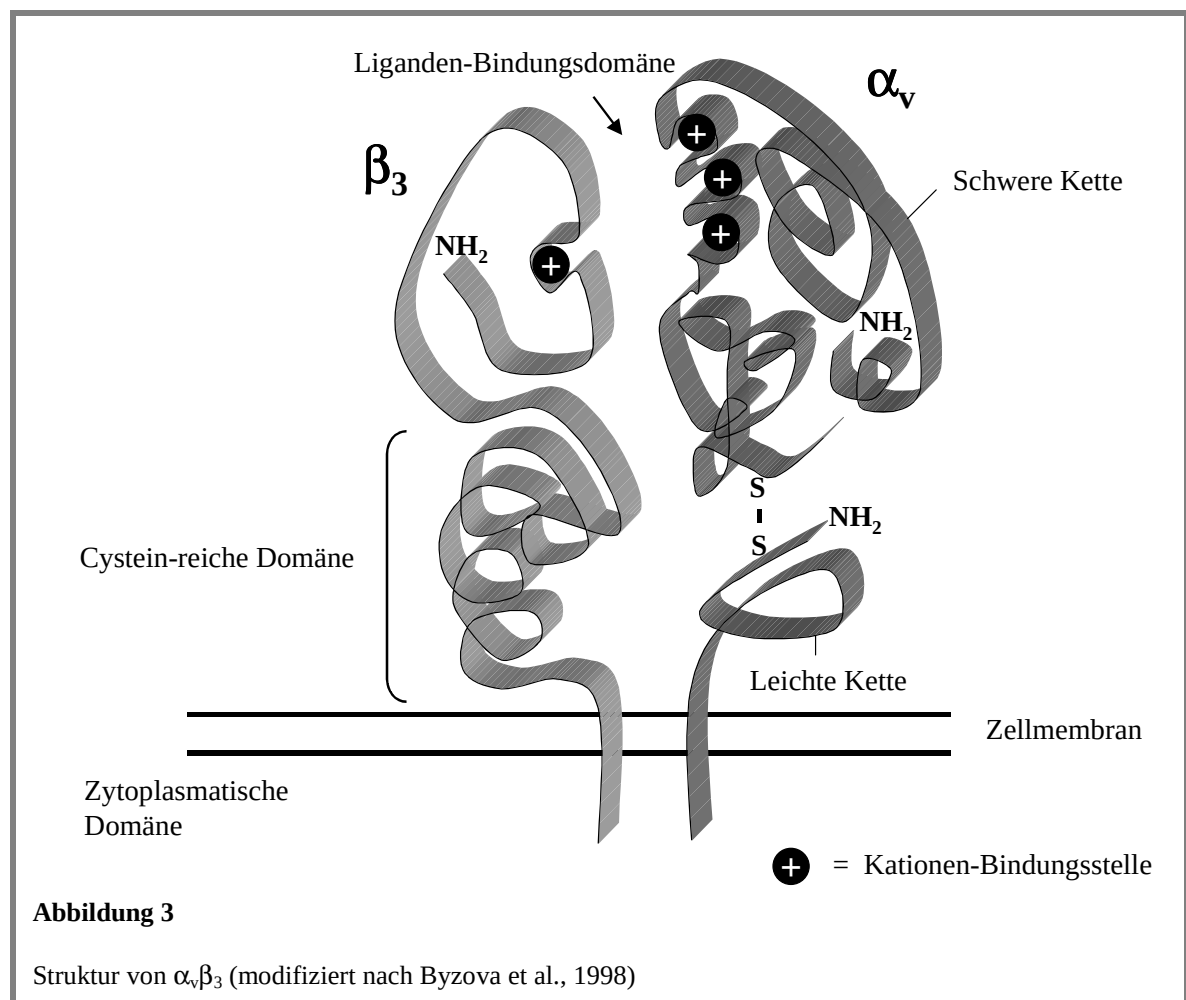
und Autoimmunerkrankungen, in der Pathogenese von Infektionen mit Rhinovirus und Plasmodium falciparum, bei malignen Erkrankungen (z.B. Melanome und Lymphome), sowie in ischämischen und neurologischen Erkrankungen (van de Stolpe und van der Saag, 1996; Tsakadze et al., 2002). Im Plasma finden sich bei vaskulären Erkrankungen erhöhte Mengen an löslichem ICAM-1, welches durch proteolytischen Abbau der ICAM-1-Ektodomäne entsteht, die mit dem Schweregrad des Erkrankungsprozesses korrelieren zu scheinen (Tsakadze et al., 2002).

1.2.4 Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin („Vitronectin-Rezeptor“) als Fibrinogenrezeptor

Integrine sind Zelloberflächenrezeptoren, die eine Verbindung des Zytoskeletts der Zelle mit Matrixproteinen oder anderen Zellen herstellen und somit eine Interaktion ermöglichen. Sie stellen eine Superfamilie von heterodimeren Glykoproteinen dar, die aus nichtkovalent gebundenen α - und β -Untereinheiten zusammengesetzt sind. Anhand der verschiedenen Untereinheiten werden Integrine basierend auf der gemeinsamen β -Untereinheit in Subfamilien unterteilt. Zur β_3 -Subfamilie der Integrine gehört das Glykoprotein IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$), dessen Expression auf Thrombozyten und Megakaryozyten beschränkt ist, und der „Vitronectin-Rezeptor“ $\alpha_v\beta_3$ (CD51/CD61), welcher ubiquitär verbreitet und das dominierende Integrin auf vaskulären Zellen im Allgemeinen und auf EC im Besonderen ist. Die Ligandenbindung an $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_v\beta_3$ erfolgt über das Motiv Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD), das in vielen Matrixmolekülen vorhanden ist. Fibrinogen dient auf diese Weise als Ligand für $\alpha_v\beta_3$ (Cheresh, 1987). Fibrinogen beinhaltet drei potentielle Integrin-Bindungsstellen, zwei in Form von RGD-Sequenzen auf der A α -Kette und eine Integrin-Bindungsstelle, die keine RGD-Sequenz enthält, auf der γ -Kette. Die Bindung an $\alpha_v\beta_3$ wird bevorzugt über die RGD-Sequenz in der α -Kette von Fibrinogen vermittelt (Byzova et al., 1998). Die Interaktion von Fibrinogen mit $\alpha_v\beta_3$ scheint an der Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel beteiligt zu sein (Bombeli et al., 1998).

1.2.4.1 Struktur von $\alpha_v\beta_3$

Die Integrinmonomere bestehen jeweils aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer C-terminalen zytosolischen Domäne. Die α_v -Untereinheit besteht aus einer schweren extrazellulären Peptidkette, einer leichten Kette mit einer transmembranen Region und einem zytoplasmatischen Teil. Sie beinhaltet 1018 Aminosäuren, 860 in der schweren Kette und 158 in der leichten Kette. Ferner enthält die α_v -Untereinheit drei potentielle Bindungsstellen für Kationen, die für die Ligandenbindung erforderlich sind. Die β_3 -Untereinheit von $\alpha_v\beta_3$, die der von $\alpha_{IIb}\beta_3$ entspricht, beinhaltet 762 Aminosäuren, die zu 90 % der extrazellulären Sequenz angehören. In Zellmembrannähe befinden sich vier Wiederholungen einer Cystein-reichen Region, die dieser eine Proteolyse-Resistenz verleihen. Die $\alpha_v\beta_3$ -Struktur (Byzova et al., 1998) ist in der folgenden Abb. 3 dargestellt.



1.2.4.2 Funktion von $\alpha_v\beta_3$ und Bedeutung in atherosklerotischen Prozessen

Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin dient als Adhäsionsmolekül und vermittelt die Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix (Plasma- und Matrixproteine). Es scheint eine wichtige Rolle in der Angiogenese, in intimaler Hyperplasie nach arterieller Verletzung, in Wundheilungsprozessen und bei malignen Erkrankungen zu spielen (Byzova et al., 1998; Horton, 1997). Eine gesteigerte Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen konnte von Hoshiga et al. (1995) im Endothel und auf neointimalen SMC in humanen atherosklerotischen Koronararterien nachgewiesen werden. Zudem führte die Anwendung spezifischer $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten in mehreren unterschiedlichen Tiermodellen zu einer Reduktion der Neointima-Bildung nach Gefäßverletzung (Sajid und Stouffer, 2002). Ebenfalls inhibieren $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten die migratorische Antwort auf „platelet-derived growth factor“ (PDGF) in humanen SMC (Baron et al., 2000; Choi et al., 1994; Itoh et al., 1997). $\alpha_v\beta_3$ reguliert die proliferative Antwort auf Wachstumsfaktoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoragonisten. Somit beeinflusst $\alpha_v\beta_3$ die Migration und Proliferation von SMC, welche wesentliche Pathomechanismen für die Atherogenese und die Neointima-Bildung darstellen. Darüber hinaus ist $\alpha_v\beta_3$ auch an der Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten, einem weiteren wichtigen Mechanismus in atherosklerotischen Prozessen, beteiligt. Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf Leukozyten stellt einen Gegenrezeptor für „platelet/endothelial cell adhesion molecule-1“ (PECAM-1/CD31) auf EC dar. Durch diese Interaktion wurde nachweislich die Bindung von Leukozyten (Piali et al., 1995) und von Eosinophilen (Chiba et al., 1999) an kultivierte EC humaner Umbilikalvenen (HUVEC) vermittelt. Ebenfalls wurde für $\alpha_v\beta_3$ eine Bedeutung für die Rekrutierung von Makrophagen nach Angioplastie nachgewiesen (Bishop et al., 2001).

1.3 Die Rolle der glatten Gefäßmuskelzellen in der Atherosklerose

1.3.1 Die Entstehung der Restenose

Die Proliferation von SMC spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von okklusiven Gefäßerkrankungen, wie z.B. bei der Bildung von atherosklerotischen Plaques oder Restenosen nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA). Bei dieser etablierten Methode zur Revaskularisierung von stenotischen Koronararterien werden die Gefäße durch Einführen und Aufblasen eines Ballonkatheters dilatiert. Dabei kommt es zu einer Überdehnung und Verletzung der Gefäßwand im betroffenen Bereich mit nachfolgender Aktivierung und Anlagerung von Thrombozyten, die Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF freisetzen. Dadurch wird die Migration und Proliferation von SMC stimuliert. Im Gegensatz zur initialen Erfolgsrate, bleibt die Langzeit-Effektivität dieser Methode begrenzt. Die Restenose entwickelt sich innerhalb weniger Monate nach PTCA. Dabei kommt es zur Akkumulation von neointimalen SMC, die auch bei der Entstehung fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen eine große Rolle spielt. Die Akkumulation von SMC in der Intima bei atherosklerotischen Prozessen wird verursacht durch direkte Migration der medialen SMC in die Intima, Proliferation und möglicherweise herabgesetzte Apoptose (Bornfeldt, 1996).

Adulte SMC der Media sind physiologisch kontraktile und sprechen nicht generell auf wachstumsregulierende Moleküle an (Raines und Ross, 1993). Dieser „kontraktile Phänotyp“ enthält viele Myofilamente und besitzt die Fähigkeit auf vasoaktive Agentien zu reagieren. In atherosklerotischen Läsionen oder nach Ballon-Katheterisierung infolge einer Endothelschädigung erfolgt die sog. „phänotypische Modulation“, d.h. die Zellen verlieren die kontraktile Elemente, ihre Ansprechbarkeit auf Wachstumsfaktoren nimmt zu, und die Sekretion von Proteinen wird gesteigert (Raines und Ross, 1993; Owens et al., 1996). Aus dieser strukturellen Veränderung resultiert der „synthetische Phänotyp“. Unter Bildung einer Neointima kommt es zur Anhäufung zellulärer Komponenten, besonders der SMC und zur gesteigerten Synthese von Matrixproteinen, die zu einer Verengung oder zum Verschluss des Gefäßlumens führen können. Die extrazelluläre Matrix und wachstumsregulierende Moleküle beeinflussen die phänotypische Modulation. Zu den stärksten Wachstumsfaktoren, die direkt die DNA-Replikation und Proliferation kultivierter SMC induzieren, gehören PDGF, „basal fibroblast growth factor-2“ (bFGF-2), und „heparin binding epidermal growth factor“ (HB-EGF) (Ross, 1993). Das PDGF-Molekül ist ein dimeres Protein aus zwei

Polypeptidketten (A- und B-Kette), welches durch drei Disulfidbrücken zusammengehalten wird. Es existieren die drei Isoformen PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB, die prädominant ist. In atherosklerotischen Läsionen befindet sich reichlich PDGF-BB in aktivierten Makrophagen (Bornfeldt, 1996). PDGF spielt bei der Migration der arteriellen SMC, deren Proliferation und Matrixsynthese eine wichtige Rolle (Raines und Ross, 1993), wobei nicht nur Thrombozyten PDGF freisetzen, sondern auch EC und SMC selbst (Ross, 1993).

1.3.2 Die PDGF-induzierte mitogene Signaltransduktion

1.3.2.1 Der ERK-Weg

Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF agieren über Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Der PDGF-Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, der α - und der β -Untereinheit, die die Rezeptor-Isoformen $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ und $\beta\beta$ bilden und sich ligandeninduziert zu Homo- oder Heterodimeren zusammenlagern. Durch Ligandenbindung des PDGF-Dimers an seinen Rezeptor erfolgt die Dimerisierung der Rezeptor-Untereinheiten und die Aktivierung der zytosolischen Tyrosinkinase und deren Autophosphorylierung (Claesson-Welsh, 1994). Nebenbei kommt es auch zur Phosphorylierung spezifischer zytoplasmatischer Substrate. Im Zuge der Autophosphorylierung des Rezeptors werden Tyrosine in Motiven phosphoryliert, an die nachgeschaltete Signalproteine spezifisch über Src-Homolog-2(SH2)-Domänen binden können. Dazu gehört auch die Isoform γ der Phospholipase C (PLC γ) und die p85-Untereinheit der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) (Claesson-Welsh, 1994). Unter anderem werden auch Adaptorproteine gebunden, deren Aufgabe in der Zusammenführung der Signalmoleküle besteht, wie das „growth factor receptor binding protein 2“ (Grb2-Protein). Grb2 ist über eine SH3-Domäne an den Ras-Guaninnukleotid-Austauschfaktor „mammalian son-of-sevenless“ (mSos) gebunden, der über einen Nucleotidaustausch das Ras-Protein aktivieren kann, indem Ras von der inaktiven GDP-Form in die aktive GTP-bindende Form konvertiert wird (Force und Bonventre, 1998). Ras-GTP bindet an die Raf-1-Kinase, die dadurch an die Plasmamembran transloziert wird. Als Folge wird die Aktivität der Raf-1-Kinase stimuliert, und das Signal wird über die Aktivierung der Kaskade der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) weitergeleitet. Raf-1 aktiviert die MAP-Kinase-Kinasen (MEK), die nachfolgend die MAP-Kinasen phosphorylieren.

Diese Gruppe der MAP-Kinasen werden auch als extrazellulär regulierte Kinasen (ERK) bezeichnet. Dazu gehören u.a. die p44/p42 MAP-Kinasen (ERK-1/2). Durch Aktivierung der ERKs erfolgt die Translokation der ERK-Proteine in den Zellkern (Lenormand et al., 1993). Dort aktivieren sie Transkriptionsfaktoren wie c-jun (Pulverer et al., 1991), c-myc, c-fos, Elk-1, SAP-1 und CREB, die notwendig sind für die Induktion der Zellproliferation.

1.3.2.2 Der Phosphoinositol-3-Kinase(PI3-Kinase)-Weg

Die PI3-Kinasen werden in drei Hauptklassen aufgeteilt. Die PI3-Kinase (Klasse Ia) ist ein zytosolisches Heterodimer, zusammengesetzt aus einer katalytischen Untereinheit (110 kDa) mit den Isoformen p110 α , - β oder - δ und einer regulatorischen Untereinheit p85 (85 kDa). Sie bildet einen Komplex mit aktivierten RTK oder mit Signalproteinen, die in Erkennungsmotiven (z.B. YMXM) Tyrosin(Tyr)-phosphoryliert sind. Sie wird in Antwort auf Wachstumsfaktoren aktiviert. In diesem Zusammenhang wurde von Auger et al. (1989) über eine Aktivierung der PI3-Kinase in Antwort auf PDGF in humanen vaskulären SMC berichtet. Durch direkte Bindung der SH2-Domäne der regulatorischen p85-Untereinheit an die Phosphotyrosin-Reste der Kinase-Domäne des PDGF-assoziierten Rezeptors wird die PI3-Kinase aktiviert. Die SH2-Domänen der p85-Untereinheit vermitteln die Wechselwirkung mit verschiedenen Signalproteinen, die an der Übertragung von wachstumsregulierenden Signalen beteiligt sind. Die aktivierte PI3-Kinase phosphoryliert Phosphoinositide (PI) an der 3'-Position des Inositolringes. Somit entstehen Phosphatidylinositol-Verbindungen, die als intrazelluläre Botenstoffe dienen. Dazu gehören Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PtdIns(3,4)P₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃). Signalproteine, die eine Pleckstrin-Homolog(PH)-Domäne besitzen, kumulieren durch direkte Bindung an das Plasmamembran-Lipid PtdIns(3,4,5)P₃. Dadurch werden die Serin-Threonin-Kinase Akt, die auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet wird, und „phosphoinositide dependent kinase-1“ (PDK-1) an die Plasmamembran rekrutiert (Cantley, 2002). Es existieren die drei Isoformen Akt-1, Akt-2 und Akt-3. In unstimulierten Zellen befindet sich Akt im Zytoplasma und die regulatorischen Phosphorylierungsstellen Threonin 308 (Thr 308) und Serin 473 (Ser 473) sind nicht phosphoryliert. Nach Bindung der PH-Domäne von Akt an Lipidprodukte der PI3-Kinase und konsekutiver Rekrutierung an die Plasmamembran erfolgt die Phosphorylierung an den regulatorischen

Phosphorylierungsstellen Thr 308 durch PDK-1 und für eine vollständige Aktivierung an Ser 473 durch eine unbekannte Kinase, die als PDK-2 bezeichnet wird (Hemmings, 1997; Downward, 1998). Anschließend verläßt Akt die Plasmamembran um intrazelluläre Substrate zu phosphorylieren. Eine Vielzahl der Substrate von Akt stellen Apoptose-regulierende Moleküle dar, die wie das proapoptotische Bcl-2 Familienmitglied Bad und „Forkhead family of transcription factors“ (FKHR) durch Akt inaktiviert werden. Akt ist wesentlich an der Regulation des Glukosestoffwechsels und der Insulin-induzierten Signalübertragung beteiligt. Akt fördert die Proteinsynthese durch direkte Effekte auf „mammalian target of rapamycin“ (mTOR), „eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1“ (4E-BP1), welches die Aktivität des „eukaryotic initiation factor 4E“ (eIF-4E) reguliert, und p70 S6-Kinase (Shiojima und Walsh, 2002), die auch direkt durch PDK-1 unabhängig von Akt aktiviert werden kann (Alessi et al., 1998; Pullen et al., 1998). Darüber hinaus kontrolliert Akt den Zellzyklus und die Zellproliferation durch direkte Wirkung auf „cyclin-dependent-kinase“(CDK)-Inhibitoren, wie p21 und indirekt durch Beeinflußung der Expressions-„Level“ von Cyclin D1 und dem Tumorsuppressorprotein p53. Cycline, die eine regulatorische Untereinheit darstellen, und CDKs, die Proteinkinaseaktivität tragen, sind verantwortlich für die Regulation des Zellzyklus. So wird die frühe G1-Phase des Zellzyklus durch eine gesteigerte Expression von Cyclin D1 und Aktivierung von CDK4 reguliert (Bornfeldt, 1996). Die folgende Abb. 4 zeigt eine vereinfachte Darstellung der PDGF-induzierten mitogenen Signaltransduktion (ERK-Weg und PI3-Kinase-Weg).

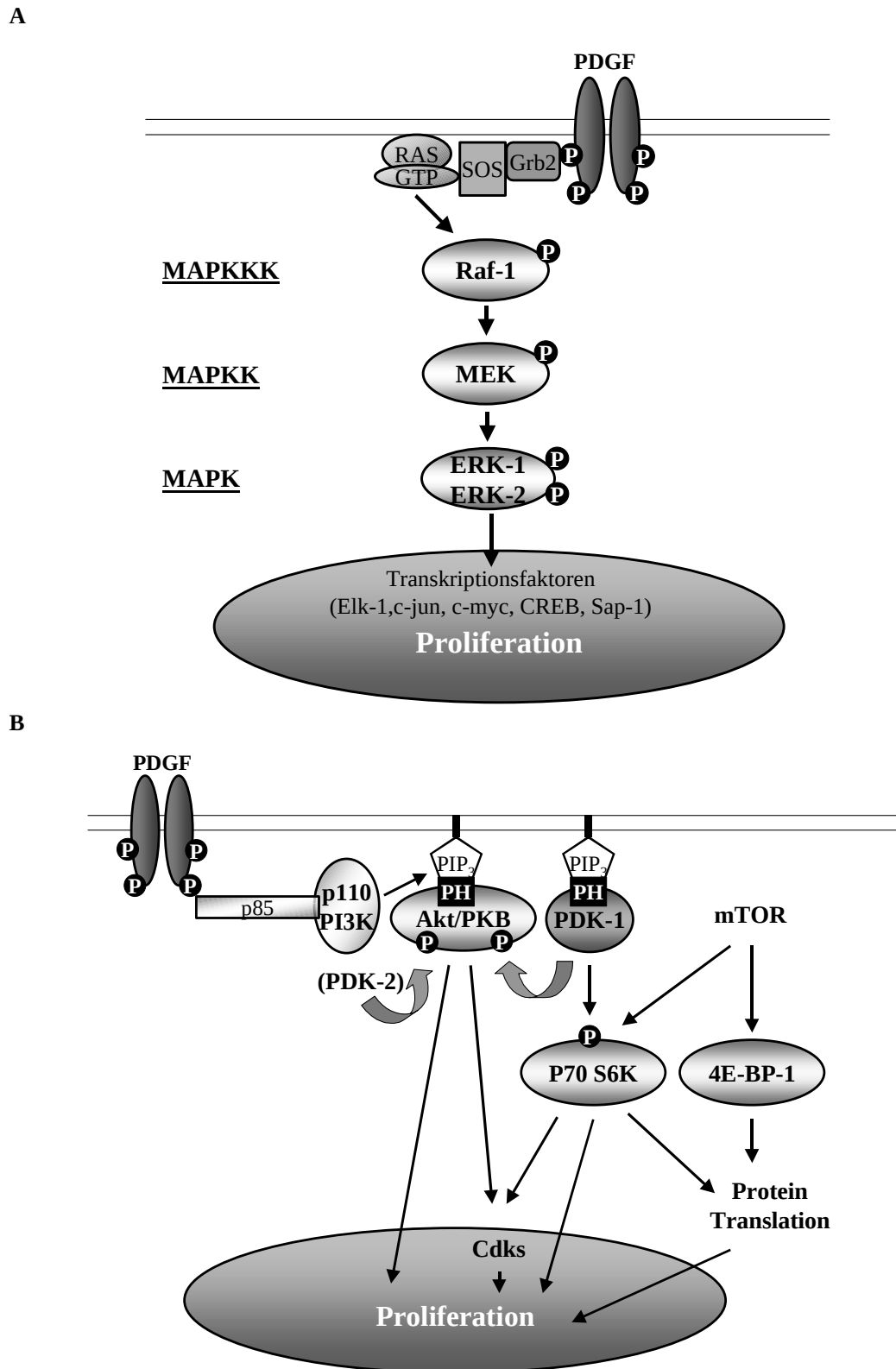


Abbildung 4

Schematische Darstellung der PDGF-induzierten mitogenen Signaltransduktion in hSMC (modifiziert nach Bornfeldt und Krebs, 1999); PIP₃ = PtdIns(3,4,5)P₃

A ERK-Weg

B PI3-Kinase-Weg

1.4 Fragestellung

1. Hat Fibrinogen einen Effekt auf die DNA-Synthese in humanen glatten Gefäßmuskelzellen (hSMC)?

Fibrinogen wurde durch mehrere prospektive Studien als Risikofaktor für atherosklerotische Manifestationen identifiziert. Fibrinogen und Fibrin-Degradationsprodukte scheinen einen mitogenen Stimulus darzustellen, wobei die Effekte von intaktem Fibrinogen auf hSMC bisher nicht näher charakterisiert wurden. Da die SMC-Proliferation wesentlich zur Entstehung der Atherosklerose und Restenose nach Angioplastie beiträgt, beschäftigte sich diese Arbeit mit der Wirkung von Fibrinogen auf die Mitogenese von hSMC.

2. Welche mitogenen Signalwege in hSMC werden durch Fibrinogen aktiviert?

Die mitogene Signaltransduktion in hSMC ist anhand ihrer Induktion durch PDGF ausgiebig untersucht worden. Über die Fibrinogen-induzierten mitogenen Signalwege in hSMC ist bisher wenig bekannt. Gegenstand der Untersuchungen waren daher die mitogenen Signaltransduktionwege in hSMC unter Induktion durch Fibrinogen.

3. Welche Rezeptoren sind an einer mitogenen Antwort auf Fibrinogen in hSMC beteiligt?

ICAM-1 aus der Immunglobulin-Superfamilie und das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin stellen Rezeptoren für Fibrinogen auf hSMC dar, die mit proliferativen Prozessen in Verbindung gebracht werden. Aus diesem Grund konzentrierte sich die vorliegende Arbeit auf diese beiden Adhäsionsmoleküle, indem geprüft wurde, ob sie Mediatoren einer Fibrinogen-induzierten mitogenen Wirkung in hSMC darstellen.

4. Beeinflusst Fibrinogen die Expression von ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$ in hSMC?

Adhäsionsmoleküle sind wesentlich beteiligt an den inflammatorischen Prozessen im Rahmen der Atherosklerose. Ihre Expression kann im Zuge einer inflammatorischen Antwort unter Zytokineinfluß gesteigert werden. Zytokingesteuert wird ebenfalls die Biosynthese von Fibrinogen als Akute-Phase-Protein erhöht. Die Experimente konzentrierten sich ferner auf die Fragestellung, ob Fibrinogen selber im Sinne eines synergistischen Effektes eine Hochregulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$ in hSMC bewirkt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Puffer, Lösungen und Substanzen

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

Verwendete Puffer und Lösungen:

PBS („Phosphate-Buffered Saline“):

2,7 mM KCl
137 mM NaCl
1,5 mM KH_2PO_4
8,3 mM Na_2HPO_4
pH 7,4

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris-HCl
pH 8,8
0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)

2 x Probenpuffer (modifiziert nach Laemmli):

125 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,0
20 % Glycerol
4 % SDS
0,02 % Bromphenolblau
100 mM Dithiothreitol (DTT) (kurz vor Gebrauch)

Sammelgelpuffer:

1 M Tris-HCl
pH 6,8
0,1 % SDS

TBS („Tris-Buffered Saline“):

10 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
pH 8,0

Laufpuffer (Elektrophorese):

25 mM Tris-HCl
250 mM Glycin
0,1 % SDS

TBST:

TBS mit 0,1 % Tween

Transferpuffer:

25 mM Tris-HCl
200 mM Glycin
20 % Methanol

TBSTM:

TBST mit 5 % Magermilchpulver

Tabelle 1: Verwendete Substanzen im Zellversuch

Substanz	Wirkung bzw. Funktion	Hersteller
Humanes Fibrinogen Typ I	Blutgerinnungsfaktor I	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PDGF-BB („platelet derived growth factor“, Isoform BB)	Wachstumsfaktor	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TNF α („tumor necrosis factor α “)	Cytokin	Biomol, Hamburg
Abciximab (Reopro®)	GPIIb/IIIa-Antagonist	Lilly, Bad Homburg
ICAM-1-Antikörper (Klon 84H10, Produkt-Nr. IM0753)	Monoklonaler Antikörper gegen ICAM-1 (CD54)	Immunotech, Marseille, Frankreich
PD 98059	MEK-1-Inhibitor	Cell Signaling, Frankfurt
LY 294002	PI3-Kinase-Inhibitor	Calbiochem, Bad Soden
Rapamycin	P 70 S6-Kinase-Inhibitor	Calbiochem, Bad Soden

Die Substanzlösungen wurden entsprechend den Herstellerangaben angefertigt. Zur Herstellung einer Fibrinogen-Stammlösung wurde humanes Fibrinogen in sterilem Aqua dest. unter leichten Schwenkbewegungen bei ca. 38° C gelöst.

2.2 Zellkultur

Alle Substanzen für die Zellkulturmedien wurden von Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein), Biochrom (Hamburg), PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich) und die Kulturgefäße von den Firmen Becton & Dickinson (Heidelberg) und Greiner (Solingen) bezogen.

2.2.1 Präparation humaner glatter Gefäßmuskelzellen (hSMC)

Die verwendeten hSMC entstammen der Vena saphena, die im Rahmen aorto-koronarer Bypass-Operationen als Reststücke anfielen und freundlicherweise von Prof. Dr. E. Gams (Herzchirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf) überlassen wurden. Die Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen (Sicherheits-Werkbank „Hera-Safe“, Heraeus, Hanau) durch die Explantat-Methode nach Fallier-Becker et al. (1990).

Dabei wurde die Vene longitudinal eröffnet und auf einer silikonisierten Präparationsplatte befestigt. Um eine Austrocknung zu vermeiden wurde das Gefäß mit FCS (Foetales Kälberserum)-freiem Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1 mM Na-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin und nichtessentiellen Aminosäuren bedeckt. Die Intima wurde mechanisch entfernt und die Media von der Adventitia abgetrennt. Die ca. 0,5 cm² großen Media-Explantate wurden in eine Kulturschale (Becton & Dickinson, Heidelberg) mit Standard-Medium (DMEM, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1 mM Na-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin, 15 % FCS und nichtessentielle Aminosäuren) überführt und bei 37° C und 5 % CO₂ im Inkubator (CO₂-Auto-Zero, Heraeus, Hanau) über Nacht inkubiert. Nach der Migration der hSMC aus den Explantaten wurden diese entfernt.

2.2.2 Herstellung der Subkulturen

Zur Passagierung der konfluenten, primären hSMC wurde das Kulturmedium entfernt und die anhaftenden Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von Trypsin/EDTA (0,05 %/0,5 mM) wurden die Zellen abgelöst. Nach Kontrolle der Ablösung unter dem Mikroskop (CK2, Olympus, Hamburg) wurde das Trypsin durch Zusatz von Kulturmedium mit 15 % FCS inaktiviert. Die Zellen wurden anschließend durch wiederholtes Pipettieren suspendiert und nach Auszählen der Zellen in einer Zählkammer nach Neubauer wurden diese in Kultivierungsgefäße (6-Loch-Platten, 24-Loch-Platten oder 150 cm²-Schalen, Becton & Dickinson, Heidelberg) überführt. Für die Experimente wurden die Zellen im subkonfluenten Zustand in den Passagen 4-14 eingesetzt.

2.2.3 Stimulation von hSMC für Versuche

Generell wurden alle Zellen vor den Versuchen, soweit nicht anders angegeben, 2 x mit PBS gewaschen und für 24 h in Hungermedium (DMEM, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1 mM Na-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin und nichtessentielle Aminosäuren) inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der entsprechenden Stimuli und Antagonisten in den beschriebenen Konzentrationen und Inkubationszeiten.

2.3 DNA-Synthese-Messung

Der Nachweis der DNA-Synthese erfolgte nach der radioaktiven Messung des (^3H)-Thymidin-Einbaus. hSMC wurden dazu in 24-Loch-Platten passagiert (ca. 5×10^4 Zellen in 500 μl Medium pro well) und bis zum Erreichen einer Subkonfluenz von ca. 50 % unter Standardbedingungen für 72 h kultiviert. Zur Synchronisierung des Zellzyklus wurde Serum-Freies Medium (= SFM: DMEM, 50 U/ml Penicillin, 50 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, 0,2 $\mu\text{g/ml}$ L-Glutamin, 35 $\mu\text{g/ml}$ L-Ascorbinsäure, 5 $\mu\text{g/ml}$ Transferrin, 6,25 ng/ml Selenium und ca. 3 $\mu\text{g/ml}$ Insulin) für weitere 72 h verwendet. Mindestens 2 h vor der Stimulation wurde das Medium nochmals erneuert. Die Zellen wurden mit Fibrinogen (1, 3, 10, 30 und 100 μM) stimuliert. Als Positivkontrolle wurde PDGF-BB (20 ng/ml) verwendet. Bei der Verwendung von Antagonisten erfolgte die Zugabe 15 min vor Gabe der Stimulantien. Nach einer 20-stündigen Inkubation im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO_2 wurde Tritium-Methylthymidin (Du Pont de Nemours-NEN, Dreieich) in einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{Ci/ml}$ hinzugefügt. 4 h danach erfolgte zweimal Waschen mit eiskaltem PBS und anschließend die Zugabe von kalter Perchlorsäure (0,3 M) für 2 min. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen zur Lyse mit Natronlauge (0,1 M) in einem Wasserbad bei 37° C für 30 min inkubiert. Das Lysat wurde in Szintillationsröhrchen überführt und jeweils 5 ml Szintillationscocktail (Lumasafe Plus, Lumac. LSC B.V., Groningen, NL) zugegeben. Die Aktivitätsbestimmung fand als Dreifachbestimmung mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationszählers (LS 6000 IC, Beckmann, München) statt. Die Gesamtinkubationszeit von 24 h wurde als Optimum in Vorversuchen ermittelt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Isolierung von Proteinen

Für die Untersuchung mittels Western-Blot wurden subkonfluente Zellen aus 24-Loch-Platten zur Stimulationsbeendigung 1 x mit kaltem PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von modifiziertem 1 x Laemmli-Puffer (ca. 100 µl/well) lysiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturplatte gelöst, 2 sec im Eppendorfgefäß sonifiziert (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA) und 10 min bei 95° C denaturiert.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die jeweiligen Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) mit Hilfe eines Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (BioRad, München) ermittelt. Eine Eichkurve wurde mit bovinem Serumalbumin (BSA) in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Nach 20 min Inkubation mit dem BioRad-Reagenz erfolgte die photometrische Messung der Farbreaktion in einem ELISA-Reader (Modell 550, BioRad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.4.3 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen aus den Zelllysaten erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Hierzu wurde ein Sammelgel (5 % Acrylamid) auf ein Trenngel (8 %, 10 % oder 12 % Acrylamid) gegossen, wobei 0,1 % Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) zum Schluß hinzugefügt wurde. Die eingesetzte Proteinmenge variierte zwischen 30-50 µg. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V in einer Elektrophoresekammer (BioRad, München bzw. Hoefer SE 600, Hoefer Pharmacia Biotech, Freiburg) mit Laufpuffer. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein biotinylierter hochmolekularer Proteinstandard (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) eingesetzt.

2.4.4 Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Die Proteine wurden mittels einer „Blotting“-Apparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell bzw. Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BioRad, München) auf eine methanolbenetzte Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Millipore, ImmobilonP, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) übertragen. Der Transfer erfolgte mit Blotpuffer bei 12 V für 30 min.

2.4.5 Entwicklung von Western-Blots mittels Chemilumineszenz

Zur Sättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran 1 ½ h bei Raumtemperatur in TBSTM inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit spezifischen Primärantikörpern (siehe Tabelle 2), 1:1000 in TBSTM bzw. TBST mit 5 % BSA verdünnt, bei 4° C über Nacht auf einer Laborwippe. Die Primärantikörper stammen, wenn nicht anders angegeben, aus IgG-Fractionen von Kaninchen. Nach 3 x 15 min Waschen in TBST erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in einer Verdünnung 1:2000-1:4000 (Anti-Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg) in TBSTM für 1 h bei Raumtemperatur.

Nach weiteren 3 x 15-minütigen Wäschen in TBST wurden die Proteine durch Zugabe von Lumi-Light Western Blotting Substrat (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Angaben des Herstellers detektiert. Bei dieser Methode werden durch die Oxidation von Luminol und der daraus resultierenden Lichtemission die Areale mit Peroxidaseaktivität auf der Membran nachgewiesen. Die Chemilumineszenz wird durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm^{TN} ECLTM, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) sichtbar gemacht.

Tabelle 2: Im Western-Blot verwendete primäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Produkt-Nr.
Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling (Frankfurt)	#9101
Phospho-Akt (Thr308)	Cell Signaling (Frankfurt)	#9275
Phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling (Frankfurt)	#9271
Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling (Frankfurt)	#9211S
c-Jun (H-79)	Santa Cruz (Heidelberg)	sc-1694
I κ B- α (C-21)	Santa Cruz (Heidelberg)	sc-371

2.4.6 Kontrolle der Proteinbeladung

Nach der Detektion der spezifischen Proteine wurde die PVDF-Membran mit TBST gewaschen und anschließend mit einer Amidoschwarz-Lösung (0,1 % in 25 % Isopropanol/ 10 % Essigsäure; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) für 10 min eingefärbt. Durch 10-minütiges Abwaschen des überschüssigen Farbstoffes mit 25 % Isopropanol/10 % Essigsäure konnten die Proteinbanden sichtbar gemacht werden und somit auf Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung kontrolliert werden.

2.5 Durchflusszytometrie von glatten Gefäßmuskelzellen (hSMC)

Zur Analyse der Expression von ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$ an der Oberfläche von hSMC wurde die Durchflusszytometrie (FACS = „Fluorescence activated cell sorter“) angewendet. Dafür wurden Subkulturen von hSMC auf 6-Loch-Platten hergestellt und 24 h vor Stimulationsbeginn mit Hungermedium (DMEM, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1 mM Na-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin und nichtessentielle Aminosäuren) bedeckt. Die Stimulation erfolgte mit Fibrinogen 10 µM bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (15 min bis 24 h). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein einmaliger Waschvorgang mit 37° C warmem PBS durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen 15 bis 30 min bei 37° C mit warmem Dissoziationsmedium (Cell dissociation solution, Sigma Aldrich, Deisenhofen) inkubiert. Nach einer lichtmikroskopischen Kontrolle des Zellablösungsprozesses wurden die am Boden der Kulturplatte noch anheftenden Zellen mittels spülendenden Pipettierens abgelöst. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in kleine Eppendorfgläser überführt und bei 6000 rpm für ca. 30 sec in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und die Pellets in jeweils 50 µl PBS durch wiederholtes Pipettieren resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden dann mit je 20 µl der jeweiligen FITC(= Fluoresceinisothiocyanat)-gekoppelten Antikörper (siehe Tabelle 3) versetzt und 15 bis 30 min bei Raumtemperatur und unter Lichtabschirmung inkubiert. Zur Ermittlung von unspezifischen Bindungen diente die Isotyp-Kontrolle. Dabei wurden unstimulierte Zellen mit FITC-gekoppeltem Maus-IgG-1-Antikörper (Klon 679.1Mc7, Produkt-Nr. IM0639, Immunotech, Marseille, Frankreich) versetzt.

Tabelle 3: In FACS-Versuchen verwendete Antikörper

Bezeichnung (Klon/Produkt-Nr.)	Funktion	Hersteller
CD54-FITC (B-H17/852.691.010)	FITC-gekoppelter Antikörper (Maus-IgG-1) gegen ICAM-1	Diaclone Research, Besancon, Frankreich
CD51-FITC (AMF7/IM1855)	FITC-gekoppelter Antikörper (Maus-IgG-1) gegen α_v -Untereinheit	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD61-FITC (SZ21/IM1758)	FITC-gekoppelter Antikörper (Maus-IgG-1) gegen β_3 -Untereinheit	Immunotech, Marseille, Frankreich

Nach Verdünnung mit 500 μ l Isoton® (Azide-free balanced electrolyte solution, Beckman Coulter, Krefeld) und einer Funktionskontrolle mit Fluoreszenz-Lösung (Flow-Check fluorophores, Beckman Coulter, Krefeld) wurden die Proben in einem EPICS-XL Zytometer (Beckmann Coulter, Krefeld) untersucht, wobei 5000 hSMC vermessen wurden.

2.6 Auswertung und Statistik

Die Messdaten wurden als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus der jeweiligen Anzahl (n) von unabhängigen 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 festgesetzt. Die statistische Berechnung erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Instat, Version 3.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Bei Original-Abbildungen von Western-Blots wurde jeweils ein repräsentatives Experiment von n unabhängigen Versuchen mit ähnlichem Ergebnis dargestellt. Für die densitometrische Messung der einzelnen Western-Blots wurde das Programm Quantity One, Version 4.1.1 (BioRad, München) bzw. Scanpack, Version 14.1A27 (Biometra, Göttingen) angewendet.

3. ERGEBNISSE

Fibrinogen gilt als ein bedeutender Risikofaktor für die Atherosklerose. Zudem wurde bereits vor vielen Jahren beobachtet, daß Fibrinogen die Mitogenese in hämatopoetischen Zellen induzieren kann (Lévesque et al., 1986). Die Proliferation von hSMC ist wesentlich an der Genese der Atherosklerose und der Restenose nach Angioplastie beteiligt. Ziel der folgenden Untersuchungen war daher, die Bedeutung von Fibrinogen für die Mitogenese und Aktivierung mitogener Signalwege in hSMC zu ergründen.

3.1 Wirkung von Fibrinogen auf die DNA-Synthese von hSMC

3.1.1 Stimulation der DNA-Synthese in hSMC durch Fibrinogen

Zuerst wurde eine mögliche Induktion der DNA-Synthese durch lösliches Fibrinogen in hSMC untersucht. Dazu wurden hSMC für 24 h mit Fibrinogen in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert und die Zunahme der DNA-Synthese mittels (³H)-Thymidin-Inkorporation bestimmt. Abb. 5 zeigt, daß Fibrinogen konzentrationsabhängig zu einer schwachen, aber signifikanten Zunahme der DNA-Synthese führte, wobei ein maximaler Effekt bei einer Konzentration von 10 µM Fibrinogen auftrat (etwa 1,8-fach). Dieser Effekt war unter Stimulation mit Fibrinogen in höheren Konzentrationen (30 µM) rückläufig und bei einer maximalen Konzentration von 100 µM konnte sogar eine signifikante Reduktion der DNA-Synthese (etwa 0,4-fach) beobachtet werden. Zusätzlich fiel in den mikroskopischen Kontrollen der Zellkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit 30 und 100 µM Fibrinogen eine partielle Ablösung der hSMC vom Boden des Kultivierungsgefäßes auf. Vergleichsweise induzierte PDGF als Positivkontrolle der Stimulation der DNA-Synthese einen 7-fachen Anstieg (n=9, SEM ± 0,77, wird nicht gezeigt).

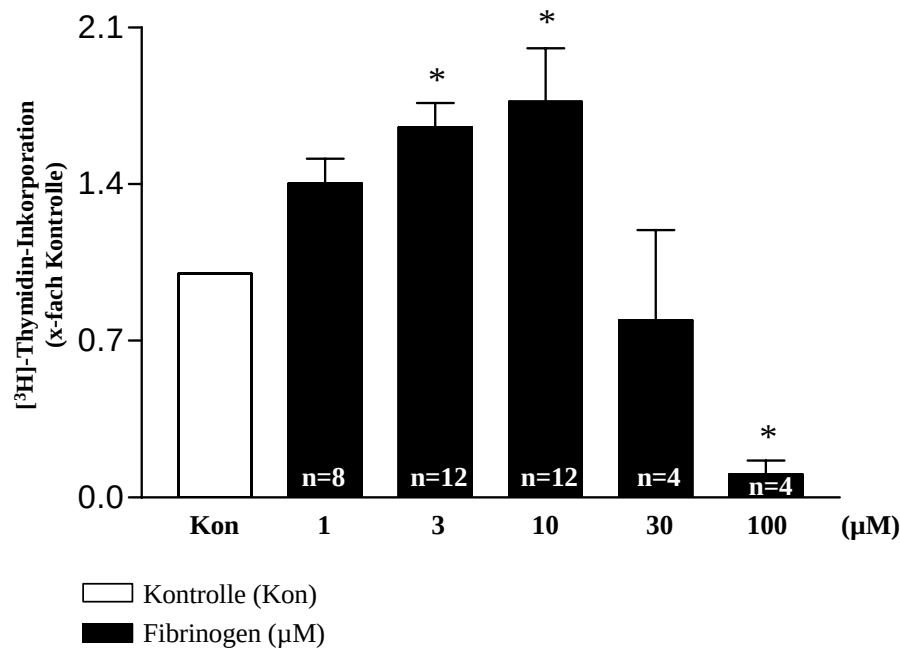


Abbildung 5

Effekt von Fibrinogen auf die DNA-Synthese in hSMC (Mittelwerte $\pm$ SEM; * = Signifikanz vs. Kontrolle)

3.1.2 Effekte auf die Fibrinogen-induzierte DNA-Synthese durch Proteinkinase-Inhibitoren

Nachdem ein mitogener Effekt durch Fibrinogen auf hSMC nachgewiesen werden konnte, wurde die Involvierung von Proteinkinasen untersucht, die an mitogenen Signalwegen beteiligt sind. Unter Vorinkubation mit den entsprechenden Proteinkinase-Inhibitoren des ERK-Weges bzw. des PI3-Kinase-Weges erfolgte erneut die Messung der Fibrinogen-induzierten DNA-Synthese. Die Ergebnisse dieser Messungen werden zusammenfassend in Abb. 6 dargestellt.

3.1.2.1 Hemmung des ERK-1/2 Signalweges

Die MAPK-Kinase MEK-1 ist beteiligt an der Signalübertragung des ERK-Weges, der von Mitogenen ausgeht. Sie phosphoryliert die MAP-Kinasen ERK-1/2. Unter Vorbehandlung mit PD 98059, einem selektiven Inhibitor von MEK-1, der konsekutiv zu einer Hemmung der MAP-Kinasen ERK-1/2 führt, ergab sich eine signifikante Hemmung der Fibrinogen-stimulierten DNA-Synthese (Abb. 6).

3.1.2.2 Hemmung des PI3-Kinase Signalweges

Ein weiterer wichtiger mitogener Signalweg für die Proliferation von hSMC ist der PI3-Kinase-Weg. Unter Blockade der PI3-Kinase mit dem spezifischen Inhibitor LY 294002, der an der ATP-Bindungsstelle des Enzyms agiert, wurde die Fibrinogen-induzierte DNA-Synthese ebenfalls reduziert. Hier kam es zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Mitogenese der hSMC.

Die p70 S6-Kinase wird im Rahmen des PI3-Kinase-Weges durch PDK-1 phosphoryliert und somit aktiviert (Toker, 2000). Diese Proteinkinase gehört der AGC-Superfamilie an und ist erforderlich für das Zellwachstum und die Progression des Zellzyklus. Sie ist direkt verantwortlich für die Phosphorylierung des 40 S ribosomalen Proteins S6. Darüber hinaus kontrolliert sie die Translation von einigen hundert mRNAs, die für Proteine kodieren, die notwendig sind für die Versammlung der Translations-Maschinerie, einschl. Ribosomen und Elongationsfaktoren. Zur selektiven Inhibition der p70 S6-Kinase wurde Rapamycin eingesetzt. Darunter ließ sich ebenfalls ein vollständig hemmender Effekt auf die Fibrinogen-stimulierte DNA-Synthese beobachten.

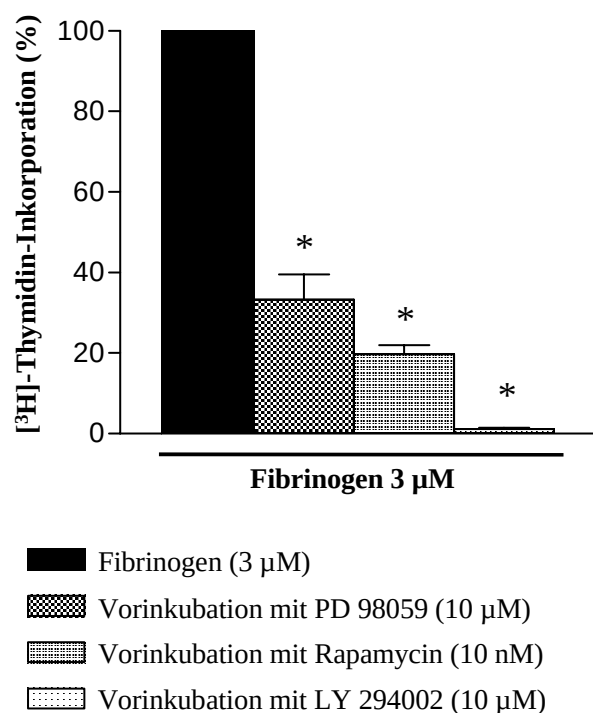


Abbildung 6

Hemmung der Fibrinogen-induzierten DNA-Synthese durch Proteinkinase-Inhibitoren (PD 98059, LY 294002 und Rapamycin) in hSMC (Mittelwerte $\pm$ SEM von n = 5; * = Signifikanz vs. Fibrinogen).

3.1.3 Effekte auf die Fibrinogen-induzierte DNA-Synthese durch Rezeptor-Antagonisten

Als nächstes wurde geprüft, über welche Rezeptoren an der Oberfläche von hSMC die mitogene Wirkung von Fibrinogen vermittelt wird. Dabei konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$, die für intaktes Fibrinogen Rezeptoren darstellen und potentiell an proliferativen Prozessen beteiligt sein können.

3.1.3.1 Blockade von ICAM-1 durch spezifische Antikörper hat keinen Einfluß auf die Fibrinogen-induzierte DNA-Synthese

ICAM-1, welches in inflammatorischen Prozessen, wie der Leukozyten-Adhäsion eine wichtige Rolle spielt (Altieri, 1999), wird auch in Verbindung gebracht mit einer proliferativen Antwort auf Fibrinogen in lymphoblastoiden Zelllinien (Gardiner und D'Souza, 1997). Die im Zusammenhang mit einer mitogenen Antwort auf Fibrinogen in hSMC durchgeführten Experimente ergaben, wie in Abb. 7 dargestellt, keine signifikante Änderung des Fibrinogen-stimulierten mitogenen Effektes unter Hemmung von ICAM-1 durch spezifische Antikörper.

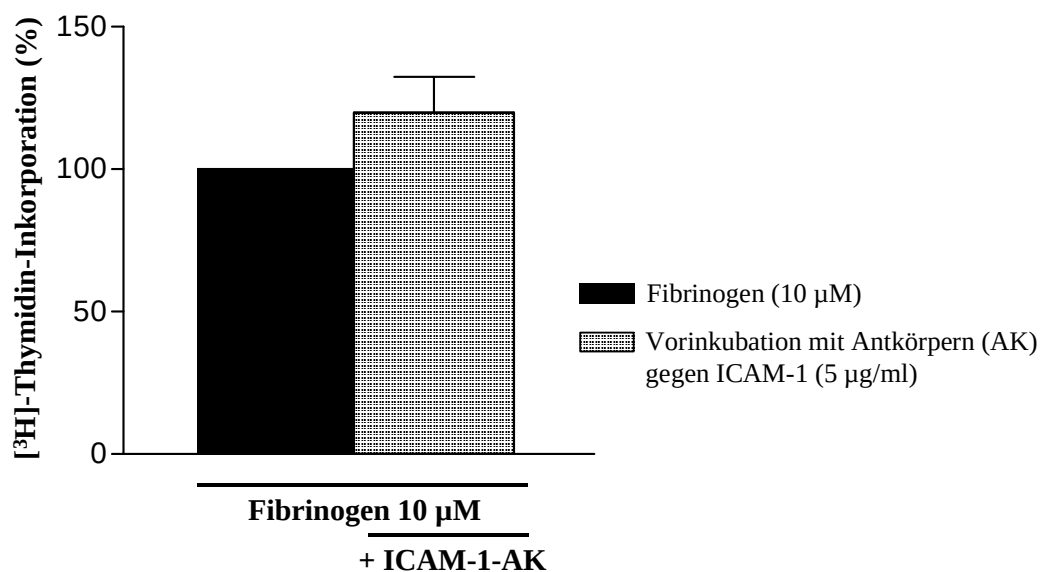


Abbildung 7

Fibrinogen-induzierte DNA-Synthese in hSMC unter Blockade von ICAM-1 durch spezifische Antikörper (Mittelwerte $\pm$ SEM von n = 3)

3.1.3.2 Blockade von $\alpha_v\beta_3$ durch Abciximab (Reopro®) hat keinen Einfluß auf die Fibrinogen-induzierte DNA-Synthese

Ein weiterer Fibrinogen-Rezeptor, der in Verbindung gebracht wird mit der Proliferation von hSMC, ist das Integrin $\alpha_v\beta_3$, welches im Organismus weitverbreitet ist und auf vaskulären Zellen in hoher Dichte exprimiert wird (Byzova, 1998). Es bindet seine Liganden über die RGD-Sequenz, die außer in Fibrinogen auch in anderen Matrixproteinen vorhanden ist. Zur Prüfung einer Beteiligung dieses Rezeptors an der Vermittlung des Fibrinogen-induzierten mitogenen Effektes erfolgte wiederholt die Messung der Fibrinogen-stimulierten DNA-Synthese unter Prä-Inkubation der hSMC mit dem Antiintegrin Abciximab (c7E3-Fab, Reopro®). Abciximab ist ein Maus/Mensch chimäres Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers, welches ungefähr in gleicher Affinität über die RGD-Sequenz an das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin und an das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bindet, und somit spezifisch und kompetitiv die Ligandenbindung am entsprechenden Rezeptor hemmt (siehe Schrör, 1999 und 2000). Der Effekt von Fibrinogen auf die DNA-Synthese von hSMC wurde durch Abciximab nicht beeinflusst (Abb. 8).

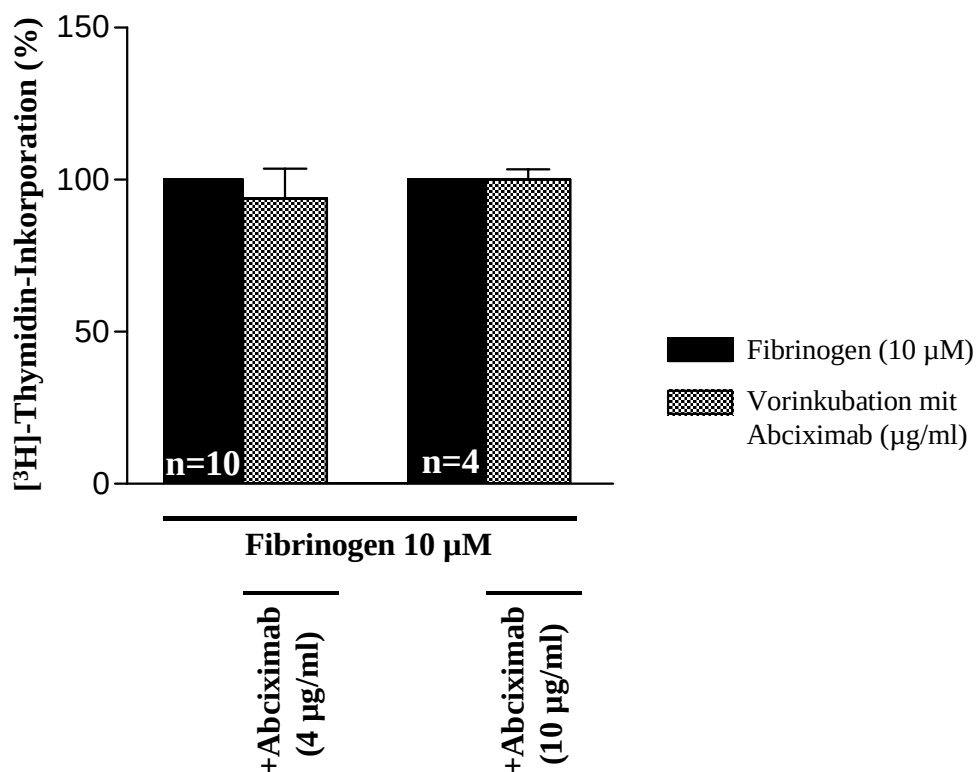


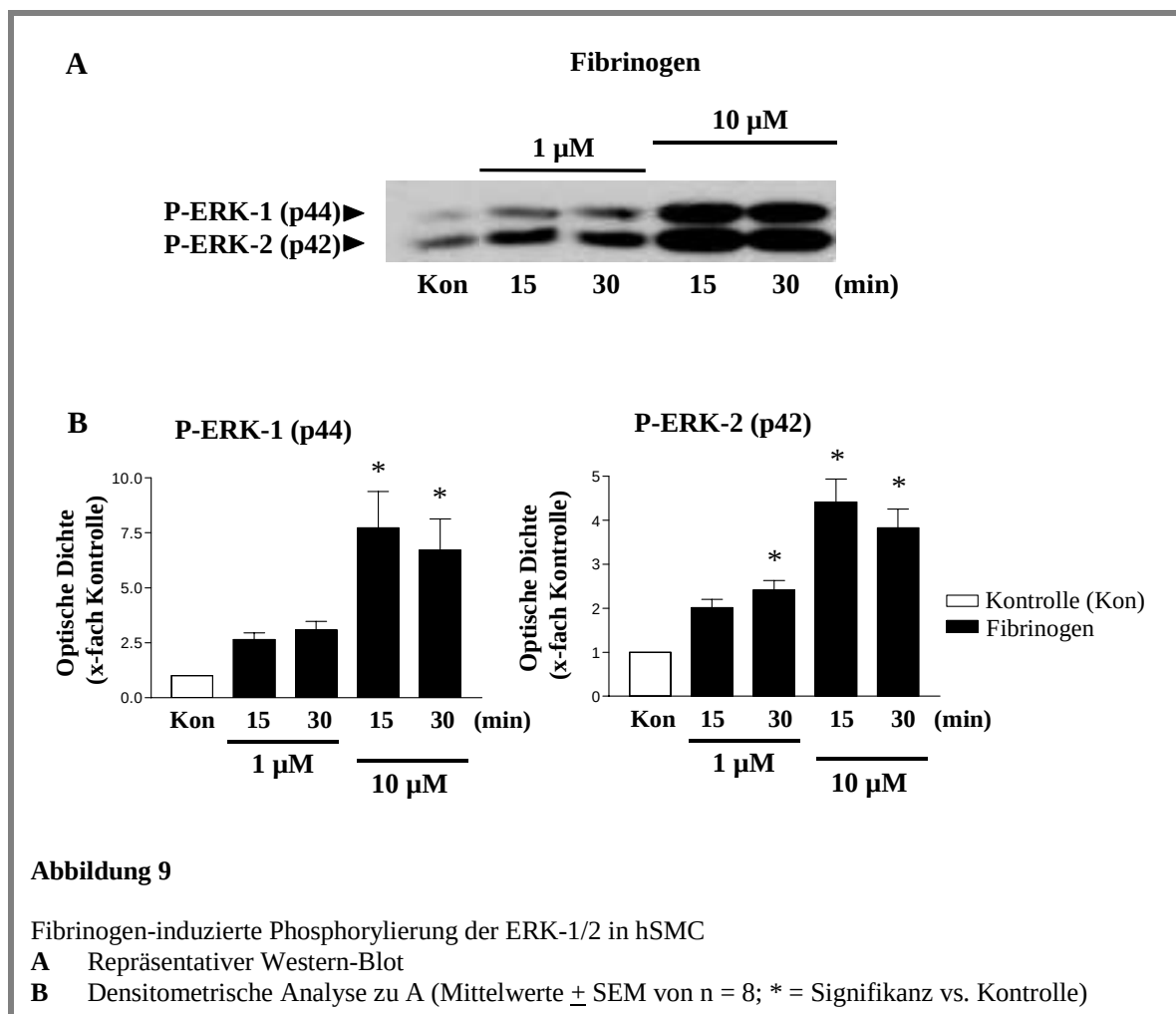
Abbildung 8

Fibrinogen-induzierte DNA-Synthese in hSMC unter Blockade von $\alpha_v\beta_3$ (Mittelwerte $\pm$ SEM)

3.2 Wirkungen von Fibrinogen auf die intrazelluläre Signaltransduktion in hSMC

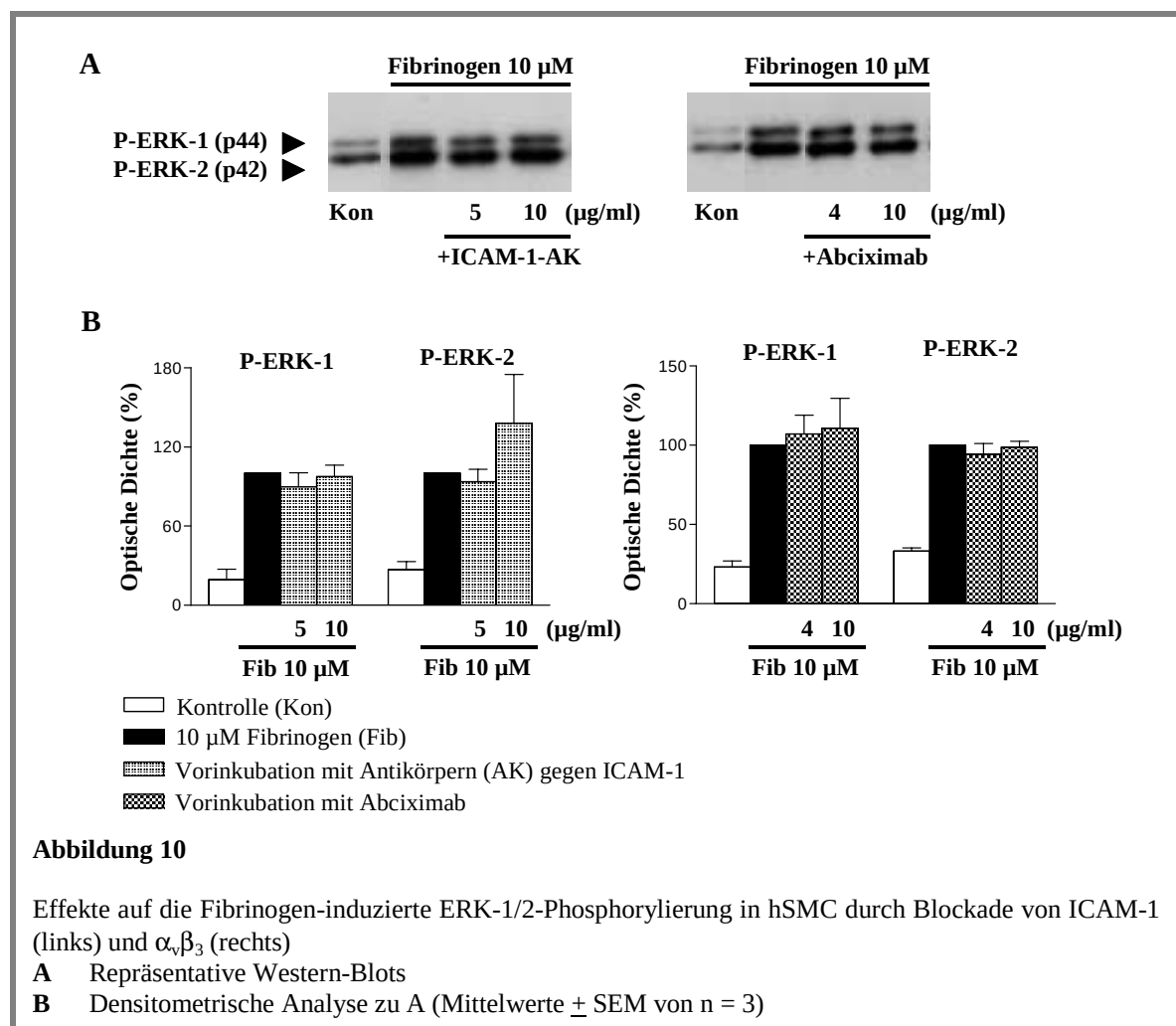
3.2.1 Fibrinogen bewirkt die Phosphorylierung von ERK-1/2

Im Rahmen des ERK-Weges, der eine Bedeutung bei proliferativen Prozessen hat, werden die MAP-Kinasen ERK-1 und ERK-2 phosphoryliert und somit auch aktiviert. Die beobachtete Reduktion der Fibrinogen-induzierten DNA-Synthese unter Inhibition der MAPK-Kinase MEK-1 wies bereits auf eine Beteiligung dieses Signalweges hin (siehe 3.1.2.1). Um den direkten Effekt auf die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2 zu untersuchen, wurden hSMC mit Fibrinogen stimuliert, und die Phosphorylierung von ERK-1/2 wurde mittels phosphospezifischer Antikörper im Western-Blot detektiert. Dabei führte die Stimulation mit Fibrinogen zu einer konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von ERK-1/2 (Abb. 9) mit einem Maximum bei 10 μ M Fibrinogen über 15 min (ERK-1: etwa 8-fach, ERK-2: etwa 4,5-fach)



3.2.1.1 Effekte auf die Fibrinogen-induzierte ERK-1/2-Phosphorylierung durch Rezeptor-Antagonisten

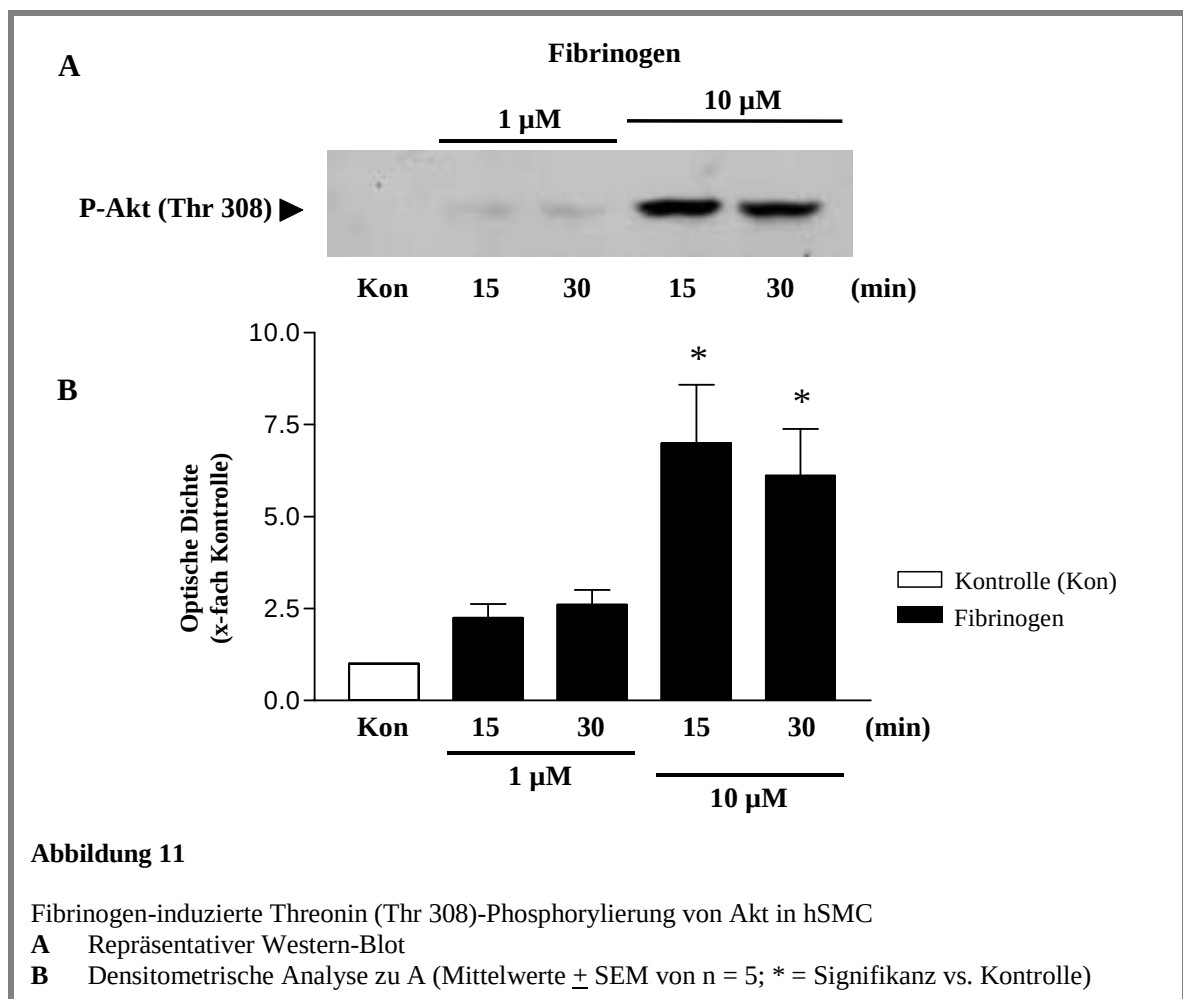
Nachfolgend wurde geprüft, ob die beobachtete Phosphorylierung über die Interaktion von Fibrinogen mit ICAM-1 oder $\alpha_v\beta_3$ vermittelt wird. Dazu wurden hSMC für 30 min mit 10 μM Fibrinogen in An- und Abwesenheit der Antagonisten Abciximab bzw. ICAM-1-Antikörper inkubiert. Abb. 10 zeigt, daß die ERK-1/2-Phosphorylierung weder durch Abciximab noch durch ICAM-1-Antikörper verändert wurde.



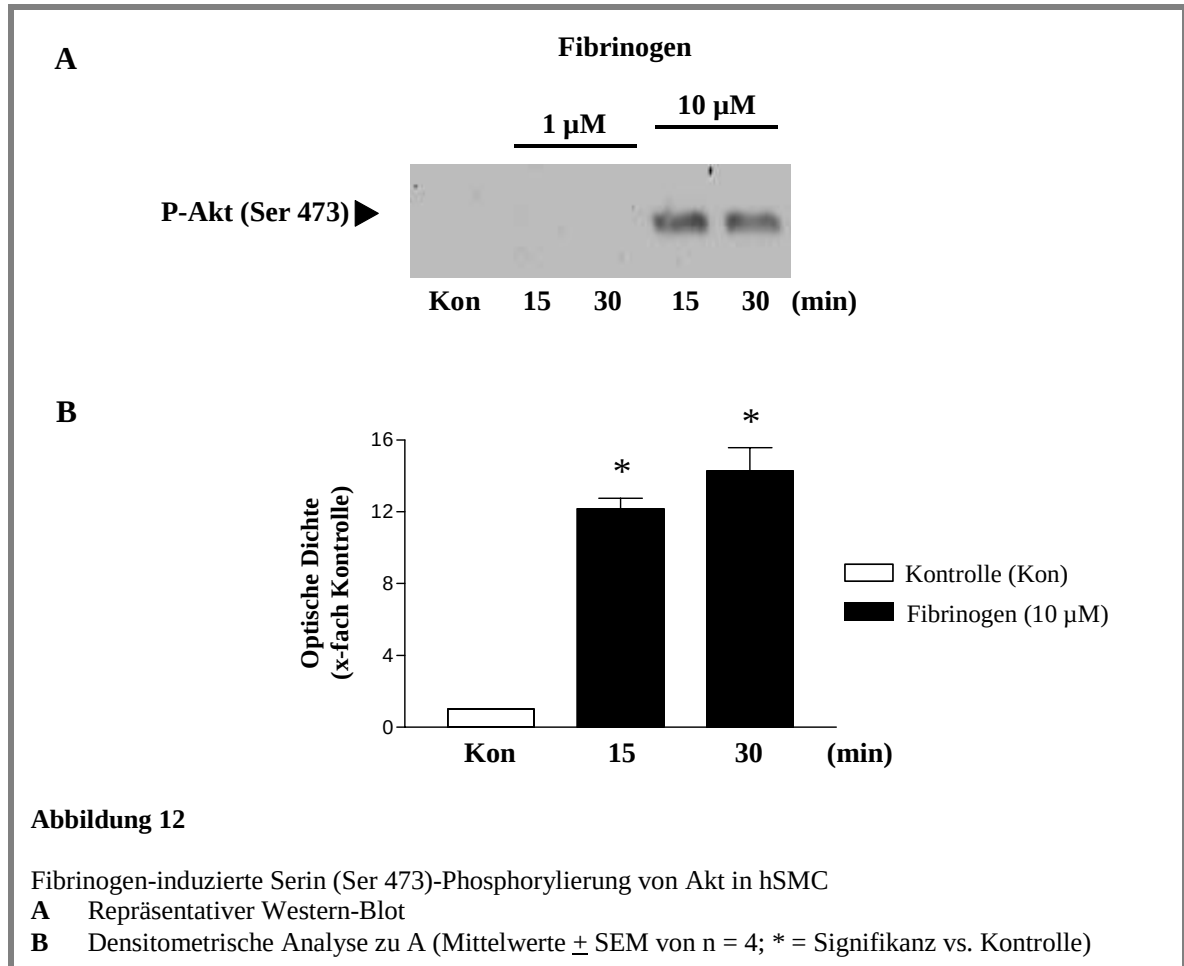
3.2.2 Fibrinogen bewirkt die Phosphorylierung von Akt

Im Rahmen des PI3-Kinase-Weges kommt es nachgeschaltet zur Phosphorylierung der Proteinkinase Akt, die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Gleichgewichts zwischen Zellwachstum und Apoptose spielt. Die Aktivierung von Akt erfolgt über die zwei Phosphorylierungsstellen Thr 308 und Ser 473. Bereits bei der Messung der Fibrinogen-stimulierten DNA-Synthese ergab sich eine Hemmung durch den PI3-Kinase-Inhibitor LY 294002 (siehe 3.1.2.2) und somit Hinweise auf eine Involvierung des PI3-Kinase-Weges. Ferner wurde der direkte Effekt von Fibrinogen auf die Phosphorylierung von Akt untersucht.

hSMC wurden für 15 bzw. 30 min mit Fibrinogen (1 und 10 μ M) stimuliert, und anschließend wurde die Phosphorylierung von Akt an den Phosphorylierungsstellen Thr 308 und Ser 473 separat detektiert. Dabei führte Fibrinogen zu einer konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von Akt (Thr 308) mit einem Maximum (etwa 7-fach) bei einer Stimulation mit 10 μ M Fibrinogen über 15 min (Abb. 11).



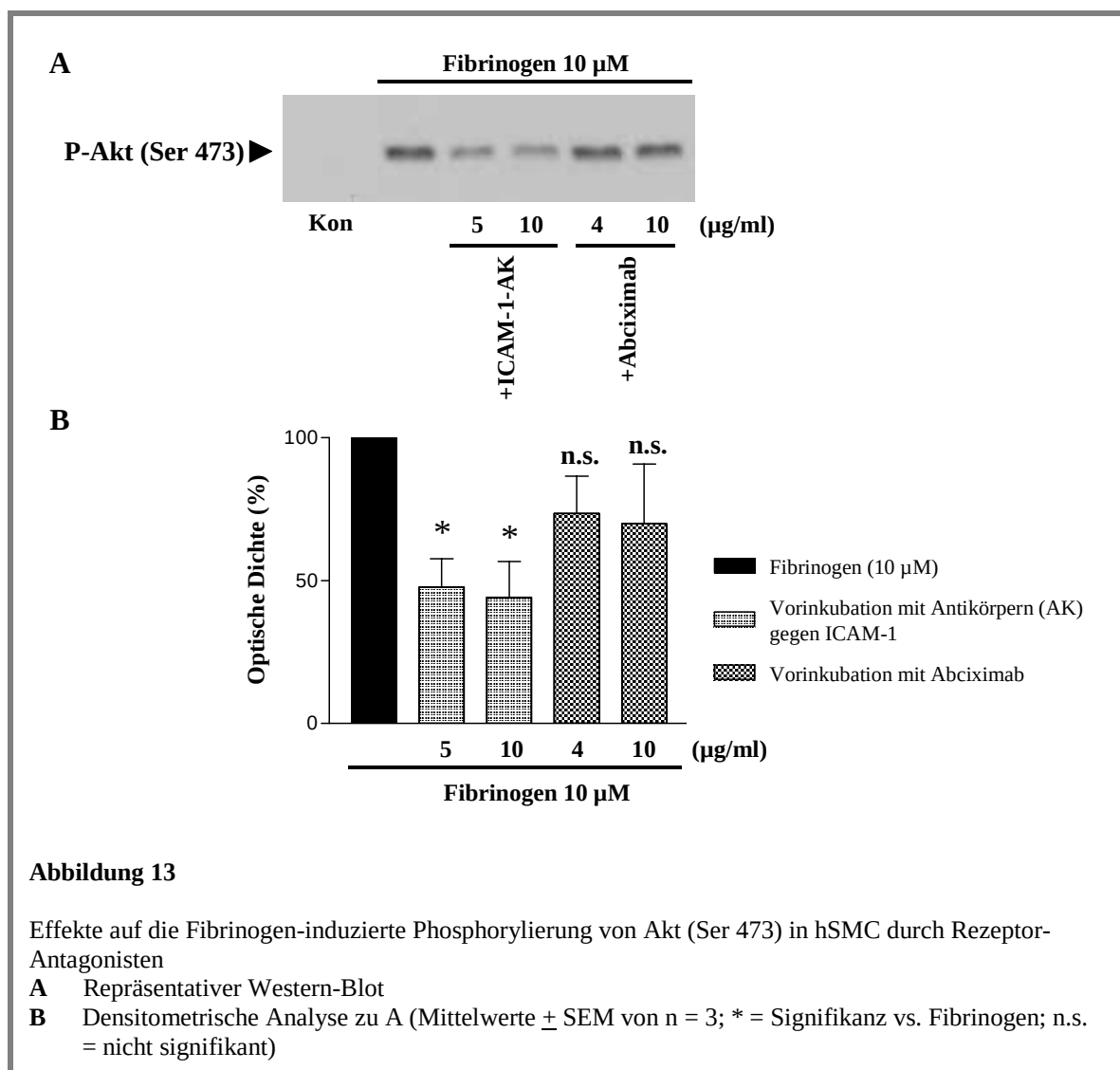
Ähnlich ergab sich bei der Detektion von Akt (Ser 473) eine konzentrationsabhängige Phosphorylierung durch 10 μM Fibrinogen (Abb. 12), die hingegen unter Stimulation mit 1 μM Fibrinogen nicht beobachtet wurde.



3.2.2.1 Effekte auf die Fibrinogen-induzierte Akt-Phosphorylierung durch Rezeptor-Antagonisten

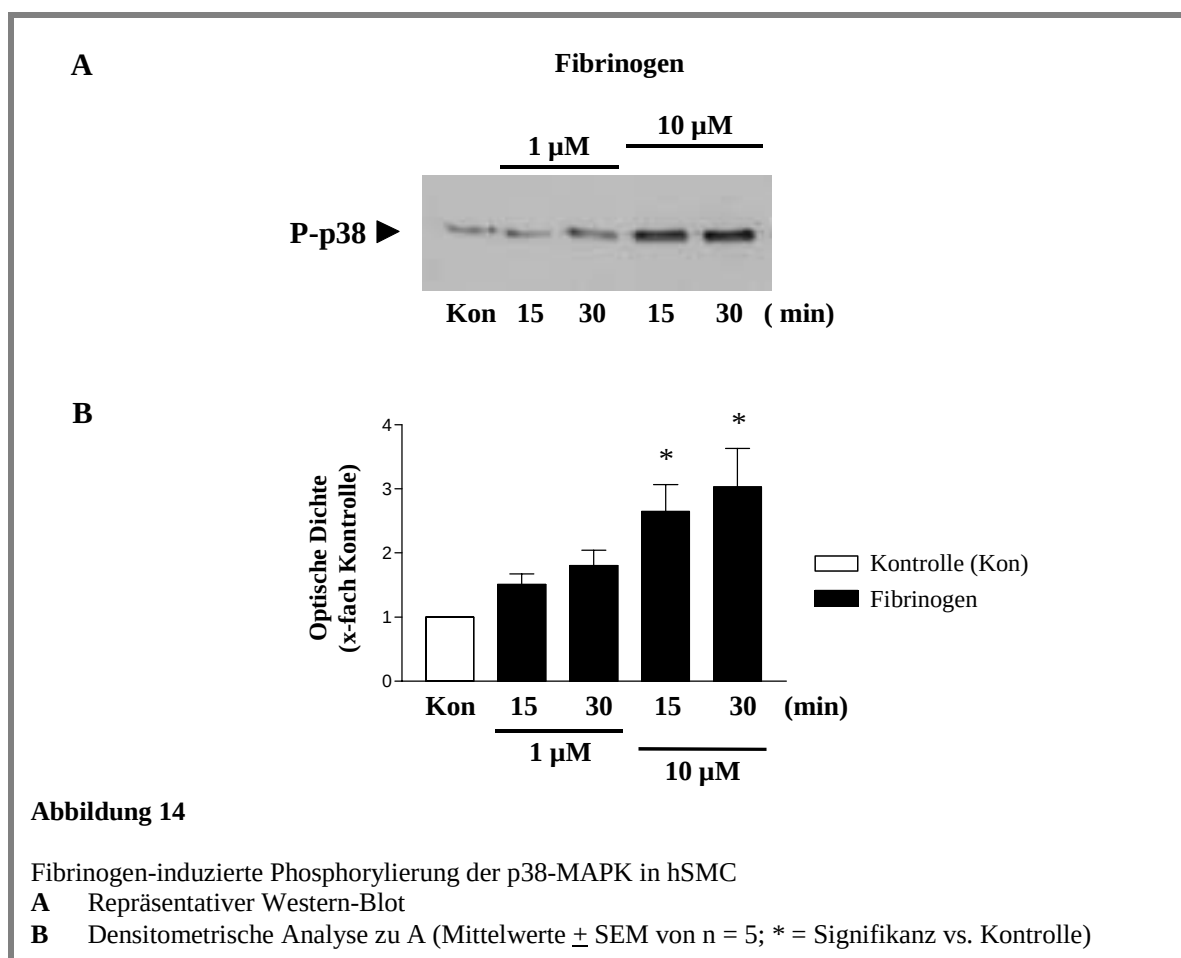
Nachdem der Nachweis einer Phosphorylierung von Akt an beiden Phosphorylierungsstellen erfolgt war, wurde ergänzend durch die Detektion der Serin-Phosphorylierung von Akt geprüft, ob ICAM-1 oder $\alpha_v\beta_3$ bei der beobachteten, Fibrinogen-induzierten Akt-Aktivierung involviert sind. Dazu wurden hSMC erneut unter An- bzw. Abwesenheit der entsprechenden Antagonisten mit 10 μM Fibrinogen für 30 min stimuliert.

Abb. 13 zeigt, daß die Serin-Phosphorylierung von Akt durch ICAM-1-Antikörper reduziert (etwa um 50 %), aber nicht aufgehoben wurde. Abciximab hingegen hatte keinen signifikanten Effekt auf die Serin-Phosphorylierung von Akt.



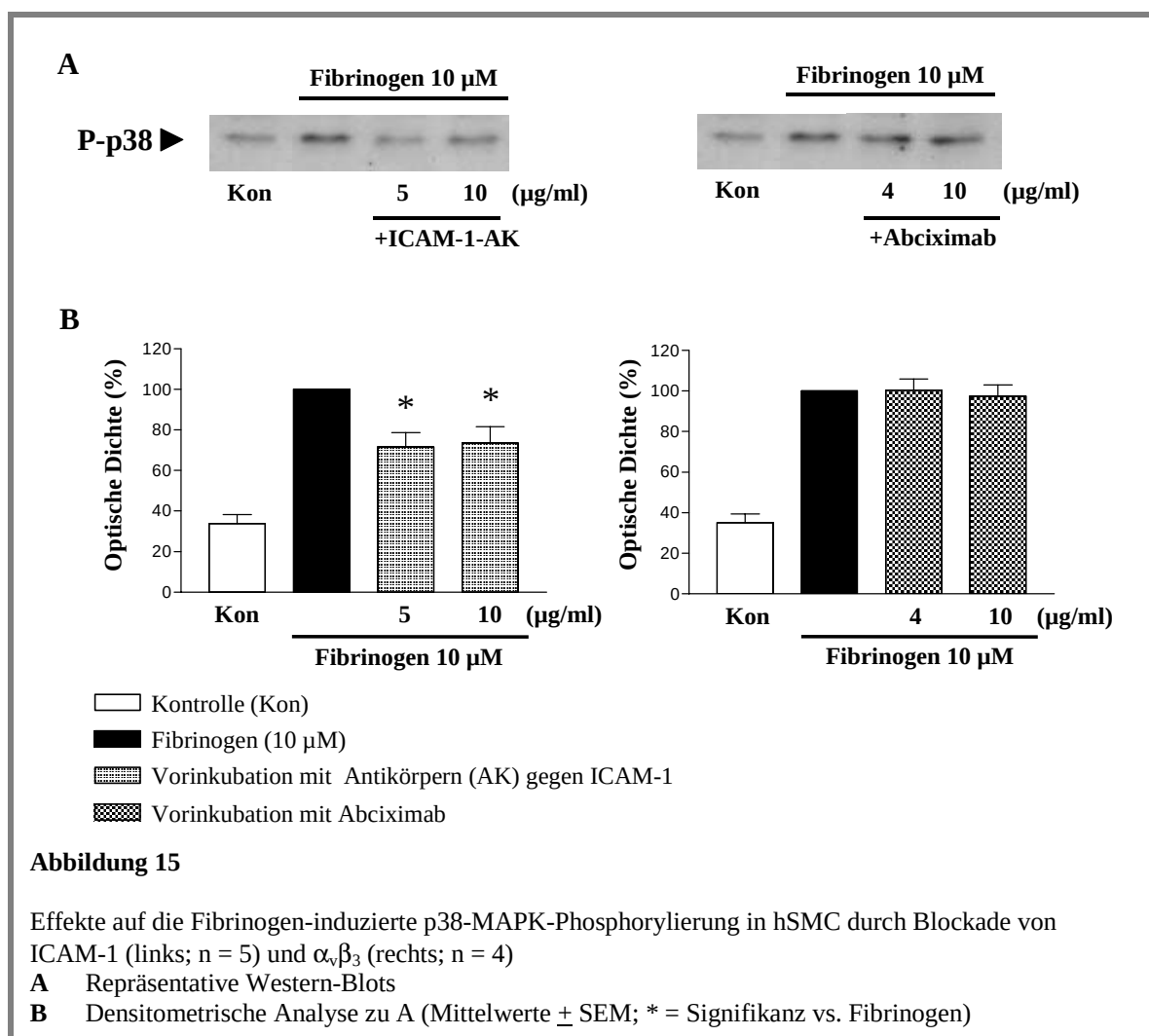
3.2.3 Fibrinogen bewirkt die Phosphorylierung der p38-MAPK

Der p38-MAPK-Weg wird in Zusammenhang gebracht mit Stress-induzierten, inflammatorischen, antiproliferativen, aber auch proliferativen Prozessen. In der MAPK-Signalkaskade phosphorylieren und aktivieren MAPKKK u.a. die MAPK-Kinasen MKK3/6, die wiederum die p38-MAPK aktiviert (Tibbles und Woodgett, 1999). Diese ist involviert in die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie z.B. ATF-2, Elk-1 und CREB. Die Involvierung des p38-MAPK-Weges an der Fibrinogen-induzierten Signaltransduktion in hSMC wurde mittels Detektion durch phosphospezifische Antikörper im Western-Blot untersucht. Dabei ließ sich eine konzentrationsabhängige Phosphorylierung durch die Stimulation der hSMC mit Fibrinogen beobachten (Abb. 14). Diese entsprach bei 15- bzw. 30-minütiger Stimulation mit 10 μ M Fibrinogen ca. dem 3-fachen Wert der Kontrolle.



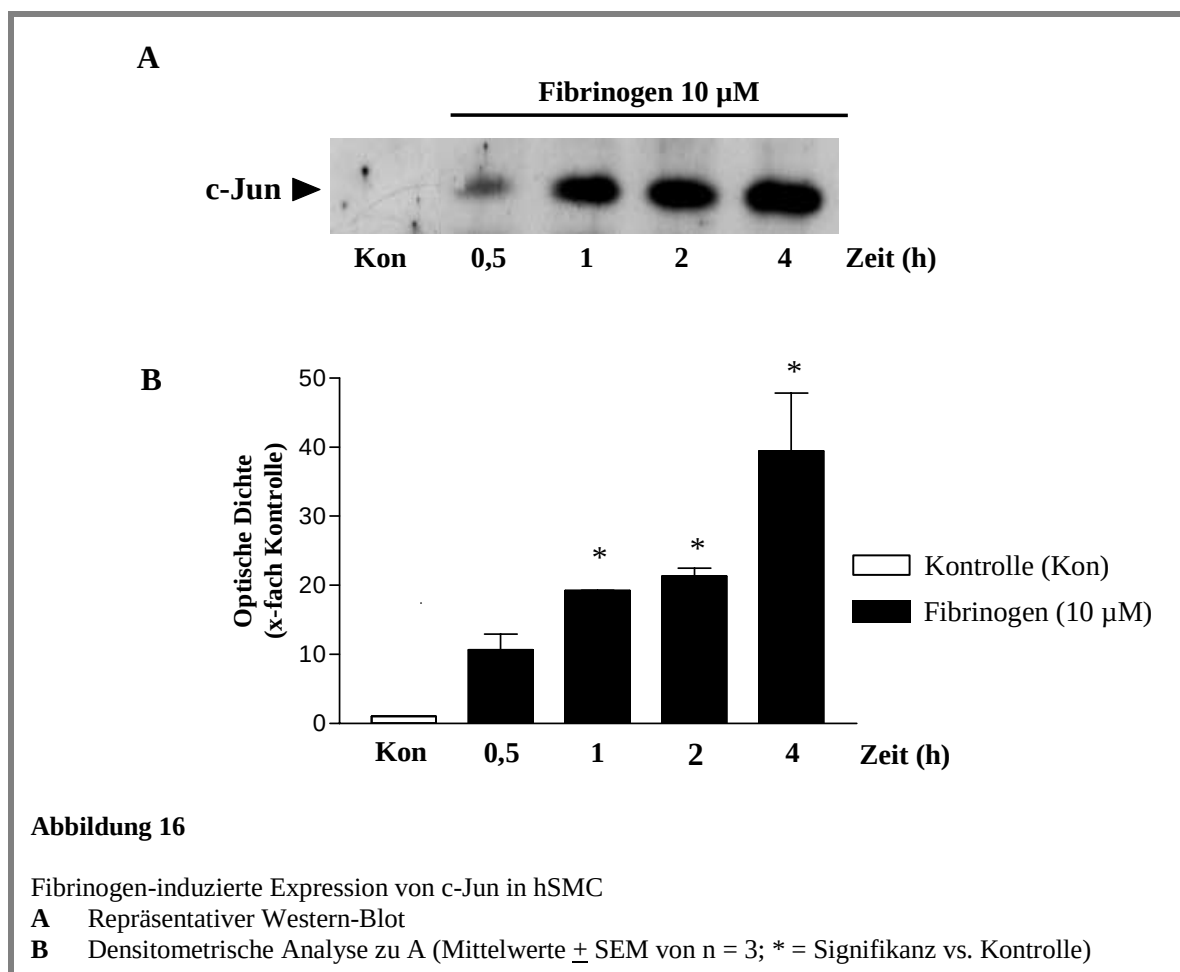
3.2.3.1 Effekte auf die Fibrinogen-induzierte p38-Phosphorylierung durch Rezeptor-Antagonisten

Ebenso wurde die Funktion der Fibrinogenrezeptoren ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$ als Mediatoren der Fibrinogen-induzierten p38-MAPK-Aktivierung durch Blockade der entsprechenden Rezeptoren überprüft. Wie in Abb. 15 dargestellt, kam es unter Anwendung von blockierenden ICAM-1-Antikörpern zu einer Reduktion der Fibrinogen-stimulierten p38-MAPK-Phosphorylierung um etwa 30 %. Abciximab hingegen bewirkte keine signifikante Änderung der Fibrinogen-induzierten p38-MAPK-Phosphorylierung.



3.2.4 Fibrinogen bewirkt die Expression von c-Jun

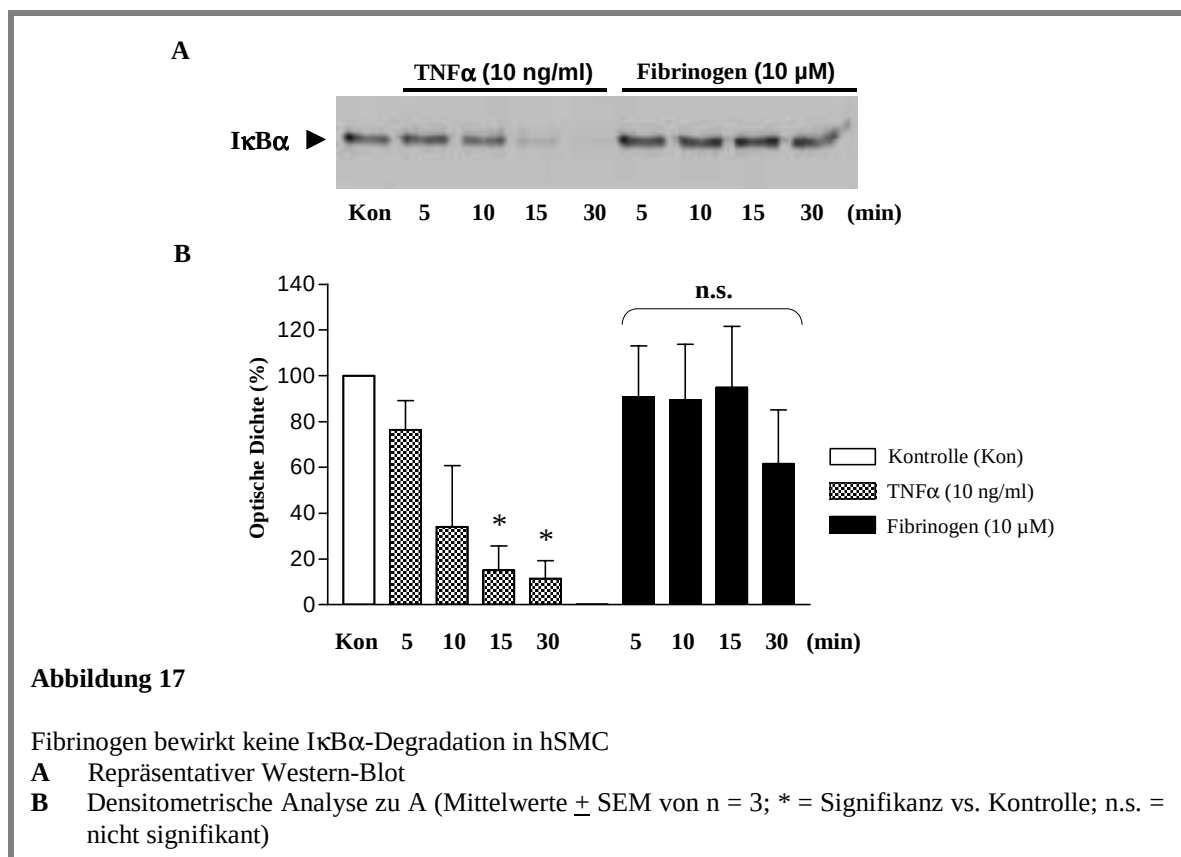
C-Jun gehört zu den „immediate-early“-Genen, die rasch und transient durch eine Vielzahl von Mitogenen über den Ras-MAPK-Signalweg induziert werden (Karin et al., 1997). Zusammen mit c-fos wird der dimere Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 (AP-1) gebildet, der eine *Leucin-Zipper-Struktur* besitzt und für die Proliferation von Zellen notwendig ist (Kovary und Bravo, 1991). In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob Fibrinogen, welches zu einer Phosphorylierung der MAPK ERK-1/2 führte, ebenfalls einen Einfluß auf die c-Jun-Expression hat. hSMC wurden für 0,5 bis 4 h mit 10 μ M Fibrinogen inkubiert. Dabei führte die Stimulation mit Fibrinogen zu einer zeitabhängigen Expression von c-Jun (Abb. 16). Diese c-Jun-Expression trat bereits nach 0,5 h auf und nahm mit Verlängerung der Inkubationszeit zu (etwa 39-fach) bei 4 h. 1 μ M Fibrinogen induzierte auch nach 4-stündiger Inkubation keine c-Jun-Expression (Western-Blot wird nicht gezeigt).



3.2.5 Wirkung von Fibrinogen auf das NFκB-System

3.2.5.1 Fibrinogen bewirkt keine Degradation des Inhibitorproteins IκBα

Der Transkriptionsfaktor „nuclear factor-κB“ (NFκB) scheint ein weiterer wichtiger Mediator für die Zell-Proliferation zu sein (Bellas et al. 1995, Bretschneider et al., 1997). Er gehört zu den Transkriptionsfaktoren, die nach Aktivierung im Zellkern die Transkription von Genen auslösen können. Im Cytosol liegt NFκB in Form eines inaktiven heterodimeren Komplexes gebunden an das Inhibitorprotein IκBα vor. Bei der Aktivierung von NFκB wird IκBα zunächst phosphoryliert, dann ubiquitiniert und degradiert. Durch die IκBα-Degradation wird NFκB freigesetzt und kann nun in den Zellkern translozieren, um seine genregulatorische Funktion auszuüben. Die Stimulation von hSMC mit 10 μM Fibrinogen zeigte keinen signifikanten Hinweis auf einen IκBα-Abbau und somit keine Aktivierung von NFκB (Abb. 17). Zur positiven Kontrolle wurden die Zellen mit TNFα (10 ng/ml) stimuliert, welches wie in der Literatur beschrieben (Hishikawa et al., 1997; Hoshi et al., 2000) zu einer NFκB-Aktivierung führte, die sich in einer zeitabhängigen Degradation des Inhibitorproteins IκBα zeigte.

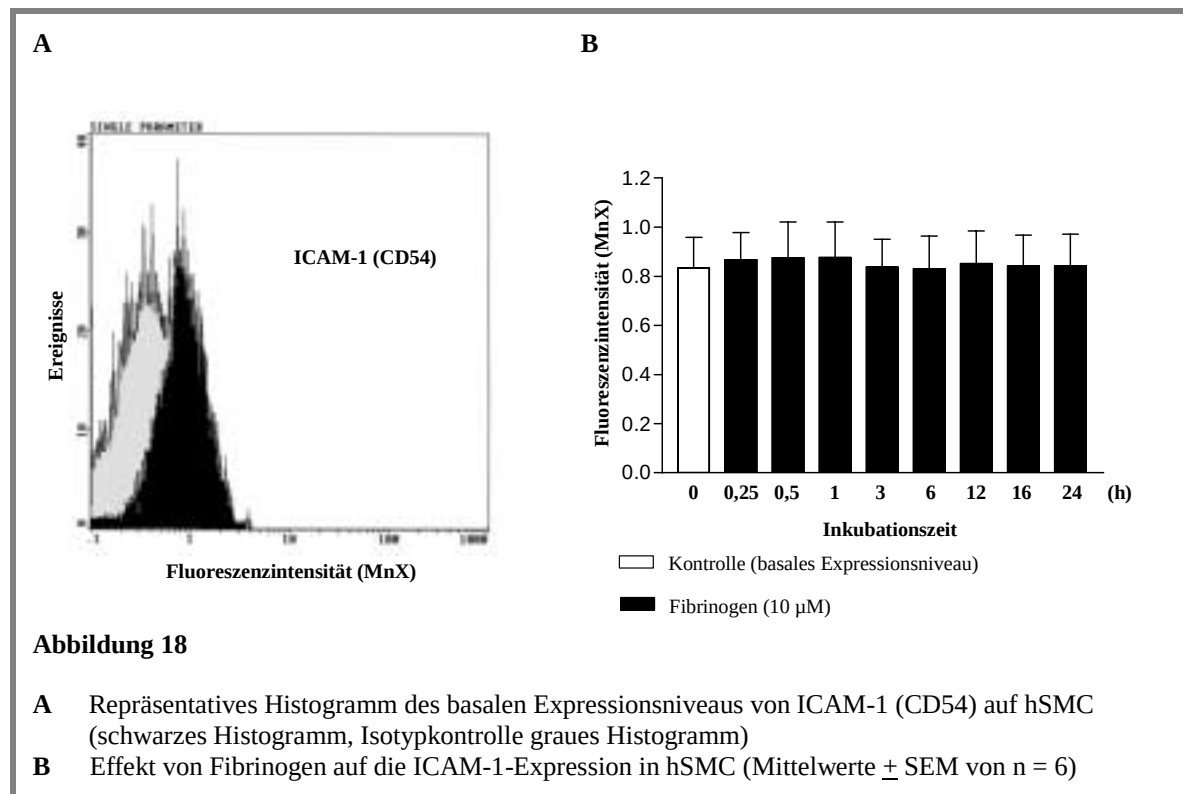


3.3 Wirkung von Fibrinogen auf die Expression von Oberflächen-Rezeptoren

Fibrinogen ist über die Interaktion mit Adhäsionsmolekülen sowohl in hämostatische als auch in inflammatorische Prozesse involviert, die wesentlich an der Pathogenese bzw. der Progression der Atherosklerose beteiligt sind. Im Rahmen atherosklerotischer Prozesse kommt es zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen. So wurde sowohl für ICAM-1 als auch für $\alpha_v\beta_3$ eine erhöhte Expression auf SMC in atherosklerotischen Läsionen beschrieben. Fibrin(ogen), welches in atherosklerotischen Läsionen ebenfalls präsent zu sein scheint, wird als Akute-Phase-Protein unter Zytokineinfluß gesteigert synthetisiert. Daraufhin wurde untersucht, inwieweit Fibrinogen einen Einfluß auf die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$ hat.

3.3.1 Fibrinogen beeinflusst nicht die basale ICAM-1-Expression auf hSMC

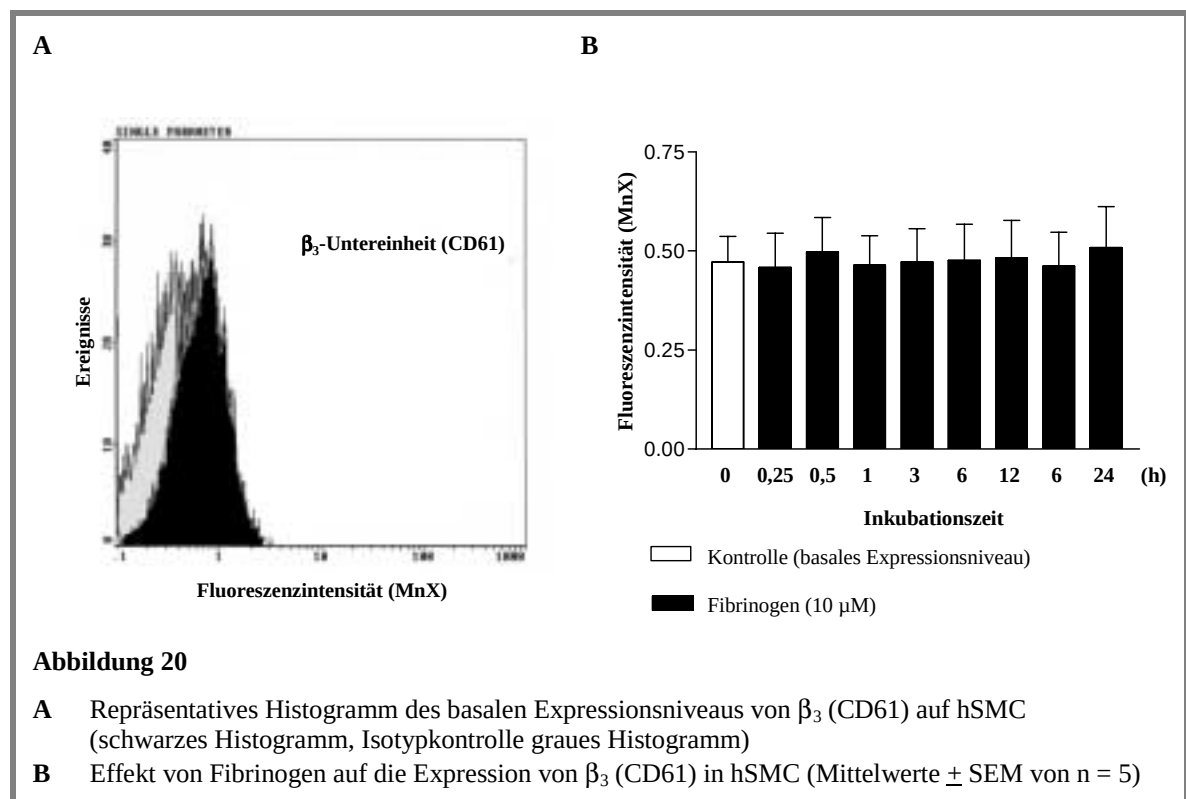
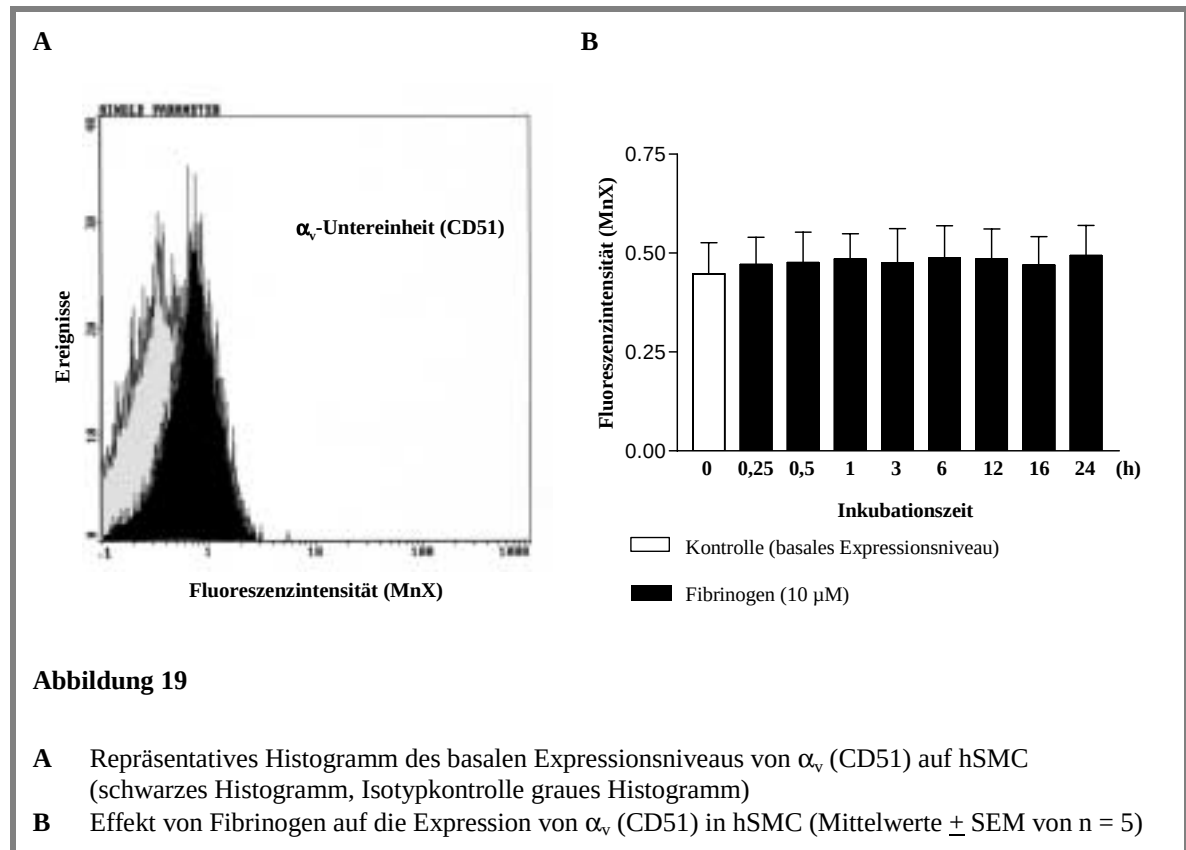
ICAM-1 wird auf der Oberfläche von kontraktile SMC normalerweise nicht exprimiert (O'Brien et al., 1996). Eine Oberflächenexpression von ICAM-1 auf kultivierten SMC läßt sich allerdings durch Zytokine, wie z.B. $\text{TNF}\alpha$ induzieren (Braun et al., 1999). Die folgende Untersuchung ging der Frage nach, ob Fibrinogen einen Einfluß auf die ICAM-1-Expression von kultivierten hSMC hat. Dazu wurden hSMC mit 10 μM Fibrinogen über unterschiedliche Inkubationszeiten stimuliert und nach mechanischer (nicht enzymatischer) Ablösung und Vereinzelung durchflusszytometrisch untersucht. Dabei zeigte sich, daß ICAM-1 basal auf den kultivierten hSMC der V. saphena exprimiert wird, und daß Fibrinogen keine signifikante Änderung der Expression bewirkte (Abb. 18). Als Positivkontrolle erfolgte eine Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml), wobei die in der Literatur beschriebene Hochregulation von ICAM-1 durch $\text{TNF}\alpha$ (Couffinhal et al., 1993) hier nicht beobachtet werden konnte.



3.3.2 Fibrinogen beeinflusst nicht die basale $\alpha_v\beta_3$ -Expression auf hSMC

Eine erhöhte Expression von $\alpha_v\beta_3$ wurde in neointimalen hSMC atherosklerotischer Koronararterien detektiert (Hoshiga et al., 1995). Die $\alpha_v\beta_3$ -Expression kann beeinflusst werden durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF- β (Byzova et al., 1998).

Ebenfalls wurde der Effekt von Fibrinogen auf die $\alpha_v\beta_3$ -Expression in hSMC untersucht. Dabei wurden die beiden Untereinheiten α_v (CD51) und β_3 (CD61) separat durchflusszytometrisch detektiert. In den Abbildungen 19 und 20 ist dargestellt, daß Fibrinogen sowohl die basale Expression von α_v (CD51) als auch von β_3 (CD61) nicht beeinflusst. Die Stimulation der α_v - bzw. β_3 -Expression auf der Zelloberfläche durch 20 ng/ml PDGF (Isoform BB) als Positivkontrolle, wie in der Literatur für SMC von Kaninchen beschrieben (Janat et al., 1992), wurde nicht beobachtet.



4. DISKUSSION

In den 80-er Jahren ergaben sich die ersten Hinweise auf eine Korrelation zwischen Hämostase-Faktoren und dem Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen. In diesem Zusammenhang konnte durch mehrere prospektive epidemiologische Studien nachgewiesen werden, daß ein erhöhter Fibrinogenspiegel assoziiert ist mit einem Erstereignis im kardiovaskulären Bereich (Ernst und Resch, 1993). Damit stellt die Hyperfibrinogenämie einen Risikofaktor für das Auftreten eines Myokardinfarktes dar. Darüber hinaus scheint der Fibrinogenspiegel mit dem angiographisch beurteilten Schweregrad der koronaren Atherosklerose in KHK-Patienten (Lowe et al., 1980; Broadhurst et al., 1990), mit rekurrierenden ischämischen Ereignissen (Meade et al., 1986) und dem Risiko einer Restenose nach Koronarangioplastie (Montalescot et al., 1995) zu korrelieren. Fibrinogen besitzt multiple Eigenschaften, die potentiell zur Atherogenese beitragen. Als prothrombogener Faktor fördert Fibrinogen durch Bindung an das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin die Thrombozytenadhäsion und -aggregation und beeinflußt die Blutviskosität. Die Thrombusbildung ist der hauptsächliche Pathomechanismus für das akute Koronarsyndrom, d.h. den Myokardinfarkt und die instabile Angina pectoris. Bei einem akuten Myokardinfarkt kommt es zum thrombotischen, kompletten Verschuß des betreffenden Gefäßes mit konsekutiver ischämischer Myokardnekrose, während die instabile Angina pectoris meistens aus einer muralen Thrombusformation resultiert. Der Thrombus ist wesentlich an der Progression chronischer atherosklerotischer Erkrankungen und der Restenose nach PTCA beteiligt (Ambrose und Weinrauch, 1996). Unter physiologischen Bedingungen wird die Thrombozytenaggregation oder eine Interaktion von Thrombozyten mit EC durch die Sekretion von Mediatoren wie Prostacyclin (PGI_2) und „Endothelium-Derived Relaxing Factor“ (EDRF oder NO) verhindert. Die „endotheliale Dysfunktion“ im Rahmen atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen führt zum Verlust der antithrombotischen Eigenschaft des Endothels und fördert die Adhäsion von Thrombozyten an die Gefäßwand. Als Folge einer Gefäßverletzung, wie sie z.B. durch Dilatation mittels Ballonkatheter und/oder Stent-Implantation zur Behandlung von Gefäßstenosen verursacht wird, adherieren Thrombozyten an der subendothelialen Oberfläche und es kommt zur Thrombozytenaktivierung. Diese wird durch chemische Agonisten (Thrombin, Kollagen, Adenosin-Diphosphat (ADP), Thromboxan A_2 (TXA_2), Noradrenalin, Serotonin) verstärkt. Im Zuge der Thrombozytenaktivierung kommt es hauptsächlich

durch TXA₂ zur Entleerung der Speichergranula der Thrombozyten (siehe Schrör, 2001). Die Inhaltsstoffe der α -Granula (PDGF, „Transforming growth factor- β “ (TGF- β), „epidermal growth factor“ (EGF) und „insulin-like growth factor-1“ (IGF-1)), sowie Serotonin und ADP bzw. ATP der elektronendichten Granula stellen mitogene Stimuli für SMC dar (Weber und Schrör, 1999).

4.1 Effekte von Fibrinogen auf die DNA-Synthese in hSMC

Die Proliferation von SMC ist ein wichtiger Mechanismus in der Atherogenese und der Bildung einer intimalen Hyperplasie (Neointima) nach PTCA oder Stent-Implantation (Ross, 1999; Ferns und Avades, 2000). Fibrin(ogen), welches an der Thrombusbildung maßgeblich beteiligt ist, besitzt zusätzlich proliferationsfördernde Eigenschaften. So wurde ein mitogener Effekt von Fibrinogen- bzw. Fibrin-Spaltprodukten für eine Vielzahl von Zelltypen, einschließlich EC, Fibroblasten, Mesothelzellen, SMC und Lymphozyten beschrieben (Herrick, 1999). Die Fibrinopeptide A und B scheinen einen mitogenen Stimulus für Fibroblasten *in vitro* darzustellen und das Fibrindegradationsprodukt Fragment E die vaskuläre Proliferation einschließlich Angiogenese zu stimulieren. Die Effekte von intaktem Fibrinogen auf die Mitogenese von hSMC wurden bisher nicht genauer untersucht. Aus diesem Grund beschäftigte sich diese Arbeit mit der Charakterisierung eines potentiellen mitogenen Effektes von Fibrinogen auf kultivierte hSMC der V. saphena.

In dem hier untersuchten Zellsystem konnte erstmalig gezeigt werden, daß lösliches Fibrinogen konzentrationsabhängig eine Steigerung der DNA-Synthese (etwa um den Faktor zwei) bewirkt, gemessen anhand der (³H)-Thymidin-Inkorporation. Einerseits führte die Stimulation mit Fibrinogen bis zu einer Konzentration von 10 μ M zu einer schwachen, aber statistisch signifikanten Zunahme der Mitogenese. Andererseits führten höhere Konzentrationen von Fibrinogen (30 und 100 μ M) zu einer Reduktion der DNA-Synthese in hSMC und zu einer mikroskopisch beobachteten Ablösung der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes, welches eher einem zytotoxischen Effekt entspricht. Fibrinogen liegt im Gesamtblut in einer physiologischen Konzentration von 4-6 μ M vor, welches ungefähr einer Plasmakonzentration von 10 μ M entspricht (Harley et al., 2000). Ein ähnlicher mitogener Effekt von Fibrinogen wurde für lymphoblastoide Zelllinien und Fibroblasten beschrieben (Gardiner und D'Souza, 1999; Héron et al.,

1998; Herrick et al., 1999). So demonstrierten Gardiner und D'Souza (1997) in Raji-B-Lymphozyten einen 2-4-fachen Anstieg der (^3H)-Thymidin-Inkorporation durch 0,2-0,8 μM Fibrinogen. Für humane pulmonale Fibroblasten beschrieben Gray et al. (1995) eine mitogene Wirkung durch 1,1 μM Fibrinogen B (β -Kette). Allerdings wurden in diesen Arbeiten sehr geringe Konzentrationen eingesetzt, die noch nicht einmal der physiologischen Konzentration von Fibrinogen entsprechen und somit keine potentiellen zytotoxischen Konzentrationen darstellen dürften. Im Gegensatz dazu wird Fibrin(ogen) aber auch mit einer antiproliferativen Wirkung in Verbindung gebracht. Eine Arbeit von Ishida und Tanaka (1982) zeigte, daß große Mengen an Fibrinogen-Fragment D und E zu einer Reduktion der Zellproliferation *in vitro* führten. Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß das Ausmaß des mitogenen Effektes von Fibrinogen Zelltyp- und konzentrationsabhängig ist. Möglicherweise unterscheiden sich die frühen Fibrin(ogen)-Spaltprodukte A und B von den späten D und E in Bezug auf ihre mitogene Wirkung im Zuge einer Anpassung an den Reparaturprozeß. Eine verstärkte Ausschüttung der Fibrin(ogen)-Spaltprodukte D und E könnte die proliferative Antwort im Rahmen fortgeschrittener reparativer Prozesse limitieren, welches eine übermäßige Proliferation verhindern würde.

Ebenfalls wurde für andere Hämostase-Proteine die Stimulation der Mitogenese von SMC beschrieben. So wurde von Bretschneider et al. (1999, 2000) berichtet, daß Thrombin und Faktor Xa *in vitro* eine 3-fache Zunahme der DNA-Synthese induzieren. Klinische Studien zeigten, daß Patienten, bei denen es zur Bildung eines luminalen Thrombus an der Verletzungsstelle des Gefäßes nach koronaren Interventionen kam, ein höheres Risiko für die Entwicklung einer Restenose haben als Patienten, bei denen eine Thrombusbildung ausblieb (Bauters et al., 1995). Thrombozyten, die eine Quelle von Wachstumsfaktoren darstellen (Weber und Schrör, 1999), stabilisierende Fibrinstränge, die eine Quelle von Fibrinogen-Degradationsprodukten (FDP) darstellen (Smith, 1993), Thrombin und Faktor Xa sind Komponenten der Thrombusformation und potentielle mitogene Stimuli für SMC. Daher könnte Fibrinogen, welches als für die Plättchenaggregation essentielles adhäsives Protein im Thrombus präsent ist, synergistisch mit diesen Faktoren *in vivo* die Mitogenese stimulieren und somit zu einer gesteigerten SMC-Proliferation beitragen. Inwiefern der mitogene Effekt von Fibrinogen sich letztendlich auf die Proliferation kultivierter hSMC auswirkt, kann nicht beantwortet werden, und würde weitere Untersuchungen erfordern. Die Beobachtung, daß höhere Konzentrationen von Fibrinogen eine Ablösung der Zellen herbeiführte, läßt

die Frage aufkommen, inwieweit zusätzlich die Induktion apoptotischer Effekte eine Rolle spielt. Dies wurde in dieser Arbeit nicht überprüft und stellt ebenfalls einen Gegenstand für weitere Untersuchungen dar.

4.2 Effekte von Fibrinogen auf die Signaltransduktion in hSMC

4.2.1 Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch Fibrinogen

Bisher gibt es wenig Informationen über die Signaltransduktionswege der Fibrinogen-induzierten Mitogenese. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben Hinweise auf eine Beteiligung des ERK-Weges, der vorwiegend in Zusammenhang gebracht wird mit Zellproliferation. Mittels phosphospezifischer Antikörper konnte im Western-Blot eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2 durch Fibrinogen nachgewiesen werden, und die Fibrinogen-stimulierte DNA-Synthese in hSMC konnte durch den spezifischen MEK-1 Inhibitor PD 98059 gehemmt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden von Gardiner und D'Souza (1999) in Raji B-Lymphozyten überein, die die Phosphorylierung von ERK-1 in Antwort auf Fibrinogen und die Inhibition der Fibrinogen-induzierten Mitogenese durch PD 98059 beschrieben. Die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2 ist assoziiert mit der DNA-Replikation und Proliferation von vaskulären SMC (Bornfeldt, 1996) und von trachealen glatten Muskelzellen (Orsini et al., 1999; Lee et al., 2001). Sie spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion der Signalübertragung durch Mitogene, die über Protein-Tyrosin-Kinasen, wie z.B. PDGF (Force und Bonventre, 1998) oder über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, wie z.B. Angiotensin II (Xi et al., 1999) agieren. Außerdem scheint die Aktivierung von ERK-1/2 eine Rolle in der Neointima-Bildung nach Angioplastie zu spielen (Gennaro et al., 2003).

Die aktivierten MAP-Kinasen ERK-1/2 können eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren aktivieren, wie z.B. c-Jun und c-Fos (Marshall, 1994; Pulverer et al., 1991), die zusammen den Transkriptionsfaktor AP-1 bilden, der auch mit der Proliferation assoziiert wird. Mitogene Stimuli aktivieren über den ERK-Weg bevorzugt AP-1-Komponenten über eine Steigerung der Expression dieser Komponenten. In diesem Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit eine zeitabhängige Expression von c-Jun nachgewiesen werden. Eine c-Jun Expression wurde ebenfalls von Rao und Runge (1996) in der mitogenen Antwort auf Thrombin in SMC (Ratte)

beschrieben. Es zeigte sich ferner im Tiermodell (Rattenkarotiden) für c-Jun eine Involvierung in die intimale Hyperplasie nach Angioplastie (Khachigian et al., 2002; Hu et al., 1997).

Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit eine Fibrinogen-induzierte Aktivierung des wichtigen promitogenen Signalweges der PI3-Kinase nachgewiesen werden. Eine beobachtete nahezu vollständige Hemmung der Fibrinogen-stimulierten DNA-Synthese durch direkte Blockade der PI3-Kinase durch den spezifischen Inhibitor LY 294002 und ebenso durch selektive Inhibition der p70 S6-Kinase mittels Rapamycin diente als Hinweis auf eine bedeutende Rolle des PI3-Kinase-Weges in der mitogenen Antwort auf Fibrinogen. Ergänzend konnte eine Fibrinogen-induzierte Aktivierung von Akt, gemessen an der Phosphorylierung von Thr 308 und Ser 473, durch phosphospezifische Antikörper nachgewiesen werden. PI3-Kinasen haben eine wichtige Bedeutung in der Regulation der Zellfunktionen, einschließlich Zellproliferation, Apoptose, Chemotaxis und Thrombozytenaktivierung. So wurde in Abhängigkeit der Interaktion von Fibrinogen mit $\alpha_{IIb}\beta_3$ in humanen Thrombozyten über eine Aktivierung der PI3-Kinase berichtet (Selheim et al., 2000). Im Zusammenhang mit einer mitogenen Antwort auf Fibrinogen existieren bisher keine Erkenntnisse über eine Involvierung des PI3-Kinase-Weges. Allerdings wurde die Induktion der PI3-Kinase bzw. Akt im Zuge einer mitogenen Antwort auf verschiedene Stimuli berichtet: Auf PDGF in humanen pulmonalen vaskulären SMC (Goncharova et al., 2002) und auf EGF und Thrombin in humanen trachealen glatten Muskelzellen (Krymskaya et al., 1999), wodurch über den mit Fibrinogen gemeinsamen Signalweg zelluläre Reaktionen potenziert werden könnten. Dies könnte z.B. zu einer gesteigerten SMC-Proliferation im Rahmen der intimalen Hyperplasie beitragen. So zeigten Untersuchungen von Shigematsu et al. (2000) eine Beteiligung des PI3-Kinase-Signalweges in der SMC-Replikation der Media von Rattenkarotiden nach Ballonkatheter-Verletzung.

Die PI3-Kinase bzw. Akt wird auch in Verbindung gebracht mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B durch PDGF (Romashkova und Makarov, 1999) und durch TNF α (Ozes et al., 1999). NF κ B ist ein Mediator der Proliferation von SMC (Hoshi et al., 2000) und scheint involviert zu sein in die proliferative Antwort in hSMC auf Thrombin (Nakajima et al., 1994). So wurde eine potentielle Aktivierung von NF κ B, gemessen an der Degradation des inhibitorischen Proteins I κ B α , in Antwort auf Fibrinogen untersucht. Fibrinogen bewirkte im Gegensatz zu TNF α keine Degradation von I κ B α . Ähnliche Befunde wurden von Rauch et al. (2000) in Antwort auf PDGF

beschrieben, die in hSMC der V. saphena und humanen Fibroblasten eine Phosphorylierung von Akt, aber keine Aktivierung von NFκB beobachten konnten, obwohl PDGF einen starken Wachstumsfaktor für beide Zelltypen darstellt. Im Gegensatz zu den eigenen Beobachtungen konnte die Arbeitsgruppe von Sitrin et al. (1998) eine Aktivierung von NFκB in mononuklearen Phagozyten durch Fibrinogen nachweisen. Ein ähnliches Ergebnis wurde in humanen Neutrophilen beobachtet (Rubel et al., 2003), wobei die Fibrinogen-induzierte NFκB-Aktivierung einen antiapoptotischen Effekt und eine Involvierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und von ERK-1/2 zeigte. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede zu den eigenen Ergebnissen könnte im Zelltypus und den damit verbundenen unterschiedlichen Fibrinogenrezeptoren liegen. In neutrophilen Leukozyten wird die Fibrinogen-induzierte Aktivierung von NFκB anscheinend über das $\alpha_M\beta_2$ -Integrin vermittelt, dessen Expression auf Leukozyten beschränkt ist. Eine weitere Ursache könnten die Stimulationsbedingungen darstellen, da die Aktivierung von NFκB in mononuklearen Phagozyten durch Fibrinogen nur in Präsenz von Mn^{2+} erfolgte, welches in den eigenen Untersuchungen nicht präsent war.

Andererseits wurde in den vorliegenden Untersuchungen eine Fibrinogen-induzierte Aktivierung der MAPK-Subfamilie zugehörigen p38-MAPK nachgewiesen, die eher mit einer zellulären Streß- und inflammatorischen Antwort assoziiert wird. Als zelluläre Reaktionen der p38-Phosphorylierung wurden antiproliferative, proapoptotische Prozesse (Kyriakis und Avruch, 2001), aber auch proliferative Prozesse in SMC (Zhao et al., 2002) beschrieben, wie z.B. die PDGF-induzierte Mitogenese von SMC (Ratte) (Yamaguchi et al., 2001).

4.2.2 Bedeutung von ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$ in der Fibrinogen-induzierten Signaltransduktion

ICAM-1 vermittelt nicht nur adhäsive Interaktionen zwischen den Zellen, sondern stellt auch ein Signalmolekül dar. Als Rezeptor für Fibrinogen wird es in Verbindung gebracht mit einer mitogenen Antwort auf Fibrinogen in lymphoblastoiden Zelllinien (Gardiner und D'souza, 1997). Einerseits konnte in dem hier untersuchten Zellsystem durch Unterbindung der Interaktion von Fibrinogen mit ICAM-1 durch blockierende Antikörper keine Inhibition der Fibrinogen-stimulierten DNA-Synthese in hSMC bewirkt werden. Andererseits konnte ein inhibitorischer Effekt auf die Fibrinogen-induzierte Signaltransduktion unter Blockade von ICAM-1 beobachtet werden. So zeigte sich eine hemmende Wirkung auf die Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK. Die ERK-1/2-Phosphorylierung hingegen blieb unbeeinflusst. Diese Ergebnisse entsprechen nicht den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen einer ICAM-1-vermittelten ERK-Involvierung. Die Erkenntnisse zur Signaltransduktion von ICAM-1 in SMC sind allerdings gering, da sich die Untersuchungen vorwiegend auf EC konzentrierten. Die meisten Untersuchungen bzgl. der Signaltransduktion von ICAM-1 mittels mimetischer Antikörper ergaben eine Involvierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, die im Zusammenhang stehen mit zellulären Reaktionen wie die Induktion einer „Vascular cellular adhesion molecule-1“ (VCAM-1)-Expression in EC (Lawson et al., 1999) und in hSMC (Lawson et al., 2001) und die Produktion von Chemokinen in EC (Sano et al., 1998). In Bezug auf die Interaktion von Fibrinogen mit ICAM-1 wurde über proliferative bzw. antiapoptotische zelluläre Reaktionen berichtet, wobei sowohl in lymphoblastoiden Zelllinien (Gardiner und D'souza, 1999), als auch in EC (Pluskota und D'Souza, 2000) die MAP-Kinasen ERK-1/2 involviert zu sein scheinen. Hingegen konnten Etienne und Kollegen (1998) keine Aktivierung der ERKs in Antwort auf eine ICAM-1-Ligation („crosslinking“) in cerebralen EC von Ratten detektieren, sondern die Induktion von Signalen wie sie bei der Stimulation von Integrinen beobachtet werden kann, wie die Tyrosin-Phosphorylierung der FAK, die u.a. zu einer Aktivierung des PI3-Kinase-Weges führen kann (Aplin et al., 1998).

Bisher gibt es nur wenige Hinweise in der Literatur auf eine Involvierung der p38-MAPK in der Signaltransduktion von ICAM-1, und konkrete Hinweise auf eine Involvierung des PI3-Kinase-Weges fehlen. Eine Beteiligung der p38-MAPK wurde von Hubbard und Rothlein (2000) vermutet. Desweiteren berichteten Wang und Doerschuk (2001) über das „Remodeling“ des Zytoskeletts in pulmonalen

mikrovaskulären EC als zelluläre Reaktion auf eine ICAM-1-induzierte p38-MAPK-Aktivierung. ICAM-1 scheint an der Fibrinogen-induzierten Signaltransduktion über den p38-MAPK-Weg und den PI3-Kinase-Weg involviert zu sein. Dabei scheint ICAM-1 kein Mediator der Fibrinogen-induzierten Mitogenese zu sein und somit in Antwort auf Fibrinogen andere zelluläre Reaktionen zu vermitteln. Gründe für die Differenzen in der Beteiligung der ICAM-1-vermittelten Aktivierung der ERKs und der mitogenen Wirkung könnten Unterschiede im Zelltypus sein.

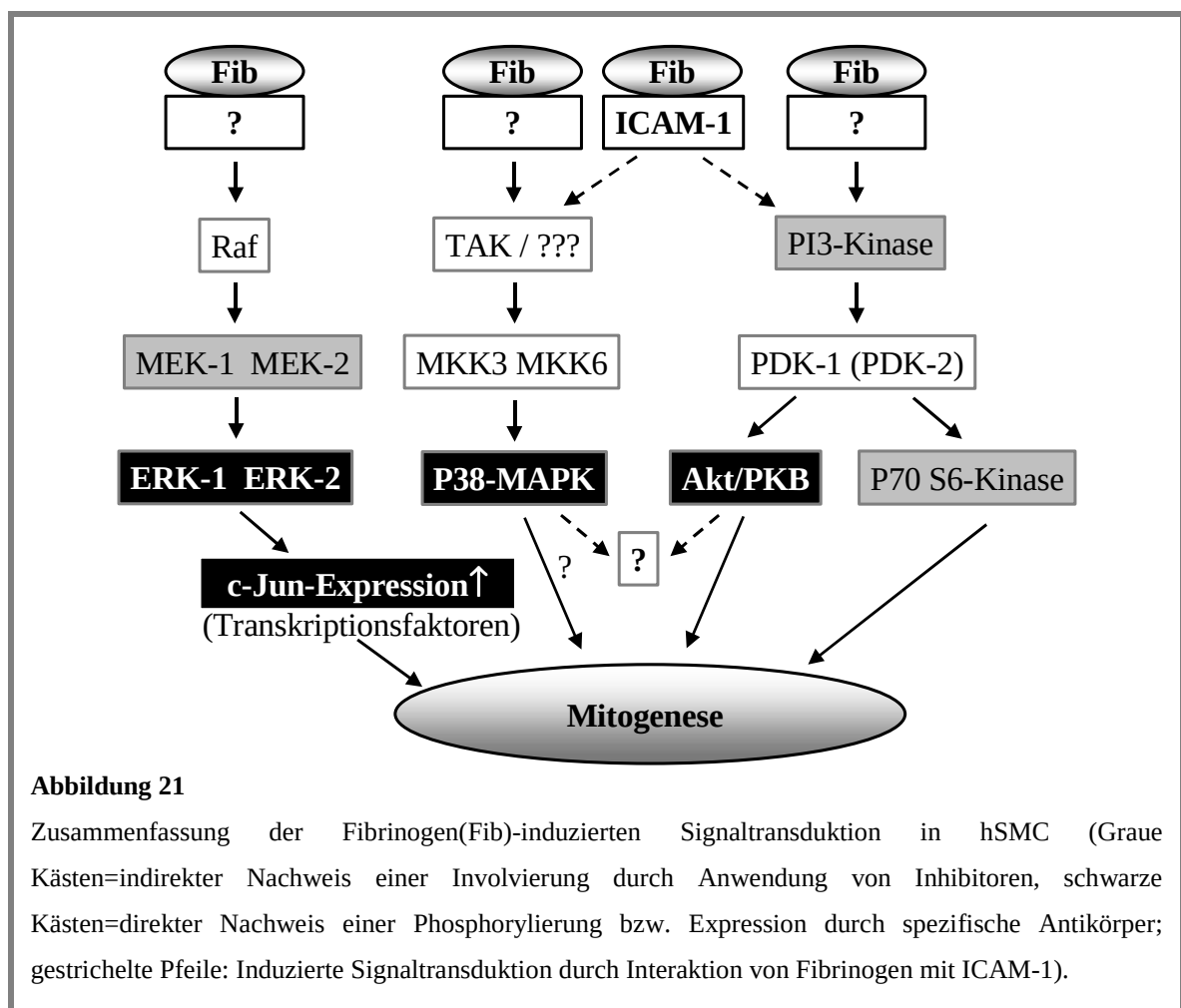
Integrine vermitteln nicht nur den mechanischen Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakt, sondern auch die biologische Signalübertragung in beide Richtungen über die Plasmamembran. Die Aktivierung des Integrins als Rezeptor erfolgt in Form des „inside-out signaling“ (Schwartz et al., 1995), d. h. Integrine besitzen die Fähigkeit, ihre Affinität zu extrazellulären Liganden in Abhängigkeit erhaltener Signale aus dem Zellinneren zu modulieren. Ein „outside-in signaling“ erfolgt durch die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Seite des Integrins, woraufhin eine komplexe Serie von intrazellulären Antworten initiiert wird (Shattil und Ginsberg, 1997; Juliano und Haskill, 1993). Da der zytoplasmatische Anteil der Integrine keine enzymatische Aktivität besitzt, erfolgt die Signaltransduktion durch Assoziation mit Adapterproteinen und regulatorischen Proteinen, die den zytosolischen Anteil des Integrins mit dem Zytoskelett und zytoplasmatischen Kinasen verbindet. Ein zentrales Regulatorprotein, welches an der Signaltransduktion von Integrinen beteiligt ist, ist FAK, die über die Zytoskelett-Proteine Talin, α -Actinin und Paxillin mit dem zytoplasmatischen Anteil der β_3 -Untereinheit verbunden ist. Die Aktivierung von FAK ermöglicht die Bindung von mSOS und somit über Ras eine Verbindung zur Signalkaskade von Wachstumsfaktoren, die zur Verstärkung mitogener Signale durch Wachstumsfaktoren führt (Giancotti und Ruoslahti, 1999). Vermutlich potenziert das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf diese Weise die Signale in Antwort auf PDGF und VEGF (Eliceiri, 2001). Die PI3-Kinase wird als Substrat der FAK auch in Verbindung gebracht mit der Signaltransduktion von Integrinen (Chen und Guan, 1994). Eine $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase konnte in Osteoklasten beobachtet werden (Brooks et al., 1998).

In dieser Arbeit konnte die Aktivierung der MAPK ERK-1/2, der Proteinkinase Akt als Signalkomponente des PI3-Kinase-Weges und der p38-MAPK, die u.a. vermutlich auch durch die PI3-Kinase aktiviert werden kann (Laprise et al., 2002), nachgewiesen werden. Dies könnte theoretisch über das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vermittelt werden. Die

Untersuchungen bzgl. einer Involvierung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins ergaben jedoch, daß die Blockade von $\alpha_v\beta_3$ durch Abciximab (c7E3-Fab, Reopro®) sowohl auf die Fibrinogen-induzierte DNA-Synthese, als auch auf die Fibrinogen-stimulierten Signalwege keinen Einfluß hatte. Diese Beobachtungen lassen $\alpha_v\beta_3$ als Mediator der Fibrinogen-induzierten mitogenen Wirkung in hSMC eher unwahrscheinlich erscheinen. Tsakadze et al. (2002) hingegen konnten beobachten, daß die proliferative Antwort in EC überwiegend durch die Interaktion von Fibrinogen mit $\alpha_v\beta_3$ vermittelt wird. $\alpha_v\beta_3$ wird ebenso in Verbindung gebracht mit der proliferativen Antwort in SMC im Rahmen der Neointima-Bildung (Sajid und Stouffer, 2002). Das in den vorliegenden Untersuchungen angewendete Antiintegrin Abciximab bindet $\alpha_v\beta_3$ -Integrine auf SMC und EC mit gleicher Affinität wie $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf Thrombozyten (Tam et al., 1998). Die verwendete maximale Konzentration von Abciximab (10 $\mu\text{g/ml}$) entspricht etwa dem Zweifachen der Plasmakonzentration (5-6 $\mu\text{g/ml}$), die aus einer therapeutischen Administration von 0,25 mg/kg resultieren würde (Renda et al., 2003), so daß eine vollständige Rezeptorblockade anzunehmen ist. Eine Begründung für dieses Negativergebnis ist, daß Fibrinogen vermutlich aufgrund einer inaktiven Konformation von $\alpha_v\beta_3$ als Ligand nicht gebunden wird. Denn die basale Affinität für Liganden des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins variiert in Abhängigkeit vom Zelltyp und unterliegt der akuten Modulation im Rahmen des „inside-out-Signaling“. Die Modulation der Rezeptor-Affinität erfolgt über die Konformationsänderung in ein Heterodimer. Ein Beispiel dafür ist die selektive Bindung von Fibrinogen nur an aktivierte Thrombozyten. Darüber hinaus ist die Ligandenbindung auch abhängig von divalenten Kationen. Die Bindung von Fibrinogen an $\alpha_v\beta_3$ wird durch Ca^{2+} anscheinend unterdrückt und an $\alpha_{IIb}\beta_3$ unterstützt (Smith et al., 1994).

Zusammenfassend läßt sich aus den vorliegenden Daten schließen, daß Fibrinogen die Signaltransduktion über den ERK-Weg, den PI3-Kinase-Weg und den p38-MAPK-Weg induziert. Der ERK-Weg und der PI3-Kinase-Weg stellen positive Regulatoren für die Proliferation dar, hingegen wird die p38-MAPK eher als negativer Regulator angesehen (Page und Hershenson, 2000). Darüber hinaus scheint die Fibrinogen-induzierte p38-Aktivierung und Akt-Aktivierung teilweise über ICAM-1 vermittelt zu werden, das nicht als Mediator des mitogenen Effektes von Fibrinogen angenommen werden kann. Die p38-MAPK wird auch assoziiert mit der durch Wachstumsfaktoren und Zytokinen regulierten Migration von SMC (Hedges et al., 1999; Zhan et al., 2003), der Expression

von ICAM-1 (Gao et al., 2002) und von MCP-1 auf EC (Dickfeld et al., 2001). Welche zellulären Reaktionen ICAM-1 in Antwort auf Fibrinogen vermittelt bleibt spekulativ und bedarf weiterer Untersuchungen. Da ebenfalls $\alpha_v\beta_3$ aufgrund der vorliegenden Befunde als Mediator der Fibrinogen-induzierten Mitogenese ausgeschlossen werden kann, müssen somit andere Rezeptoren den mitogenen Effekt von Fibrinogen vermitteln. So stellen beispielsweise Calreticulin oder der „mitogenic fibrinogen receptor“ (MFR, 92-94 kDa-Rezeptor) weitere Rezeptoren für Fibrinogen dar, die mit proliferativen zellulären Prozessen assoziiert werden (Herrick et al., 1999). Möglicherweise handelt es sich auch um einen anderen Integrinrezeptor, so konnten Ikari et al. (2000) zeigen, daß das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin, welches ebenfalls in Verbindung gebracht wird mit der SMC-Proliferation (Davenpeck et al., 2001), eine bedeutendere Rolle als Fibrinogenrezeptor auf SMC spielen könnte als das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen ergibt sich für die Signaltransduktion in Antwort auf Fibrinogen in hSMC die in der Abb. 21 dargestellte schematische Zusammenfassung.



4.3 **Bedeutung von Fibrinogen für die Expression von Oberflächenrezeptoren**

Neben seiner bedeutenden Rolle in der Koagulationskaskade spielt Fibrinogen ebenfalls eine wichtige Rolle in inflammatorischen und reparativen Prozessen (Doolittle, 1984). Für akute sowie chronische inflammatorische Reaktionen ist die Deposition von Fibrin und die Akkumulation von Leukozyten ein histopathologisches Kennzeichen. So wurde Fibrinogen als wichtiger Faktor für die Pathophysiologie entzündlicher Erkrankungen beschrieben, wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis, die u.a. gekennzeichnet ist von intraartikulären Fibrinablagerungen und der Rekrutierung inflammatorischer Zellen (Liu und Piela-Smith, 2000; Sanchez-Pernaute et al., 2003), und die Glomerulonephritis (Sraer et al., 1993). Im Rahmen inflammatorischer Prozesse erfolgt die Leukozytenmigration in entzündliches Gewebe, die durch spezielle Moleküle auf der Oberfläche der beteiligten Blutzellen und EC ermöglicht wird. An dieser sogenannten „Adhäsionskaskade“ sind Integrine, Selektine und Mitglieder der Immunglobulin-Gensuperfamilie beteiligt. Die Adhäsionskaskade beginnt mit dem Selektin-gesteuerten „rolling“ von Leukozyten auf dem Endothel, gefolgt von einer stabilen Leukozyten-Adhäsion an die Endothelzellen, die vermittelt wird durch β_2 -Integrine (v.a Mac-1 und LFA-1), die mit Liganden, wie ICAM-1 interagieren (Carlos und Harlan, 1994; Springer, 1994). Die anschließende transendotheliale Migration von adherenten Leukozyten wird vermittelt über β_2 -Integrine und Moleküle der Immunglobulin-Gensuperfamilie. Fibrinogen dient als Brückenmolekül zwischen diesen Zellen und vermittelt somit die Adhäsion und transendotheliale Migration von Leukozyten bereits in physiologischen Konzentrationen (Languino et al., 1993 und 1995; Altieri, 1999). Ferner wird die Synthese von Fibrinogen als Akute-Phase-Protein im Zuge einer systemischen inflammatorischen Antwort durch Botenzytokine wie Interleukin-6 (IL-6) gesteigert, etwa um den Faktor vier (Danesh et al., 1998). Eine systemische inflammatorische Antwort tritt ebenfalls im Rahmen der Atherosklerose auf, dabei kommt es durch eine gesteigerte Zytokinantwort zu einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen. Daher wurden ergänzend die Effekte von Fibrinogen, welches synergistisch mit Zytokinen die Expression von Adhäsionsmolekülen beeinflussen könnte, auf die Expression von ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$ untersucht.

4.3.1 Effekte von Fibrinogen auf die Expression von ICAM-1

ICAM-1 wird als Glykoprotein der Zelloberfläche auf Monozyten, T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Epithelzellen und EC exprimiert (Tsakadze et al., 2002). Eine ICAM-1-Expression wurde auf SMC in atherosklerotischen Läsionen (Printseva et al., 1992) beobachtet, die unter physiologischen Bedingungen in normalen kontraktilen SMC nicht zu finden ist (O'Brien et al., 1996). Jedoch kann die Expression von ICAM-1 durch Zytokine, wie $\text{TNF}\alpha$, Interleukin- 1β (IL- 1β) und Interferon- γ (IFN- γ) auf kultivierten SMC induziert bzw. hochreguliert werden (Braun et al., 1999), wobei von einer *de novo* Synthese ausgegangen wird.

Die vorliegenden durchflußzytometrischen Untersuchungen in Bezug auf die Expression von ICAM-1 zeigten, daß ICAM-1 basal auf kultivierten hSMC der V. saphena nur gering exprimiert wird. Dies entspricht den Befunden von durchflußzytometrischen Analysen in hSMC der Aorta (Couffinhal et al., 1994) und von ELISA-Analysen in hSMC von Koronararterien, Pulmonalarterien und der V. saphena (Braun et al., 1995 und 1997). Die ICAM-1-Expression ist *in vitro* Phänotyp-abhängig und kann nur induziert werden bei herabgesetztem oder moduliertem Myofilament-Volumen (Rolfe et al., 2000). Kultivierte SMC unterliegen einer phänotypischen Differenzierung zum synthetischen Phänotyp (Thyberg et al., 1985), welches eine basale ICAM-1-Expression auf kultivierten SMC im Gegensatz zur fehlenden ICAM-1-Expression auf SMC des kontraktilen Phänotyps erklären würde. Fibrinogen bewirkte keine Änderung der ICAM-1-Expression. Diese negativen Befunde korrelieren nicht mit den Beobachtungen einer Hochregulation von ICAM-1 durch Fibrin(ogen) auf EC (Harley et al., 2000; Qi et al., 1997) und auf humanen Fibroblasten der Synovia (Liu und Piela-Smith, 2000). Die Expression von ICAM-1 scheint zwar in einer sehr zellspezifischen Weise reguliert zu werden (van de Stolpe und van der Saag, 1996), so daß Differenzen zwischen unterschiedlichen Zelltypen plausibel wären. Jedoch führte $\text{TNF}\alpha$ als Positivkontrolle nicht zu der in der Literatur beschriebenen Hochregulation der ICAM-1-Expression in hSMC. In den Arbeiten von Braun et al. (1995 und 1997) wurde zur Detektion der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Oberflächenexpression von ICAM-1 ein ELISA angewendet, welches eine Diskrepanz zu den eigenen durchflußzytometrischen Untersuchungen erklären könnte. Die Arbeitsgruppe von Couffinhal et al. (1993) hingegen detektierte die ICAM-1-Hochregulation durch $\text{TNF}\alpha$ mittels Durchflußzytometrie. Als mögliche Ursache für die eigenen negativen Befunde könnten die Versuchsbedingungen in Frage kommen.

4.3.2 Effekte von Fibrinogen auf die Expression von $\alpha_v\beta_3$

Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin ist weitverbreitet, es wird expremiert auf EC, SMC, mesangialen Zellen, Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, Neutrophilen und Thrombozyten (Byzova et al., 1998). Die Expression auf EC scheint abhängig von der Herkunft der EC zu sein, denn auf kultivierten HUVEC ist $\alpha_v\beta_3$ der dominierende Oberflächenrezeptor im Gegensatz zu EC der Kapillaren des Herzens oder der Lunge, die $\alpha_v\beta_3$ nicht exprimieren. In kernhaltigen Zellen kann die Integrinexpression durch Zytokine und peptiderge Wachstumsfaktoren wie TGF- β oder PDGF stimuliert werden (Byzova et al., 1998; Kim und Yamada, 1997). Bisher ist wenig bekannt über die Regulation der Integrin-Expression in SMC. Ein Mechanismus zur Kontrolle der Rezeptorexpression von Integrinen auf der Zelloberfläche ist die koordinierte Synthese der monomeren Untereinheiten und deren Recycling (Kim und Yamada, 1997). Des weiteren könnte die Rezeptorexpression an der Membranoberfläche erhöht werden durch Externalisierung des innerhalb der Zelle befindlichen Anteils der Integrine.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der beiden Untereinheiten des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins auf hSMC separat durchflusszytometrisch untersucht, da die Biosynthese dieser Untereinheiten des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins separat reguliert wird (Horton, 1997). Dabei konnte eine Expression sowohl der α_v -Untereinheit als auch der β_3 -Untereinheit in einem geringen Expressionsniveau auf kultivierten hSMC beobachtet werden. Ebenso wurde ein niedriges Expressionsniveau für nicht aktivierte SMC großer Gefäße beschrieben (Byzova et al., 1998), wobei die Expression von $\alpha_v\beta_3$ auch in SMC in Abhängigkeit von der Herkunft stark zu variieren scheint (Liaw et al., 1995; Baron et al., 2000). Das Hämostaseprotein Thrombin hat einen Einfluß auf das Expressionsniveau von $\alpha_v\beta_3$. In EC von großen Gefäßen bewirkt Thrombin eine Hochregulation (Murphy et al., 1994) und in humanen aortalen SMC eine Steigerung der $\alpha_v\beta_3$ -Produktion (Brown et al., 1994). Eine potentielle Beeinflussung der Expression des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins durch das Hämostaseprotein und Akute-Phase-Protein Fibrinogen wurde in dieser Arbeit untersucht mit dem Ergebnis, daß das Expressionsniveau beider Untereinheiten auf hSMC unter Einfluß von Fibrinogen unverändert blieb. Ebenso induzierte PDGF, welches als Positivkontrolle dienen sollte, keine Hochregulation der Untereinheiten des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins. Dieser negative Befund widerspricht den bisherigen Beobachtungen zur Expressionsregulation von $\alpha_v\beta_3$, daß PDGF die Expression von $\alpha_v\beta_3$ in SMC von Kaninchen (Janat et al., 1992) und in intrasynovialen Beugesehnen-

Zellen stimuliert (Harwood et al., 1999). Dabei erfolgte der Nachweis nicht durch die Durchflußzytometrie, wodurch Unterschiede durch verschieden angewandte Methoden erklärbar wären. Zur Expressionsregulation von $\alpha_v\beta_3$ durch Fibrinogen existieren in der Literatur keine vergleichbaren Daten.

Zusammenfassend läßt sich keine Aussage darüber machen, ob Fibrinogen die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 oder $\alpha_v\beta_3$ beeinflusst, da die Positivkontrollen auch keinen Effekt zeigten im Gegensatz zu den Beschreibungen in der Literatur. Eine Ursache dafür könnte in der Untersuchungsmethode liegen, die evtl. nicht sensitiv genug ist. Für die durchflußzytometrische Untersuchung werden die Zellen vereinzelt und suspendiert. Die kultivierten hSMC hafteten zuvor während der Stimulation am Boden des Kulturgefäßes, so daß die Expression der Adhäsionsmoleküle im Zuge einer potentiellen Hochregulation nur an der freien Oberfläche erfolgt. Bei der Messung im Durchflußzytometer wird die Zelloberfläche der frei in Suspension befindlichen Zellen willkürlich detektiert und somit eine gering verstärkte Expression von Rezeptoren auf dem begrenzten Areal der Zelloberfläche möglicherweise nicht erkannt.

4.4 Klinische Bedeutung

In dieser Arbeit wurde erstmals eine gesteigerte DNA-Synthese und die Aktivierung mitogener Signalwege in kultivierten hSMC durch lösliches Fibrinogen demonstriert. *In vivo* stellt Fibrinogen als Plasmaprotein einen potentiellen systemischen Faktor dar, der die Proliferation von hSMC beeinflussen könnte. Unter physiologischen Bedingungen dürfte Fibrinogen keinen Effekt auf die Proliferation von hSMC haben, weil in gesunden Blutgefäßen erstens ein intaktes Endothel als Schutz dient, und zweitens der „kontraktile Phänotyp“ von hSMC vorkommt, der nicht auf Wachstumsfaktoren anspricht. Im Rahmen der endothelialen Dysfunktion, die bei der Atherosklerose auf dem Boden einer „Endothelverletzung“ entsteht, könnte es zur phänotypischen Differenzierung der kontraktilen hSMC zum „synthetischen Phänotyp“ kommen, den ein Verlust von kontraktilen Elementen, die verstärkte Synthese von Matrixproteinen und die Ansprechbarkeit auf Wachstumsfaktoren und Zytokine kennzeichnet. In diesem Zusammenhang ergibt sich aus den eigenen Befunden, daß intaktes, lösliches

Fibrinogen einen mitogenen Stimulus für hSMC in atherosklerotisch veränderten Gefäßen darstellt und somit das Plaquewachstum fördern könnte. Inwieweit Fibrinogen *in vivo* im Zusammenspiel vieler verschiedener Mediatoren im Rahmen der Atherogenese die Proliferation der hSMC beeinflusst, läßt sich derzeit nicht abschließend beantworten. Fibrinogen scheint in Anbetracht der derzeitigen Datenlage eine wichtige Bedeutung in allen atherosklerotischen Prozessen zu haben und könnte in vieler Hinsicht die Stabilität der atherosklerotischen Plaque beeinflussen. Die Bildung eines partiell oder vollständig okklusierenden intrakoronaren Thrombus im Bereich einer Plaquefissur ist die Hauptursache des akuten Koronar-Syndroms (Hoffmeister et al., 1998). Die vulnerable Plaque tritt bei fortgeschrittener Atherosklerose auf und ist gekennzeichnet durch einen hohen Lipidgehalt, zahlreiche inflammatorische Zellen und Mediatoren, eine im Vergleich zum umliegenden Gewebe reduzierten Gehalt an glatten Muskelzellen, einen verminderten Kollagengehalt und eine dünne fibröse Kappe (Waltenberger, 2001). Diese fibröse Deckplatte, bestehend aus fibrösem Bindegewebe und SMC, trennt den hochthrombogenen, lipid- und entzündungszellreichen Kern der Plaque vom Blutstrom und trägt somit wesentlich zur Stabilität der Plaque bei. Bei Ruptur der protektiven fibrösen Deckplatte entsteht die thrombogene instabile Plaque. Fibrinogen begünstigt als systemischer Faktor durch seine prothrombogene Eigenschaft den thrombotischen Gefäßverschluß. Ebenfalls beeinflusst Fibrinogen lokale Faktoren, die eine Thrombose bzw. die Destabilisierung der Plaque begünstigen. So wurde eine erhöhte Expression von ICAM-1 und von MCP-1 (Harley und Powell, 1999) auf EC durch Fibrinogen nachgewiesen, wodurch der Einwanderungsprozeß der Leukozyten in den subendothelialen Raum gefördert wird. Fibrin-Degradationsprodukte scheinen Monozyten zu aktivieren mit der Folge der Produktion von Zytokinen (IL-1, IL-6 und TNF α) (Vasse et al., 1996), die die Apoptose von SMC und konsekutiv eine Destabilisierung der Plaque induzieren (Geng et al., 1996). Aktivierte Monozyten produzieren vermehrt „Tissue factor“, wodurch es zur Thrombinaktivierung und somit zum Anstieg des Fibrins kommt, welches wiederum durch das Plasminsystem degradiert wird und folglich erneut Monozyten aktiviert werden (Vasse et al., 1996). Fibrinogen fördert die Lipidakkumulation, was zur Vergrößerung des Lipidpools führt und somit zur Rupturgefährdung beiträgt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Fibrinogen ist ein bedeutender, unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, welches zahlreiche prospektive epidemiologische Studien bestätigten. Ebenso scheint Fibrinogen assoziiert zu sein mit der Inzidenz von cerebralen Infarkten, der Progression der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) und letztlich mit der Gesamtmortalität. Fibrin(ogen) und seine Spaltprodukte bieten vielfache potentielle Pathomechanismen für das kardiovaskuläre Risiko, wie u.a. die Induktion der Mitogenese. Die Wirkung von intaktem Fibrinogen auf die Mitogenese humaner glatter Gefäßmuskelzellen (hSMC) wurde bisher nicht genau untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von löslichem Fibrinogen auf die DNA-Synthese und die mitogenen Signaltransduktionswege in kultivierten hSMC der V. saphena untersucht. 10 μ M Fibrinogen (physiologische Plasmakonzentration) induzierte die DNA-Synthese und die mitogene Signaltransduktion, wie die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK-1/2, Akt als Komponente des PI3-Kinase Signalweges, p38-MAPK und die Expression von c-Jun. Durch die Hemmung der Fibrinogen-induzierten DNA-Synthese nach Inhibition der MEK-1, der PI3-Kinase und der p70 S6-Kinase wurde eine wichtige Bedeutung des ERK-1/2 Signalweges und des PI3-Kinase Signalweges für die Fibrinogen-induzierte Mitogenese in hSMC bestätigt. Mittels blockierender Antikörper gegen das „Intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) und Blockade von $\alpha_v\beta_3$ durch Abciximab (Reopro®) wurde nachgewiesen, daß diese Fibrinogenrezeptoren als Mediatoren der Fibrinogen-induzierten DNA-Synthese ausscheiden. Ferner zeigte sich eine Involvierung von ICAM-1 in die Fibrinogen-induzierte p38-MAPK- und Akt-Aktivierung, wodurch vermutlich andere zelluläre Reaktionen als die Mitogenese der hSMC vermittelt werden. Hingegen hatte Abciximab keinen Einfluß auf die Fibrinogen-induzierten Signalwege, welches eine Beteiligung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vollständig ausschließen läßt. Die nachgewiesenen promitogenen Effekte von Fibrinogen auf hSMC könnten zu einer gesteigerten Proliferation dieser Zellen im Rahmen atherosklerotischer Prozesse beitragen.

Als weitere potentiell proatherogene Eigenschaft von Fibrinogen wurde die Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen beschrieben, die zur Rekrutierung von Leukozyten beitragen. Als wichtiges Akute-Phase-Protein kann die Synthese von Fibrinogen unter der Wirkung von Zytokinen, die ebenfalls die Expression von Adhäsionsmolekülen beeinflussen, gesteigert werden. In dieser Arbeit wurde die

Wirkung von Fibrinogen auf die Expression der Rezeptoren ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$ an der Zelloberfläche der hSMC untersucht. Dabei wurde für beide Fibrinogenrezeptoren basal ein geringes Expressionsniveau beobachtet. Allerdings hatte Fibrinogen auf die Expression von ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$ keine Effekte, was möglicherweise methodisch bedingt ist, z.B. durch eine zu geringe Sensitivität der vorhandenen Meßmethoden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr Biol* 1998; 8(2): 69-81.

Altieri DC, Duperray A, Plescia J, Thornton GB, Languino LR. Structural recognition of a novel fibrinogen gamma chain sequence (117-133) by intercellular adhesion molecule-1 mediates leukocyte-endothelium interaction. *J Biol Chem* 1995; 270(2): 696-699.

Altieri DC. Regulation of leukocyte-endothelium interaction by fibrinogen. *Thromb Haemost* 1999; 82(2): 781-786.

Ambrose JA, Weinrauch M. Thrombosis in ischemic heart disease. *Arch Intern Med* 1996; 156(13): 1382-1394.

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 1998; 50(2): 197-263.

Auger KR, Serunian LA, Soltoff SP, Libby P, Cantley LC. PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell* 1989; 57(1): 167-175.

Baron JH, Moiseeva EP, de Bono DP, Abrams KR, Gershlick AH. Inhibition of vascular smooth muscle cell adhesion and migration by c7E3 Fab (abciximab): a possible mechanism for influencing restenosis. *Cardiovasc Res* 2000; 48(3): 464-472.

Bauters C, Lablanche JM, McFadden EP, Hamon M, Bertrand ME. Relation of coronary angioscopic findings at coronary angioplasty to angiographic restenosis. *Circulation* 1995; 92: 2473-2479.

Bellas RE, Lee JS, Sonenshein GE. Expression of a constitutive NF-kappa B-like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995; 96(5): 2521-2527.

- Bini A, Fenoglio JJ, Mesa-Tejada R, Kudryk B, Kaplan KL: Identification and distribution of fibrinogen, fibrin and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis: use of monoclonal antibodies. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 109-121.
- Bishop GG, McPherson JA, Sanders JM, Hesselbacher SE, Feldman MJ, McNamara CA, Gimble LW, Powers ER, Mousa SA, Sarembock IJ. Selective alpha(v)beta(3)-receptor blockade reduces macrophage infiltration and restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* 2001; 103(14): 1906-1911.
- Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha(v)beta3 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med* 1998; 187(3): 329-339.
- Bornfeldt KE. Intracellular signaling in arterial smooth muscle migration versus proliferation. *Trends Cardiovasc Med* 1996; 6: 143-151.
- Bornfeldt KE, Krebs EG. Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal* 1999; 11(7): 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, Schrör K, Baumann G, Felix SB. Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 1999; 41(2): 395-401.
- Braun M, Pietsch P, Felix SB, Baumann G. Modulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 on human coronary smooth muscle cells by cytokines. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2571-2579.
- 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.
- Bretschneider E, Braun M, Fischer A, Wittpoth M, Glusa E, Schrör K. Factor Xa acts as a PDGF-independent mitogen in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 2000; 84: 499-505.

Bretschneider E, Kaufmann R, Braun M, Wittpoth M, Glusa E, Nowak G, Schrör K. Evidence for proteinase-activated receptor-2 (PAR-2)-mediated mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 1735-1740.

Bretschneider E, Wittpoth M, Weber AA, Glusa E, Schrör K. Activation of NFkappaB is essential but not sufficient to stimulate mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235(2): 365-368.

Broadhurst P, Kelleher C, Hughes L, Imeson JD, Raftery EB. Fibrinogen, factor VII clotting activity and coronary artery disease severity. *Atherosclerosis* 1990; 85(2-3): 169-173.

Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresch DA. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 1998; 92(3): 391-400.

Brown SL, Lundgren CH, Nordt T, Fujii S. Stimulation of migration of human aortic smooth muscle cells by vitronectin: implications for atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 1994; 28(12): 1815-1820.

Byzova TV, Rabbani R, D'Souza SE, Plow EF. Role of integrin alpha(v)beta3 in vascular biology. *Thromb Haemost* 1998; 80(5): 726-734.

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296(5573): 1655-1657.

Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84(7): 2068-2101.

Chen HC, Guan JL. Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(21): 10148-10152.

Cheresch DA. Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(18): 6471-6475.

Chiba R, Nakagawa N, Kurasawa K, Tanaka Y, Saito Y, Iwamoto I. Ligation of CD31 (PECAM-1) on endothelial cells increases adhesive function of alphavbeta3 integrin and

enhances beta1 integrin-mediated adhesion of eosinophils to endothelial cells. *Blood* 1999; 94(4): 1319-1329.

Choi ET, Engel L, Callow AD, Sun S, Trachtenberg J, Santoro S, Ryan US. Inhibition of neointimal hyperplasia by blocking alpha V beta 3 integrin with a small peptide antagonist GpenGRGDSPCA. *J Vasc Surg* 1994; 19(1): 125-134.

Claesson-Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem* 1994; 269(51): 32023-32026.

Couffinhal T, Duplaa C, Labat L, Lamaziere JM, Moreau C, Printseva O, Bonnet J. Tumor necrosis factor-alpha stimulates ICAM-1 expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1993; 13(3): 407-414.

Couffinhal T, Duplaa C, Moreau C, Lamaziere JM, Bonnet J. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74(2): 225-234.

Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA*. 1998; 279(18): 1477-82.

Davenpeck KL, Marcinkiewicz C, Wang D, Niculescu R, Shi Y, Martin JL, Zalewski. Regional differences in integrin expression: role of alpha(5)beta(1) in regulating smooth muscle cell functions. *Circ Res* 2001; 88(3): 352-358.

De Maat MPM, Kastelein JJP, Jukema JW, Zwinderman AH, Jansen H, Groenemeier B, Bruschke ASVG, Kluft C (REGRESS Group). -455G/A polymorphism of the β -fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men. Proposed role of an acute-phase reaction pattern of fibrinogen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 265-271.

Dickfeld T, Lengyel E, May AE, Massberg S, Brand K, Page S, Thielen C, Langenbrink K, Gawaz M. Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via a p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis. *Cardiovasc Res* 2001; 49(1): 189-199.

Doolittle RF. Fibrinogen and fibrin. *Annu Rev Biochem* 1984; 53: 195-229.

Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10(2): 262-267.

Duperray A, Languino LR, Plescia J, McDowall A, Hogg N, Craig AG, Berendt AR, Altieri DC. Molecular identification of a novel fibrinogen binding site on the first domain of ICAM-1 regulating leukocyte-endothelium bridging. *J Biol Chem* 1997; 272(1): 435-441.

Eliceiri BP. Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ Res* 2001; 89(12): 1104-1110.

Ernst E, Resch KL: Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of literature. *Ann Intern Med* 1993, 118: 956-963.

Etienne S, Adamson P, Greenwood J, Strosberg AD, Cazaubon S, Couraud PO. ICAM-1 signaling pathways associated with Rho activation in microvascular brain endothelial cells. *J Immunol* 1998; 161(10): 5755-5761.

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.

Ferns GAA, Avades TY. The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models. *J Exp Path* 2000; 81: 63-88.

Force T, Bonventre JV. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* 1998; 31: 152-161

Gao F, Yue TL, Shi DW, Christopher TA, Lopez BL, Ohlstein EH, Barone FC, Ma XL. p38 MAPK inhibition reduces myocardial reperfusion injury via inhibition of endothelial adhesion molecule expression and blockade of PMN accumulation. *Cardiovasc Res* 2002; 53(2): 414-422.

Gardiner EE, D'Souza SE. A mitogenic action for fibrinogen mediated through intercellular adhesion molecule-1. *J Biol Chem* 1997; 272(24): 15474-15480.

- Gardiner EE, D'Souza SE. Sequences within fibrinogen and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) modulate signals required for mitogenesis. *J Biol Chem* 1999; 274(17): 11930-11936.
- Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16(1): 19-27.
- Gennaro G, Menard C, Giasson E, Michaud SE, Palasis M, Meloche S, Rivard A. Role of p44/p42 MAP kinase in the age-dependent increase in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(2): 204-210.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285(5430): 1028-1032.
- Goncharova EA, Ammit AJ, Irani C, Carroll RG, Eszterhas AJ, Panettieri RA, Krymskaya VP. PI3K is required for proliferation and migration of human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283(2): L354-363.
- Gray AJ, Park PW, Broekelmann TJ, Laurent GJ, Reeves JT, Stenmark KR, Mecham RP. The mitogenic effects of the B beta chain of fibrinogen are mediated through cell surface calreticulin. *J Biol Chem* 1995; 270(44): 26602-26606.
- Harley SL, Powell JT. Fibrinogen up-regulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human saphenous vein endothelial cells. *Biochem J* 1999; 341(3): 739-744.
- Harley SL, Sturge J, Powell JT. Regulation by fibrinogen and its products of intercellular adhesion molecule-1 expression in human saphenous vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(3): 652-658.
- Harwood FL, Goomer RS, Gelberman RH, Silva MJ, Amiel D. Regulation of alpha(v)beta3 and alpha5beta1 integrin receptors by basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-BB in intrasynovial flexor tendon cells. *Wound Repair Regen* 1999; 7(5): 381-388.
- Hedges JC, Dechert MA, Yamboliev IA, Martin JL, Hickey E, Weber LA, Gerthoffer WT. A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J Biol Chem* 1999; 274(34): 24211-24219.

- Hemmings BA. Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. *Science* 1997; 275(5300): 628-630.
- Héron A, Lévesque JP, Hatzfeld A, Kisselev S, Monier MN, Krief P, Hatzfeld J. Mitogenic effect of fibrinogen on hematopoietic cells: involvement of two distinct specific receptors, MFR and ICAM-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246(1): 231-237.
- Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G. Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 741-746.
- Hicks RC, Golledge J, Mir-Hasseine R, Powell JT. Vasoactive effects of fibrinogen on saphenous vein. *Nature* 1996; 379(6568): 818-820.
- Hishikawa K, Oemar BS, Yang Z, Luscher TF. Pulsatile stretch stimulates superoxide production and activates nuclear factor-kappa B in human coronary smooth muscle. *Circ Res* 1997; 81(5): 797-803.
- Hoffmeister HM, Helber U, Seipel L. Inflammation und Plaqueinstabilität. *Z Kardiol* 1998; 87 Suppl. 2: 20-25.
- Horton MA. The alpha v beta 3 integrin „vitronectin receptor“. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(5): 721-725.
- Hoshi S, Goto M, Koyama N, Nomoto K, Tanaka H. Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation by nuclear factor-kappaB and its inhibitor, I-kappaB. *J Biol Chem* 2000; 275(2): 883-889.
- Hoshiga M, Alpers CE, Smith LL, Giachelli CM, Schwartz SM. Alpha-v beta-3 integrin expression in normal and atherosclerotic artery. *Circ Res* 1995; 77(6): 1129-1135.
- Hu Y, Cheng L, Hochleitner BW, Xu Q. Activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/JNK) and AP-1 transcription factor in rat carotid arteries after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(11): 2808-2816.
- Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(9): 1379-1386.

- Ikari Y, Yee KO, Hatsukami TS, Schwartz SM. Human carotid artery smooth muscle cells rarely express $\alpha(v)\beta_3$ integrin at sites of recent plaque rupture. *Thromb Haemost* 2000; 84(2): 338-344.
- Ishida T, Tanaka K. Effects of fibrin and fibrinogen-degradation products on the growth of rabbit aortic smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis* 1982; 44(2): 161-174.
- Itoh H, Nelson PR, Mureebe L, Horowitz A, Kent KC. The role of integrins in saphenous vein vascular smooth muscle cell migration. *J Vasc Surg* 1997; 25(6): 1061-1069.
- Janat MF, Argraves WS, Liao G. Regulation of vascular smooth muscle cell integrin expression by transforming growth factor β_1 and by platelet-derived growth factor-BB. *J Cell Physiol* 1992; 151(3): 588-595.
- Jang IK, Lassila R, Fuster V. Atherogenesis and inflammation. *Eur Heart J* 1993; 14 Suppl. K: 2-6.
- Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24(7): 1591-1601.
- Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1993; 120(3): 577-585.
- Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'agostino RB. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease: The Framingham Study. *JAMA* 1987; 258: 1183-1186.
- Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(2): 240-246.
- Khachigian LM, Fahmy RG, Zhang G, Bobryshev YV, Kaniaros A. c-Jun regulates vascular smooth muscle cell growth and neointima formation after arterial injury. Inhibition by a novel DNA enzyme targeting c-Jun. *J Biol Chem* 2002; 277(25): 22985-22991.
- Kim LT, Yamada KM. The regulation of expression of integrin receptors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214(2): 123-131.

Kovary K, Bravo R. The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1991; 11(9): 4466-4472.

Krymskaya VP, Penn RB, Orsini MJ, Scott PH, Plevin RJ, Walker TR, Eszterhas AJ, Amrani Y, Chilvers ER, Panettieri RA Jr. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates mitogen-induced human airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol* 1999; 277(1 Pt 1): L65-78.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81(2): 807-869.

Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

Languino LR, Duperray A, Joganic KJ, Fornaro M, Thornton GB, Altieri DC. Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(5): 1505-1509.

Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, Altieri DC. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* 1993; 73(7): 1423-1434.

Laprise P, Chailier P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ, Rivard N. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 2002; 277(10): 8226-8234.

Lawson C, Ainsworth M, Yacoub M, Rose M. Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor-kappaB-independent mechanism. *J Immunol* 1999; 162(5): 2990-2996.

Lawson C, Ainsworth ME, McCormack AM, Yacoub M, Rose ML. Effects of cross-linking ICAM-1 on the surface of human vascular smooth muscle cells: induction of VCAM-1 but no proliferation. *Cardiovasc Res* 2001; 50(3): 547-555.

Lee AJ, Fowkes FGR, Lowe GDO, Connor JM, Rumley A. Fibrinogen, Factor VII and PAI-1 genotypes and the risk of coronary and peripheral atherosclerosis. Edinburgh artery study. *Thromb Haemost* 1999; 81: 553-560.

Lee JH, Johnson PR, Roth M, Hunt NH, Black JL. ERK activation and mitogenesis in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280(5): L1019-1029.

Lefkowitz RJ, Willerson JT. Prospects for cardiovascular research. *JAMA* 2001; 285: 581-587.

Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122(5): 1079-1088.

Lévesque JP, Hatzfeld A, Hatzfeld J. Fibrinogen mitogenic effect on hemopoietic cell lines: control via receptor modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(17): 6494-6498.

Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresch DA, Schwartz SM, Giachelli CM. The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest* 1995; 95(2): 713-724.

Liu X, Piela-Smith TH. Fibrin(ogen)-induced expression of ICAM-1 and chemokines in human synovial fibroblasts. *J Immunol* 2000; 165(9): 5255-5261.

Lowe GD, Drummond MM, Lorimer AR, Hutton I, Forbes CD, Prentice CR, Barbenel JC. Relation between extent of coronary artery disease and blood viscosity. *Br Med J* 1980; 280(6215): 673-674.

Marshall CJ. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4(1): 82-89.

Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, Haines AP, Stirling Y, Imeson JD, Thompson SG. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 1986; 2(8506): 533-537.

Meade TW, North WR, Chakrabarti R, Stirling Y, Haines AP, Thompson SG, Brozovic M. Haemostatic function and cardiovascular death: early results of a prospective study. *Lancet* 1980; 1(8177): 1050-1054.

Montalescot G, Ankri A, Vicaute E, Drobinski G, Grosgeat Y, Thomas D. Fibrinogen after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis. *Circulation* 1995; 92(1): 31-38.

Montalescot G, Collet JP, Choussat R, Thomas D. Fibrinogen as a risk factor for coronary heart disease. *Eur Heart J* 1998; 19 (Suppl. H): H11-H17.

Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin polymerization: appraisal of the binding events that accompany fibrin generation and fibrin clot assembly. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997; 8(5): 257-267.

Murphy JF, Bordet JC, Wyler B, Rissoan MC, Chomarat P, Defrance T, Miossec P, McGregor JL. The vitronectin receptor (alpha v beta 3) is implicated, in cooperation with P-selectin and platelet-activating factor, in the adhesion of monocytes to activated endothelial cells. *Biochem J* 1994; 304 (Pt 2): 537-542.

Nakajima T, Kitajima I, Shin H, Takasaki I, Shigeta K, Abeyama K, Yamashita Y, Tokioka T, Soejima Y, Maruyama I. Involvement of NF-kappa B activation in thrombin-induced human vascular smooth muscle cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204(2): 950-958.

O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 1996; 93(4): 672-682.

Orsini MJ, Krymskaya VP, Eszterhas AJ, Benovic JL, Panettieri RA Jr, Penn RB. MAPK superfamily activation in human airway smooth muscle: mitogenesis requires prolonged p42/p44 activation. *Am J Physiol* 1999; 277(3 Pt 1): L479-488.

Owens GK, Vernon SM, Madsen CS. Molecular regulation of smooth muscle cell differentiation. *J Hypertens* 1996 Suppl.; 14(5): S55-64.

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999; 401(6748): 82-85.

Page K, Hershenson MB. Mitogen-activated signaling and cell cycle regulation in airway smooth muscle. *Front Biosci* 2000; 5: D258-267.

Piali L, Hammel P, Uhrek C, Bachmann F, Gisler RH, Dunon D, Imhof BA. CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol* 1995; 130(2): 451-460.

Pluskota E, D'Souza SE. Fibrinogen interactions with ICAM-1 (CD54) regulate endothelial cell survival. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4693-4704.

Printseva OYu, Peclo MM, Gown AM. Various cell types in human atherosclerotic lesions express ICAM-1. Further immunocytochemical and immunochemical studies employing monoclonal antibody 10F3. *Am J Pathol* 1992; 140(4): 889-896.

Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* 1998; 279(5351): 707-710.

Pulverer, BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, and Woodgett JR. Phosphorylation of c-Jun mediated by MAP kinases. *Nature* 1991; 353 (6345): 670-674.

Qi J, Kreutzer DL, Piela-Smith TH. Fibrin induction of ICAM-1 expression in human vascular endothelial cells. *J Immunol* 1997; 158(4): 1880-1886.

Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993; 69(1 Suppl): S30-7.

Rao GN, Runge MS. Cyclic AMP inhibition of thrombin-induced growth in vascular smooth muscle cells correlates with decreased JNK1 activity and c-Jun expression. *J Biol Chem* 1996; 271(34): 20805-20810.

Rauch BH, Weber A, Braun M, Zimmermann N, Schrör K. PDGF-induced Akt phosphorylation does not activate NF-kappa B in human vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *FEBS Lett* 2000; 481(1): 3-7.

Renda G, Rocca B, Crocchiolo R, Cristofaro RD, Landolfi R. Effect of fibrinogen concentration and platelet count on the inhibitory effect of abciximab and tirofiban. *Thromb Haemost* 2003; 89(2): 348-354.

Rolfe BE, Muddiman JD, Smith NJ, Campbell GR, Campbell JH. ICAM-1 expression by vascular smooth muscle cells is phenotype-dependent. *Atherosclerosis* 2000; 149(1): 99-110.

Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 1999; 401(6748): 86-90.

- Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2): 115-126.
- Ross R. Growth factors in the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Scand* 1987 Suppl.; 715: 33-38.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362(6423): 801-809.
- Rubel C, Gomez S, Fernandez GC, Isturiz MA, Caamano J, Palermo MS. Fibrinogen-CD11b/CD18 interaction activates the NF-kappaB pathway and delays apoptosis in human neutrophils. *Eur J Immunol* 2003; 33(5): 1429-1438.
- Sajid M, Stouffer GA. The role of alpha(v)beta3 integrins in vascular healing. *Thromb Haemost* 2002; 87(2): 187-193.
- Sanchez-Pernaute O, Lopez-Armada MJ, Calvo E, Diez-Ortego I, Largo R, Egido J, Herrero-Beaumont G. Fibrin generated in the synovial fluid activates intimal cells from their apical surface: a sequential morphological study in antigen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2003; 42(1): 19-25.
- Sano H, Nakagawa N, Chiba R, Kurasawa K, Saito Y, Iwamoto I. Cross-linking of intercellular adhesion molecule-1 induces interleukin-8 and RANTES production through the activation of MAP kinases in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250(3): 694-698.
- Scarabin PY, Arveiler D, Amouyel P, Santos CD, Evans A, Luc G, Ferrieres J, Juhan-Vague I. Plasma fibrinogen explains much of the difference in risk of coronary heart disease between France and Northern Ireland. The PRIME study. *Atherosclerosis* 2003; 166(1): 103-109.
- Schrör K. Abciximab - Erstes klinisch eingeführtes Antiintegrin zur Hemmung der Thrombozytenaggregation. Dr. Schrör Verlag, Frechen 2000.
- Schrör K. Antiintegrine - neue Plättchenfunktionshemmer zur Therapie und Prävention des akuten Koronarsyndroms. *Wien Klin Wochenschr* 1999; 111(3): 90-97.
- Schrör K. Pathophysiologie der Thrombozytenaktivierung und Pharmakologie der GPIIb/IIIa-Inhibitoren. *Herz* 2001; 26 (Suppl. I): 30-35.

- Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 549-599.
- Selheim F, Holmsen H, Vassboth FS. PI3-Kinase signalling in platelets: the significance of synergistic, autocrine stimulation. *Platelets* 2000; 11(2): 69-82.
- Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* 1997; 100(1): 1-5.
- Shigematsu K., Koyama H., Olson N.E., Cho A., Reidy M.A. Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling is important for smooth muscle cell replication after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2373-2378.
- Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 2002; 90(12): 1243-1250.
- Sitrin RG, Pan PM, Srikanth S, Todd RF. Fibrinogen activates NF-kappa B transcription factors in mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1998; 161(3): 1462-1470.
- Smith EB, Thompson WD, Crosbie L, Stirk CM. Fibrinogen/fibrin in atherogenesis. *Eur J Epidemiol* 1992; 8 Suppl. 1: 83-87.
- Smith EB. Fibrinogen and atherosclerosis. *Wien Klin Wochenschr* 1993; 105(15): 417-424.
- Smith JW, Piotrowicz RS, Mathis D. A mechanism for divalent cation regulation of beta 3-integrins. *J Biol Chem* 1994; 269(2): 960-967.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.
- Sraer JD, Kanfer A, Rondeau E, Peraldi MN. Mechanisms of glomerular injury: overview and relation with hemostasis. *Ren Fail* 1993; 15(3): 343-348.
- Stone MC, Thorp JM. Plasma fibrinogen--a major coronary risk factor. *J R Coll Gen Pract* 1985; 35(281): 565-569.

- Tam SH, Sassoli PM, Jordan RE, Nakada MT. Abciximab (ReoPro, chimeric 7E3 Fab) demonstrates equivalent affinity and functional blockade of glycoprotein IIb/IIIa and alpha(v)beta3 integrins. *Circulation* 1998; 98(11): 1085-1091.
- Thyberg J, Nilsson J, Palmberg L, Sjolund M. Adult human arterial smooth muscle cells in primary culture. Modulation from contractile to synthetic phenotype. *Cell Tissue Res* 1985; 239(1): 69-74.
- Tibbles LA, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(10): 1230-1254.
- Toker A. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol Pharmacol* 2000; 57(4): 652-658.
- Tsakadze NL, Zhendong Zhao, D'Souza SE. Interactions of Intercellular Adhesion Molecule-1 with Fibrinogen. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 101-108.
- Van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 1996; 74(1): 13-33.
- Vasse M, Paysant J, Soria J, Collet JP, Vannier JP, Soria C. Regulation of fibrinogen biosynthesis by cytokines, consequences on the vascular risk. *Haemostasis* 1996; 26 Suppl. 4: 331-339.
- Waltenberger J. Pathophysiologische Grundlagen der instabilen Koronarsyndrome. *Herz* 2001; 26 Suppl. 1: 2-8.
- Wang Q, Doerschuk CM. The p38 mitogen-activated protein kinase mediates cytoskeletal remodeling in pulmonary microvascular endothelial cells upon intracellular adhesion molecule-1 ligation. *J Immunol* 2001; 166(11): 6877-6884.
- Weber AA, Schrör K. The significance of platelet-derived growth factors for proliferation of vascular smooth muscle cells. *Platelets* 1999; 10: 77-96.
- Wilhelmsen L, Svardsudd K, Korsan-Bengsten K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl. J Med* 1984; 311: 501-505.

Xi S-P, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Central role of MAPK pathway in angII-mediated synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 73-82.

Yamaguchi H, Igarashi M, Hirata A, Susa S, Ohnuma H, Tominaga M, Daimon M, Kato T. Platelet-derived growth factor BB-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation causes cell growth, but not apoptosis, in vascular smooth muscle cells. *Endocr J* 2001; 48(4): 433-442.

Yarnell JWG, Baker IA, Sweetnam PM, Bainton D, O'Brien JR, Whitehead PJ, Elwood PC. Fibrinogen, viscosity and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease: the Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. *Circulation* 1991; 83: 836-844.

Yasukawa H, Imaizumi T, Matsuoka H, Nakashima A, Morimatsu M. Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury by antibodies to intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1. *Circulation* 1997; 95(6): 1515-1522.

Zhan Y, Kim S, Izumi Y, Izumiya Y, Nakao T, Miyazaki H, Iwao H. Role of JNK, p38, and ERK in Platelet-Derived Growth Factor-Induced Vascular Proliferation, Migration, and Gene Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(5): 795-801.

Zhao M, Liu Y, Bao M, Kato Y, Han J, Eaton JW. Vascular smooth muscle cell proliferation requires both p38 and BMK1 MAP kinases. *Arch Biochem Biophys* 2002; 400(2): 199-207.

7. VERÖFFENTLICHUNGEN

Kurzartikel (Abstracts) für Tagungen und Kongresse

Braun M, Müschenborn B, Schrör K

Mitogener Effekt von Fibrinogen auf humane glatte Gefäßmuskelzellen.

66. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung, 27-29. April 2000, Mannheim.

8. DANKSAGUNG

Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit, sowie insbesondere für die intensive Betreuung und Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Besonderer Dank geht an die Forschungsgruppe Herz-Kreislauf e.V. für die finanzielle Unterstützung.

Dr. Marina Braun danke ich für die Betreuung der Arbeit und für die hilfreichen Gespräche.

Dr. Aron Weber danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft, zahlreiche wertvolle Ratschläge und Unterstützung in jeglicher Weise.

Dr. Jutta Meyer-Kirchrath danke ich für hilfreiche Gespräche und Ratschläge.

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

Bei Dr. Hafner bedanke ich mich für die geduldige Beratung in statistischen Fragen.

Herzlicher Dank geht an Erika Lohmann und Karin Montag für ihre stete Hilfsbereitschaft und die prompte Erledigung von organisatorischen Angelegenheiten.

Petra Kuger danke ich für ihre fachliche Unterstützung in experimentellen und computer-technischen Fragen.

Bei Beate Weyrauther bedanke ich mich recht herzlich für die tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur, sowie in experimentellen Fragen.

Kerstin Freidel und Irmhild Rüter danke ich für die Unterstützung in labor-technischen Fragen.

Recht herzlicher Dank geht auch an alle nicht gesondert aufgeführten Mitarbeiter des Instituts für Pharmakologie für die Kollegialität und die ausgesprochen freundliche Arbeitsatmosphäre.

9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Düsseldorf, den

10. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Birgit Müschenborn Am Weyersberg 80
 40627 Düsseldorf
 geboren am 04.05.1970 in Düsseldorf

Schulbildung

1976 - 1980 Grundschule in Düsseldorf-Unterbach
 1980 - 1989 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium in Hilden
 05/1989 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung

1989 - 1991 Rheinische Akademie e.V. in Köln
 07/1991 Abschluß als Biologisch-technische Assistentin

Berufstätigkeit

09/1991 - 03/1992 BTA bei Dr. med. Stolle/ Dr. med. Nemes,
 Medizinisch-Diagnostische Laboratorien, Düsseldorf
 08/1992 - 09/1992 Aushilfstätigkeit in der Abteilung für Innere Medizin
 im St. Joseph-Krankenhaus, Hilden
 10/1992 - 10/1993 Tätigkeit als Medizinische Dokumentationsassistentin
 in der Abteilung Arzneimittelsicherheit
 der Schwarz Pharma AG, Monheim

Praktika:

04/1992 - 05/1992 Krankenpflegepraktikum in der chirurgischen Abteilung
 im Krankenhaus Gerresheim, Düsseldorf

Hochschulstudium

10/1993 - 05/2001	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
05/2001	3. Staatsexamen
04/2000 - 03/2001	Praktisches Jahr: <i>Wahlfach: Gynäkologie und Geburtshilfe</i> bei Prof. Dr. med. Rüttgers in der Frauenklinik der Kliniken St. Antonius, Wuppertal-Elberfeld <i>Chirurgie</i> im Masterton Hospital, Masterton (Neuseeland) <i>Innere Medizin (Geriatric)</i> bei Prof. Dr. med. Füsgen im Elisabeth-Krankenhaus der Kliniken St. Antonius, Velbert-Neviges
10/1998 - 09/1999, 06/2001 - 10/2001 und 11/2002 - 05/2003	Dissertation: Tätigkeit im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, im Rahmen der Promotionsarbeit bei Herrn Prof. Dr. med. Schrör
10/2001 - 10/2002	Ärztin im Praktikum: Beschäftigung als ÄIP bei Dr. med. Schulz/ Dr. med. Scheuble/ Dr. med. Brauksiepe, Abteilung für Innere Medizin des Evangelischen Krankenhauses, Mettmann
seit 07/2003	Beschäftigung als ÄIP bzw. Assistenzärztin bei Dr. med. Linde, Abteilung für Anästhesie des Evangelischen Krankenhauses, Mettmann

Effekte von Fibrinogen auf die Mitogenese und Signaltransduktion humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Fibrinogen ist ein bedeutender, unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, welches zahlreiche prospektive epidemiologische Studien bestätigten. Fibrin(ogen) und seine Spaltprodukte bieten vielfache potentielle Pathomechanismen für das kardiovaskuläre Risiko, wie u.a. die Induktion der Mitogenese. Die Wirkung von intaktem Fibrinogen auf die Mitogenese humaner glatter Gefäßmuskelzellen (hSMC) wurde bisher nicht genau untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von löslichem Fibrinogen auf die Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Synthese mittels (^3H)-Thymidin-Inkorporation und die mitogenen Signaltransduktionswege mittels „Western Blot“ in kultivierten hSMC der V. saphena untersucht. 10 μM Fibrinogen (physiologische Plasmakonzentration) induzierte die DNA-Synthese und die mitogene Signaltransduktion, wie die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK(extrazellulär regulierte Kinasen)-1/2, Akt als Komponente des Phosphoinositol-3(PI3)-Kinase Signalweges, p38-MAPK und die Expression von c-Jun. Durch die Hemmung der Fibrinogen-induzierten DNA-Synthese nach Inhibition der MAP/ERK-Kinase-1 (MEK-1), der PI3-Kinase und der p70 S6-Kinase wurde eine wichtige Bedeutung des ERK-1/2 Signalweges und des PI3-Kinase Signalweges für die Fibrinogen-induzierte Mitogenese in hSMC bestätigt. Mittels blockierender Antikörper gegen das „Intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) und Blockade des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins durch Abciximab (Reopro®) wurde nachgewiesen, daß diese Fibrinogenrezeptoren als Mediatoren der Fibrinogen-induzierten DNA-Synthese ausscheiden. Ferner zeigte sich eine Involvierung von ICAM-1 in die Fibrinogen-induzierte p38-MAPK- und Akt-Aktivierung, wodurch vermutlich andere zelluläre Reaktionen als die Mitogenese der hSMC vermittelt werden. Die nachgewiesenen promitogenen Effekte von Fibrinogen auf hSMC könnten zu einer gesteigerten Proliferation dieser Zellen im Rahmen atherosklerotischer Prozesse beitragen. Als weitere potentiell proatherogene Eigenschaft von Fibrinogen wurde die Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen beschrieben, die zur Rekrutierung von Leukozyten beitragen. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Fibrinogen auf die Expression der Rezeptoren ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$ an der Zelloberfläche der hSMC durchflußzytometrisch untersucht. Dabei wurde für beide Fibrinogenrezeptoren basal ein geringes Expressionsniveau beobachtet. Allerdings hatte Fibrinogen auf die Expression von ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$ keine Effekte, was möglicherweise methodisch bedingt ist, z.B. durch eine zu geringe Sensitivität der vorhandenen Meßmethoden.

Düsseldorf, den 3.11.03


(Prof. Dr. K. Schrör)