

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Karsten Schrör

**Hemmung der Migration humaner glatter
Gefäßmuskelzellen durch das
Prostacyclin-Mimetikum Cicaprost –
Bedeutung der Phosphoinositol-3-Kinase und der
MAP-Kinase ERK-1/2**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Martin Wiebel

2004

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Artur-Aron Weber

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Tom-Philipp Zucker

Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Einleitung.....	3
1.1 Atherosklerose.....	5
1.2 Die Bedeutung glatter Muskelzellen für Atherosklerose und Restenose.....	6
1.3 Signaltransduktion in glatten Muskelzellen.....	8
1.3.1 Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF).....	8
1.3.2 Phosphoinositol-3-Kinase.....	9
1.3.3 MapK / ERK1/2.....	10
1.4 Prostacyclin.....	12
1.5 Fragestellungen.....	13
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Kultivierung humaner glatter Muskelzellen.....	14
2.2 Migrationsassay.....	14
2.3 Analyse von Proteinen durch Western Blot.....	15
2.3.1 Isolierung von Proteinen aus humanen glatten Muskelzellen.....	15
2.3.2 Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE).....	15
2.3.3 Transfer von Proteinen.....	15
2.3.4 Hybridisierung und Detektion von Proteinen.....	15
2.3.5 Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung.....	16
2.4 Lösungen und Puffer.....	16
2.4.1 Western-Lösungen.....	16
2.4.2 Kulturmedien.....	17
2.5 Antikörper.....	17
2.6 Andere Substanzen und Materialien.....	17
2.7 Statistik.....	17

3	Ergebnisse.....	18
3.1	Effekte von PDGF-BB auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen.....	18
3.2	Effekte der Signalkaskaden-Inhibitoren SB203580 und SB202190 auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen.....	19
3.3	Effekte von Curcumin auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen	21
3.4	Effekte des PKC-Inhibitors GF-109203X auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen.....	21
3.5	Effekte der Signalkaskaden-Inhibitoren LY294002 und Wortmannin auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen.....	22
3.6	Effekte von PD98059 auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen.....	24
3.7	Effekte von Rapamycin auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen.....	26
3.8	Effekte von Cicaprost auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen.....	26
3.9	Effekte von Forskolin und Trepidil auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen.....	28
3.10	Effekte von Ciacaprost auf die PDGF-BB induzierte Signaltransduktion humaner glatter Muskelzellen.....	29
4	Diskussion.....	31
5	Literaturverzeichnis.....	41
	Danksagungen.....	49
	Lebenslauf.....	50
	Zusammenfassung.....	52

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind in den hochindustrialisierten Ländern die häufigste Todesursache mit über 30 % der Todesfälle im Alter zwischen 35-65 Jahren. In höheren Altersgruppen steigt der Anteil der Todesfälle sogar auf 50 % (Roessner et al., 1997). Die drei wichtigsten Manifestationsformen der Atherosklerose sind der Herzinfarkt, der Hirninfarkt und die periphere arterielle Verschlusskrankheit. Die Atherosklerose entsteht auf der Basis einer inflammatorischen Reaktion (Ross et al., 1999; Newby, 2000). Leukozyten, zum größten Teil Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten, werden in atherosklerotischen Läsionen unterschiedlichen Schweregrades nachgewiesen. Die Risikofaktoren der Atherosklerose werden nach ihrer Signifikanz für das Fortschreiten der Krankheit in Risikofaktoren erster und zweiter Ordnung unterteilt. Risikofaktoren erster Ordnung sind die Hyperlipidämie, wobei hier dem erhöhten Low-Density-Lipoprotein (LDL) die größte Bedeutung zukommt, der arterielle Hypertonus, der Nikotinkonsum und der Diabetes mellitus. Zu den Risikofaktoren zweiter Ordnung zählen Adipositas, Hyperurikämie, Streß und Bewegungsmangel (Ross et al., 1993; Roessner et al., 1997). Eine positive Familienanamnese für Atherosklerose spielt auch eine nicht zu unterschätzende Rolle.

Ein initialer pathogenetischer Faktor für die Atherosklerose besteht in der Endotheldysfunktion, womit der Endothelschicht des Gefäßes eine Schlüsselrolle in der Atherogenese zukommt (Ross et al., 1993). Die oben genannten Risikofaktoren führen zu einer Schädigung des Endothels, was die gesteigerte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, wie E-Selektin, Intercellular-Adhesion-Molecule-1 (ICAM-1) und Vascular-Cell-Adhesion-Molecule-1 (VCAM-1) zur Folge hat (Kasper et al., 1995; Libby, 2000). Durch die gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen kommt es zu einer vermehrten Diapedese von Monozyten und T-Lymphozyten aus dem Blutstrom in die Intima des Gefäßes. Begünstigt durch die Endotheldysfunktion kommt es zu einem Lipoproteineinstrom in die Intima. LDL wird dort von Makrophagen internalisiert und es bilden sich die charakteristischen Schaumzellen. Die aktivierten Makrophagen sezernieren u.a. Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF), einen stark chemotaktisch und mitogen wirksamen Wachstumsfaktor, der für die Migration der Myozyten einen entscheidenden Stimulus darstellt (Heldin et al., 1999; Newby et al., 2000).

Physiologischerweise kommen glatte Muskelzellen in der Gefäßwand nur in der Tunica media vor, wo sie die Aufgabe der Regulation des Gefäßtonus übernehmen. Im atherosklerotisch veränderten Gefäß werden die glatten Muskelzellen durch PDGF zur Migration in die Intima stimuliert, wo sie an der Ausbildung der pathologischen Intimaverdickung beteiligt sind (Virmani et al., 2000).

Die Entwicklung der atherosklerotischen Läsion läßt sich morphologisch und nach ihrer pathologischen Potenz in verschiedene Schweregrade einteilen. Als erste feststellbare Gefäßveränderung läßt sich die Intimaverdickung durch Einwanderung von glatten Muskelzellen und deren Sekretion von Extrazellulärmatrix detektieren. Diese Veränderung ist meist voll reversibel (Virmani et al., 2000). Als nächste Entwicklungsstufe der Atherosklerose zeigt sich eine Akkumulation von Schaumzellen in der Intima, die als Xanthom oder „fatty streak“ bezeichnet wird (Ross, 1993). Die pathologische Intimaverdickung oder „intermediate lesion“ charakterisiert sich durch glatte Muskelzellen in proteoglykanreicher Extrazellulärmatrix mit extrazellulärer Lipidakkumulation (Virmani et al., 2000). Durch progrediente Einwirkung von Risikofaktoren entwickelt sich das Atherom mit fibröser Kappe oder „fibrous plaque“

mit einem nekrotischen Kern aus Debris und darüberliegender fibröser Kappe von unterschiedlicher Dicke (Virmani et al., 2000). Kommt es zu einer Ruptur des fibrösen Plaques entsteht durch die thrombogenen Eigenschaften der Oberfläche ein Thrombus mit konsekutiver Okklusion des Gefäßabschnittes. 50 % der Myokardinfarkte können auf einen thrombotischen Verschluss infolge der Ruptur eines Atheroms mit fibröser Kappe zurückgeführt werden (Ross et al., 1999).

Die nicht-chirurgische Behandlung der atherosklerotischen Gefäßstenose wurde 1964 von Dotter und Judkins eingeführt und in den siebziger Jahren von Grüntzig für die Dilatation von Koronarien modifiziert (Landau et al., 1994). Die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) wird heute in der Kardiologie bei Patienten mit stabiler Angina pectoris, instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt eingesetzt. Über die Arteria femoralis wird ein Führungskatheter bis vor die stenosierte Stelle vorgeschoben. Das große Lumen des Führungskatheters läßt nun das Vorbringen eines Ballonkatheters zu und durch wiederholtes Aufblasen des Ballons wird die stenosierte Stelle dilatiert (Landau et al., 1994). Trotz guter Erfolge dieser Methode stellt die Ausbildung von Restenosen nach Dilatation die wichtigste Komplikation dar. Eine 50 prozentige Wiederverengung der dilatierten Stelle definiert eine Restenose. Dies tritt in 30-60 % der Patienten innerhalb von sechs Monaten post PTCA auf (Landau et al., 1994).

Eine Methode das Risiko einer Restenose zu minimieren ist der Einsatz von Ballon-expandiblen Stents, die aus einem feinen scherengitterartigen Drahtgeflecht bestehen und an den Ort der Stenose, nach PTCA, implantiert werden (Farb et al., 1994; Surreys et al., 1994). Surreys et al. (1994) zeigten eine signifikante Reduktion der Restenoseausbildung nach PTCA durch den Einsatz von Stents bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit. Thrombusformation und inflammatorische Reaktion mit konsekutiver Neointimaformation machen jedoch auch die Stentimplantation zu einer nicht risikolosen Intervention, die ebenfalls zu einem Verschluss des Stent-gestützten Gefäßabschnittes führen kann (Farb et al., 1994).

1.2 Die Bedeutung von glatten Gefäßmuskelzellen für Atherosklerose und Restenose

Die Migration glatter Gefäßmuskelzellen ist essentiell verbunden mit der Entwicklung der Atherosklerose und der Ausbildung einer Restenose nach kardiologischen Interventionen wie der PTCA, der Stentimplantation und der chirurgischen Embolektomie (Ross et al., 1993; Hughes et al., 1996; Newby, 2000).

Nur vereinzelt findet man glatte Gefäßmuskelzellen unter physiologischen Bedingungen in der Intima des Gefäßes. Unter pathologischen Bedingungen jedoch, wie der Atherosklerose oder nach PTCA, zeigt sich eine vermehrte Migration der Myozyten in die Gefäßintima. Eine Schlüsselrolle als chemotaktisch wirksamer Wachstumsfaktor spielt das PDGF welches von allen Zellen, die an der Atherosklerose- und Restenoseentstehung nach PTCA beteiligt sind, sezerniert wird. Thrombozyten, Endothelzellen, aktivierte Makrophagen, T-Lymphozyten und glatte Muskelzellen sind in der Lage PDGF zu sezernieren (Ross et al., 1993). Differenzierte, kontraktile glatte Muskelzellen zeigen praktisch keine Proliferation außer zum Gewebeerhalt. Unter pathophysiologischen Bedingungen, nach einer PTCA oder Embolektomie, ist das Gefäß gedehnt, das Endothel zerstört und die Mehrzahl der Myozyten geschädigt (Clowes, 1999). Gleichzeitig ändern die Myozyten ihre physiologischen Reaktionen und beginnen vermehrt zu proliferieren und verstärkt Extrazellulärmatrix zu sezernieren. Die glatten Muskelzellen verlieren ihre Kontraktionsfähigkeit und bilden einen

sekretorischen Phänotyp aus. Es kommt zur Migration glatter Muskelzellen in die Intima, die dort verstärkt proliferieren und die Synthese von Extrazellulärmatrix steigern. Diese Vorgänge führen zur Manifestation der charakteristischen Neointima (Newby et al., 2000). Durch die gesteigerte Matrixproduktion kommt es in 30-50 % der Ballondilatationen nach 4-6 Monaten zu einer hämodynamisch relevanten Restenose. Neben PDGF spielen in der Entwicklung der Atherosklerose wahrscheinlich weitere Wachstumsfaktoren eine Rolle.

Transforming growth factor- β (TGF- β) wird hauptsächlich durch Thrombozyten, glatte Muskelzellen und Endothel sezerniert. Die biologischen Effekte des TGF- β sind vor allem die Produktion von Extrazellulärmatrix und die Induktion der Proliferation glatter Muskelzellen (Weber & Schrör, 1999). Hinweise zur Funktion von TGF- β bei der Atherosklerose oder Restenose rekrutieren sich hauptsächlich aus Tierexperimenten und zeigen eine Promotion der neointimalen Proliferation glatter Muskelzellen (Weber & Schrör, 1999). Libby (2000) berichtet über die Inhibition der Proliferation glatter Muskelzellen durch TGF- β . Diese unterschiedlichen Angaben über die Effekte von TGF- β auf die Proliferation glatter Muskelzellen resultiert am ehesten aus verschiedenen experimentellen Bedingungen in den einzelnen Arbeitsgruppen.

Epidermal Growth Factor (EGF) ist ein weiterer Wachstumsfaktor, der mit der Pathophysiologie der Atherosklerose/Restenose in Verbindung gebracht wird. Interessanterweise ist die EGF-induzierte DNA-Synthese in intimalen glatten Muskelzellen höher als in medialen glatten Muskelzellen und EGF wird von mechanisch alterierten glatten Muskelzellen verstärkt sezerniert (Weber & Schrör, 1999).

Ein weiteres Polypeptid unter den Wachstumsfaktoren ist der Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1). Sowohl IGF-1 als auch EGF werden als „inkomplette“ Mitogene bezeichnet, weil sie die DNA-Synthese stimulieren, jedoch keine Zelldivision induzieren. Ein „voller“ mitogener Effekt wurde beobachtet, wenn IGF-1 mit PDGF-AA kombiniert wurde (Weber & Schrör, 1999). Der Nachweis von IGF-1 in atherosklerotischen und restenotischen Läsionen zeigt eine mögliche Bedeutung des IGF-1 für beide pathophysiologischen Zustände (Weber & Schrör, 1999).

Es hat sich gezeigt, dass viele der durch die Mitogene evozierten Effekte abhängig sind von der Zielzelle und der Wirkkonzentration des jeweiligen Wachstumsfaktors. Dies erschwert eine eindeutige Zuordnung der Wirkungen und steigert die Komplexität der Interaktionsmöglichkeiten zwischen den verschiedenen Komponenten (Libby, 2000).

Zytokine sind neben den Wachstumsfaktoren wichtige Modulatoren der atherosklerotischen Veränderungen und hier ganz besonders als regulatorische Komponenten der inflammatorischen Reaktion innerhalb des histopathologischen Bildes der Atherosklerose/Restenose. Wichtige Vertreter sind Interleukin-1 (IL-1), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IF- γ) etc. deren explizite Rolle für die Atherosklerose bis heute nicht ausreichend geklärt ist (Ross, 1993). Die Freisetzung der Zytokine erfolgt hauptsächlich über die in die Gefäßwand eingewanderten Leukozyten. Der Prototyp unter den Zytokinen ist das IL-1. Es ist in der Lage, die Expression der PDGF-A-Kette in glatten Muskelzellen zu steigern und die erhöhte Expression von basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) zu induzieren (Libby, 2000). Dieses Beispiel zeigt die Möglichkeit der sekundären Expression von Wachstumsfaktoren durch Zytokine.

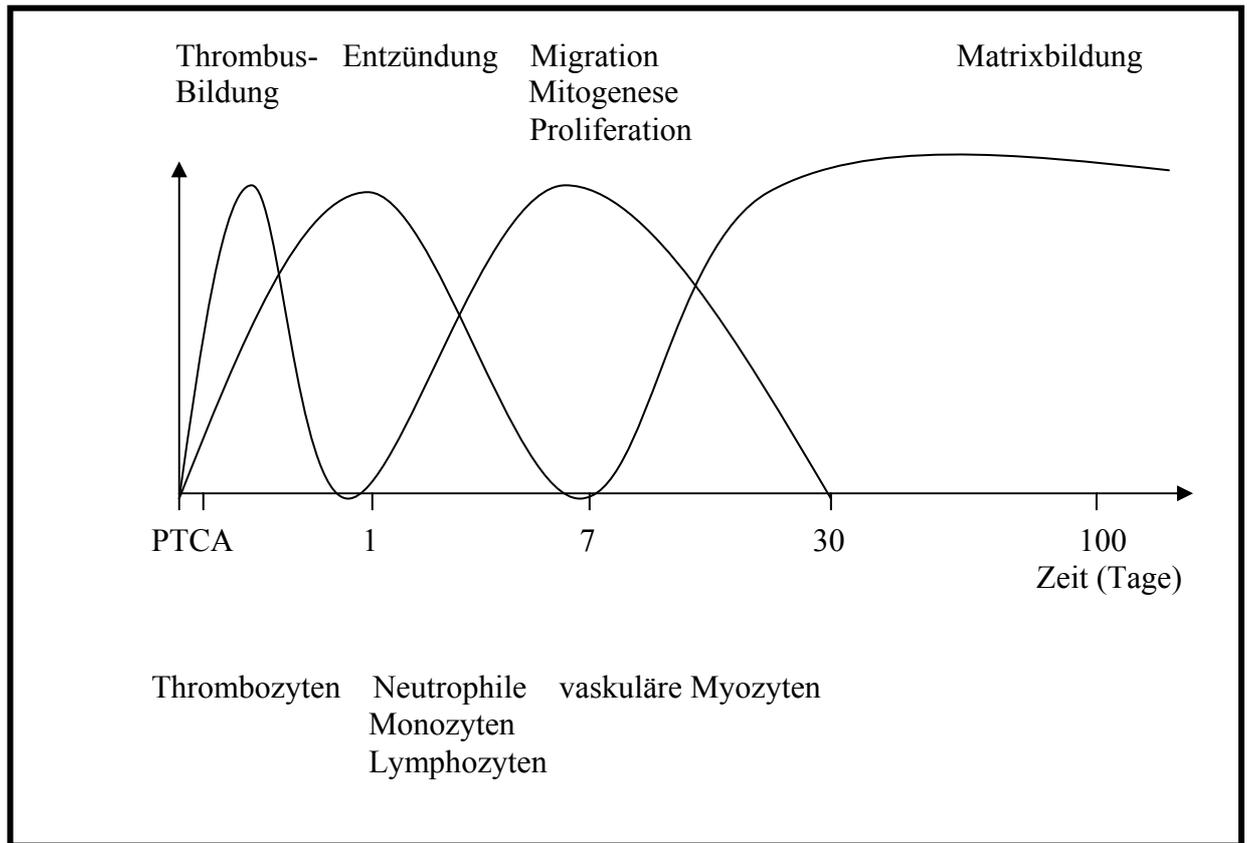


Abb. 1

Modell der Pathogenese der Restenose nach PTCA (modifiziert nach Nikol & Höfling, 1995) Die Abbildung zeigt in einem vereinfachten Schema die chronologischen Prozesse, die einer Restenose zugrunde liegen und die Beteiligung der verschiedenen Zellen an den jeweiligen Phasen der Restenoseausbildung. Die Migration glatter Muskelzellen erreicht um den siebten Tag ihr Maximum und durch die verstärkte Matrixbildung kommt es innerhalb der ersten Monate zur Ausbildung einer Restenose mit der Notwendigkeit eines erneuten Eingriffs.

1.3 Signaltransduktion in glatten Muskelzellen

1.3.1 Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF)

In dieser Arbeit wurde PDGF als promigratorischer Stimulus eingesetzt, da er in der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten eine Schlüsselrolle einnimmt (Abedi et al., 1995; Weber & Schrör, 1999). PDGF ist ein dimeres Molekül bestehend aus durch Disulfid-Brücken verbundene A- und B-Polypeptidketten, die als Homodimere (-AA, -BB) oder Heterodimer (-AB) vorkommen (Heldin et al., 1998). Der PDGF-Rezeptor ist ein typischer Vertreter der Tyrosinkinase-Rezeptoren und kommt in zwei Isoformen vor, dem α -Rezeptor und dem β -Rezeptor. Beide Rezeptoren haben fünf extrazelluläre Immunglobulin-Domänen und eine

intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne. Der β -Rezeptor bindet nur die B-Polypeptidkette von PDGF und ist wahrscheinlich wichtiger für die Migration der glatten Muskelzellen als der α -Rezeptor. Aufgrunddessen wurde in dieser Arbeit die Isoform PDGF-BB als Stimulus verwendet. Nach der Ligand-Bindung kommt es zu einer ligandeninduzierten Dimerisation des Rezeptors mit nachfolgender Autophosphorylierung der jeweiligen Kinasedomäne (Heldin et al., 1999). Nach der Autophosphorylierung binden über die SH2-Domäne Moleküle mit Kinaseaktivität, wie die PI-3-Kinase, an den Rezeptor und werden durch Phosphorylierung aktiviert (Matsumoto et al., 1999).

Über die intrazelluläre Signaltransduktion der Migration herrscht noch weitgehend Unklarheit und Uneinigkeit (Hughes et al., 1996; Heldin et al., 1998). Deshalb werden im folgenden Teil die zur Zeit am meisten diskutierten intrazellulären Signalkaskaden, die zur Zellmigration beitragen können, sowie deren Interaktionen untereinander, behandelt.

1.3.2 Phosphoinositol-3-Kinase (PI-3-K)

Die Mehrzahl der wissenschaftlichen Veröffentlichungen, die Zellmigration thematisieren, geht heute davon aus, dass die PI-3-K in der durch PDGF induzierten Migration glatter Muskelzellen eine bedeutende Rolle spielt (Hughes et al., 1996; Derman et al., 1997; Heldin et al., 1998; Bornfeld et al., 1999; Ai et al., 2001).

Die PI-3-Kinase gehört zu einer Familie von Enzymen, die in der Lage sind Phosphoinositide zu phosphorylieren. Sie besteht aus einem Komplex einer regulatorischen Untereinheit, p85, und einer katalytischen Untereinheit, p110. Einige Isoformen der PI-3-Kinase binden mit der p85 Untereinheit an den PDGF-Rezeptor und werden phosphoryliert (Anand-Apte et al., 1997). PI-3-Kinasen generieren spezifische Inositolphospholipide, die an ihren Zielproteinen durch eine Pleckstrin Homology-Domäne (PH-Domäne) erkannt werden (Vanhaesebroeck et al., 2000). Eines der wichtigsten Substrate der PI-3-Kinase ist die Proteinkinase Akt, die PDGF-BB induziert an den zwei Aminosäureresten Thr308 und Ser473 phosphoryliert wird (Vanhaesebroeck et al., 2000).

Inositol enthaltende Lipide bestehen aus einem Glycerolgerüst mit zwei Fettsäuren an den Positionen 1 und 2 und einer Inositol-1-Phosphat Gruppe an Position 3. Ohne weitere Phosphatgruppen wird das Lipid Phosphatidylinositol (PtdIns) genannt. Alle Hydroxygruppen (OH-Gruppen) des PtdIns-Rings können phosphoryliert werden. Ein phosphoryliertes Derivat der PtdIns wird Phosphoinositid (PI) genannt. Die PI-3-Kinase phosphoryliert die 3'-OH-Position des Inositolrings und es entstehen PtdIns-3-P, PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ (Chan et al., 1999).

Hughes et al. (1996) berichten über die Bedeutung der kleinen Guanosintriphosphat (GTP) -bindenden Proteine (GTPasen) Ras, Rac und Rho für die Veränderungen des Zytoskeletts in verschiedenen Zellen. So sind die kleinen GTPasen an der Aktin-Reorganisation beteiligt, die einen wichtigen Bestandteil der Migration darstellt. Der intrazelluläre Mechanismus der Aktin-Polymerisation ist ein wichtiger Bestandteil der Migration (Stossel et al., 1993), der an der der Zielrichtung zugewandten Seite der Zelle in deren Lamellen stattfindet. Durch den Aktinabbau an der abgewandten Seite der Zelle entsteht eine Netto-Bewegung in eine Richtung. Durnio et al. (1997) gehen ebenfalls davon aus, dass die kleinen GTPasen an den Zytoskelettveränderungen in Form von „Membran-Ruffling“, Aktin-Polymerisation und fokaler Adhäsion, beteiligt sind. Die Familie der Rho-Kinasen wird durch die PI-3-Kinase aktiviert. Derman et al. (1997) fanden Migration, induziert durch PIP₃, ein Produkt der PI-3-Kinase, das direkt die Proteinkinase C (PKC) aktiviert.

1.3.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase/ERK1/2)

Die MAP-Kinasen sind ubiquitär exprimierte Proteinkinasen, die durch extrazelluläre Stimuli, wie zum Beispiel PDGF, aktiviert werden. Nach der Stimulation durch PDGF kommt es zur Komplexbildung des Adaptermoleküls Grb2 mit dem Nukleotiddonator Sos1. Grb2 ist ein weiteres Molekül mit einer SH2-Domäne, das durch die Bindung an den PDGF-Rezeptor phosphoryliert wird (Heldin et al., 1998). Sos1 überführt Ras-Guanosindiphosphat (GDP) in die aktivierte Form Ras-GTP. Ras aktiviert Raf-1-Kinase, die erste Kinase in der MAP-Kinase-Kaskade. Raf phosphoryliert die MAP-Kinase-Kinase (MEK) und MEK aktiviert die Extracellular-Signal-Regulated-Kinase (ERK1/2). Diese steuert verschiedene Transkriptionsfaktoren (Elk-1, c-myc, c-fos), die wiederum die Genexpression regulieren (Takahashi et al., 1998; Lopez-Illasca et al., 1998).

Bisher ist die Rolle der MAP-Kinase ERK1/2 nur in der Proliferation glatter Muskelzellen etabliert (Weber & Schrör, 1999). Die Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 wird als „Motor“ der Zellproliferation und Zelldifferenzierung in glatten Gefäßmuskelzellen, induziert durch extrazelluläre Stimuli, angesehen (Takahashi & Berk, 1998). Dies wurde durch die signifikante Inhibition der Proliferation glatter Muskelzellen durch einen MEK-Inhibitor gezeigt.

Die Bedeutung der MAP-Kinase-Kaskade für die Migration von Myozyten jedoch wird kontrovers diskutiert (Graf et al., 1997; Anand-Apte et al., 1997). Graf et al. (1997) zeigten an glatten Muskelzellen die Bedeutung der MAP-Kinase-Kaskade in der durch PDGF-BB induzierten Migration. Die Zellmigration ist hier durch den spezifischen MEK1/2-Inhibitor PD98059 signifikant hemmbar. Heldin et al. (1998) beschreiben, dass die Beteiligung von Ras an der Migration möglicherweise über Interaktion mit der PI-3-Kinase abläuft und so ERK-1/2 keine Rolle spielt. Mögliche Gründe für die verschiedenen Ergebnisse der Forschungsgruppen sind in den unterschiedlichen Zellsystemen zu vermuten, die uneinheitlich auf Stimuli reagieren. Um den Bezug zu den pathologischen Verhältnissen der Atherosklerose im Menschen so eng wie möglich zu halten, wurden in dieser Arbeit humane glatte Gefäßmuskelzellen benutzt und deren Migrationsverhalten untersucht.

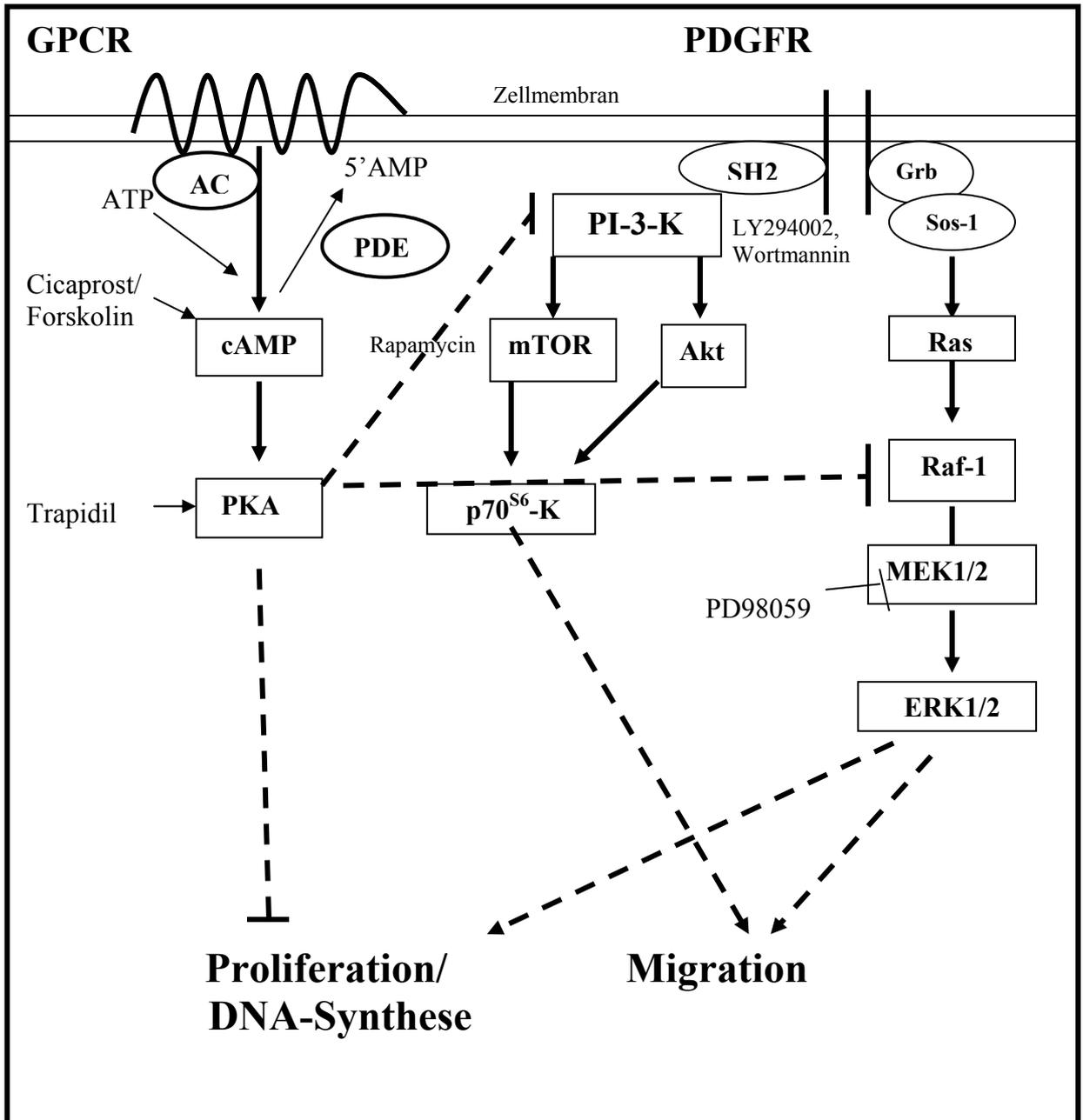


Abb. 2

Signaltransduktionsschema der MAP-Kinase ERK1/2 und PI-3-Kinase. Die Abbildung zeigt stark vereinfacht ein putatives Signaltransduktionsschema der MAP-Kinase ERK1/2 und PI-3-Kinase bezogen auf deren Rolle in der Signaltransduktion von Migration und Proliferation glatter Muskelzellen. Aktivierende Einflüsse sind hier durch eine Pfeilspitze und inhibierende Einflüsse durch einen Querstrich dargestellt. Gestrichelte Linien bedeuten, dass hier nicht berücksichtigte oder nicht definierte Signalwege ausgespart sind.

1.4 Prostacyclin

Prostacyclin gehört zu der Gruppe der Prostaglandine und ist ein Derivat der Arachidonsäure (AA), einer ungesättigten C₂₀-Fettsäure. Arachidonsäure ist ein wichtiger Baustein der Phospholipide, einem Hauptbestandteil der Zellmembran. Phospholipase A₂ (PLA₂) setzt Arachidonsäure aus der Zellmembran frei, die daraufhin durch das in zwei Isoformen, Zyklooxygenase-1 (Cox-1) und Zyklooxygenase-2 (Cox-2), vorkommende Enzym in Prostaglandin G₂ (PGG₂), und nachfolgend durch die Peroxidaseaktivität der Cox-1/-2 in Prostaglandin H₂ (PGH₂) reduziert wird. Die Isomerase Prostaglandin-I₂-Synthase setzt PGH₂ in Prostaglandin I₂ (PGI₂ = Prostacyclin) um (Schrör, 1997; Narumiya et al., 1999).

Prostacyclin wird in Gefäßendothelzellen und in glatten Muskelzellen synthetisiert. Wichtige biologische Funktionen des Prostacyclin sind die Hemmung der Thrombozytenaktivierung/aggregation und der Leukozytenaktivierung sowie die Inhibition der Proliferation glatter Muskelzellen und die Induktion der Vasodilatation (Schrör, 1997). Durch die Beobachtung, dass in atherosklerotisch veränderten Gefäßen die Synthese von PGI₂ signifikant vermindert ist (Rolland et al., 1984; Mayer et al., 1986), lässt sich auf das Fehlen von antithrombogenen/antiatherogenen Effekten des PGI₂ schliessen.

Wie bereits erwähnt, spielt in der Pathogenese der Atherosklerose die Endotheldysfunktion eine wichtige Rolle. Durch die mit der Dysfunktion des Gefäßendothels einhergehende Erhöhung der Permeabilität des Endothels für Makromoleküle, wie zum Beispiel Lipoproteine, können PGI₂-Mimetika, die die Erhaltung der physiologischen Gefäßrelaxation induzieren, die Schrankenfunktion des Endothels positiv beeinflusst werden (Schrör, 1997).

Schrör (1997) beschreibt die antiatherosklerotische Wirkung des Prostacyclins auf glatte Muskelzellen, indem es die Proliferation inhibiert und möglicherweise die Änderung des Phänotyps der Myozyten verhindert.

Ein weiterer antiatherosklerotischer Effekt des PGI₂ ist die potente Inhibition der Thrombozytenadhäsion in atherosklerotisch veränderten Gefäßen. Durch die Hemmung der Adhäsion wird zusätzlich die verstärkte topische thrombozytäre Sekretion von PDGF im subendothelialen Bereich der atherosklerotischen Veränderung mit konsekutiver Induktion der Migration und Proliferation medialer glatter Muskelzellen verhindert (Schrör, 1997; Weber & Schrör, 1999).

Die Hypercholesterinämie ist ein essentieller Faktor im Fortschreiten der Atherogenese. Löbel et al. (1988) und Schrör et al. (1989) zeigten eine signifikante Reduktion des PGI₂-Rezeptors auf Thrombozyten unter hypercholesterinämischen Bedingungen. Die verschiedenen, potentiell antiatherogenen Wirkungen, des PGI₂ zeigen die mögliche Potenz einer therapeutischen Applikation des Prostacyclins in der Beeinflussung des Krankheitsverlaufs.

1.5 Fragestellungen

1. Welchen Einfluss hat Prostacyclin auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen ?
2. Welche Bedeutung hat zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) bei der Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen, und welchen Stellenwert hat die PKA in diesem Kontext ?
3. Über welche Signaltransduktionswege (ERK1/2, PI-3-K) wird die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen vermittelt, und werden diese Signalwege durch das Prostacyclin-Mimetikum Cicaprost beeinflusst ?

2 Material und Methoden

2.1 Kultivierung humaner glatter Muskelzellen

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden aus Segmenten der humanen Vena saphena magna, die bei aortokoronaren Venenbypassoperationen anfielen, gewonnen, und von der Klinik für Thorax- und Kardiovaskuläre Chirurgie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Direktor: Prof. E. Gams, zur Verfügung gestellt. Ein positives Votum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, liegt vor. Die Zellen wurden mittels Explant-Technik (Fallier-Becker et al., 1990) isoliert.

Die Vena saphena magna Segmente wurden in einer silikonbeschichteten Präparierschale fixiert und longitudinal eröffnet. Das Präparat wurde mit Nährmedium (DMEM) bedeckt, um Austrocknung zu vermeiden. Die Endothelzellschicht wurde mit Hilfe eines Skalpells mechanisch entfernt. Danach wurde die Tunica media von der darunterliegenden Tunica adventitia abgetrennt und in kleine Stücke von 1mm Kantenlänge geschnitten. Die gewonnenen Mediastücke wurden in eine 6-Loch Platte überführt und mit Kulturmedium überschichtet. Das Kulturmedium wurde alle 48 Stunden gewechselt. Nach 7-10 Tagen im Brutschrank wuchsen glatte Muskelzellen aus den Mediaexplantaten aus und proliferierten. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Mediaexplantate entfernt und die Zellen passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Dann wurde 1 ml Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,05 % zu den Zellen gegeben, um diese enzymatisch vom Kulturgefäßboden zu lösen. Durch Zugabe serumhaltigen Kulturmediums wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (800 rpm, 10 min) und der Überstand abgesaugt. Danach wurden die Zellen in frischem Nährmedium resuspendiert und die Zellen in einer Dichte von 10 000 Zellen/cm² ausplattiert.

2.2 Migrationsassay

Glatte Muskelzellen aus der humanen Vena saphena magna (bis Passage 11) wurden auf 24-Loch Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden in einer Dichte von ca. 7000/cm² ausgesät und bis zur Konfluenz erfolgte jeden zweiten Tag ein Nährmediumwechsel. Für 24 Stunden wurden die Zellen in einem serumfreien Kulturmedium kultiviert, um eine Synchronisation des Zellzyklus zu erreichen. Zur Hemmung der Proliferation wurde dem Medium Hydroxyharnstoff (5 mmol/L) zugefügt. Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurde eine definierte mechanische Verletzung des Zellrasens induziert, wobei ein zellfreier Kanal von 6 mm Breite entstand. Nach einer Vorinkubation von 15 Minuten mit verschiedenen Substanzen wurden die Zellen für 72 Stunden mit PDGF-BB stimuliert. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 99 % Ethanol fixiert und mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Zur Quantifizierung der migrierten Zellen in den Wundspalt wurde ein Phasen-Kontrast-Mikroskop (IX-50, Olympus Optical, Hamburg) verwendet.

2.3 Analyse von Proteinen durch Western Blot

2.3.1 Isolierung von Proteinen aus humanen glatten Gefäß-muskelzellen

Für die Untersuchung mittels Western Blot wurden konfluent gewachsene Zellen auf 24-Loch Platten zweimal mit PBS gewaschen und danach durch Substitution von modifiziertem 1 x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970; Cannon-Carlson & Tang, 1997) lysiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Grund der Kulturplatte gelöst, 2 Sekunden in einem Eppendorfgefäß sonifiziert und 10 Minuten bei 95 °C denaturiert.

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

Die Auftrennung der Proteine aus dem Zelllysat erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970; Neville, 1971). Dazu wurde ein Sammelgel (5 % Acrylamid) auf ein Trenngel (7,5 %, 10 % oder 12 % Acrylamid; „Rotiphorese“, Roth, Karlsruhe) gegossen. Für die Untersuchung der Proteine wurden 10-20 µg Protein verwendet. Der Gellauf erfolgte bei 200 V Spannung in einer Elektrophoresekammer (BioRad, München) mit 1 x Laufpuffer + 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS). Als Molekulargewichtsmarker fungierte ein biotinylierter, hochmolekularer Proteinstandard (Sigma-Aldrich, Deisenhofen).

2.3.3 Transfer von Proteinen

Die Proteine wurden mittels der „Semi-Dry“-Blotting Technik (BioRad, München) auf eine Polyvinyliden Difluorid Membran (PVDF, Millipore, ImmobilonP, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) transferiert. Der Transfer erfolgte mit Blotpuffer bei 12 V Spannung über eine Zeitdauer von 30 Minuten.

2.3.4 Hybridisierung und Detektion von Proteinen

Um die Sättigung unspezifischer Bindungsstellen zu gewährleisten, wurde die Membran eine Stunde lang bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in TBSTM (s. Western-Lösungen) prähybridisiert. Dann erfolgte die Hybridisierung mit Primärantikörper (1:1000, siehe Tabelle) in 10 ml TBSTM für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach 3 x 10 minütigem Waschen in TBST (s. Western-Lösungen) erfolgte die Hybridisierung mit Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpern (1: 5000, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg) in TBSTM für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach 3 x 10 minütigem Waschen in TBST wurden die Proteine durch ein Lumi-Light Western Blotting Substrat (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Angaben des Herstellers detektiert. Bei dieser Methode werden, mit der bei der Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) entstehenden Lichtemission, die Stellen mit Peroxidaseaktivität auf der Membran nachgewiesen. Die Chemilumineszenz wird durch Exposition der Membran mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm TN ECL TM, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) sichtbar.

2.3.5 Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung

Die PVDF-Membran wurde nach der Detektion mit TBST gewaschen und 10 Minuten lang in einer Amidoschwarz-Lösung (0,1 % in 25 % Isopropanol/10 % Essigsäure; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) angefärbt. Nach 10 minütigem Abwaschen der überschüssigen Farbstoffmenge mit 25 % Isopropanol/10 % Essigsäure wurden die Proteinbahnen sichtbar und die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung auf der Membran kontrolliert.

2.4 Lösungen und Puffer

2.4.1 Western – Lösungen

TBS (10x) 1,5 M NaCl 0,1 M Tris / HCl pH = 7,4	TBST 100 mL TBS (10x) 1 mL Tween 20 ad 1 L A. dest.	TBSTM 9,5 g TBS (10x) 5 g Milchpulver ad 100 ml mit A. dest.
Laufpuffer (10x) 30 g Tris 144 g Glycin ad 1 L mit A. dest.	Blotpuffer 100 mL Laufpuffer (10x) 200 mL Methanol ad 1 L A. dest.	Lämmli - Puffer (2x) 0,125 M Na - Phosphat - Puffer 20 % (V/V) Glycerin 4 % (W/V) SDS 0,002 % Bromphenolblau frisch zusetzen: 100 mM DTT
1,5 M Tris / HCl pH = 8,8 18,171 g Tris mit 37 % HCl pH einstellen ad 100 mL mit A. dest. auffüllen	0,5 M Tris / HCl ph = 6,8 6,057 g Tris mit 37 % HCl pH einstellen ad 100 mL mit A. dest. auffüllen	

2.4.2 Kulturmedien

Nährmedium: Life-Technologies; Eggenstein, Deutschland - Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM) - 15 % fetales Kälberserum (FCS) - Penicillin/Streptomycin - L-Glutamin - nicht-essentielle Aminosäuren - Natrium-Pyruvat	serumfreies Medium: Life-Technologies; Eggenstein, Deutschland - Nährmedium ohne FCS
---	---

2.5 Antikörper

Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204): New England Biolabs; Beverley MA, U. S. A.

Phospho-Akt (Thr308): New England Biolabs; Beverley MA, U. S. A.

Phospho-Akt (Ser473): New England Biolabs; Beverley MA, U. S. A.

2.6 Andere Substanzen und Materialien

Zellkulturmaterial: Becton Dickenson; Hamburg, Deutschland

Forskolin: Sigma; Deisenhofen, Deutschland

PDGF-BB: Sigma; Deisenhofen, Deutschland

LY294002: Calbiochem; Bad Soden, Deutschland

SB202190: Calbiochem; Bad Soden, Deutschland

SB203580: Calbiochem; Bad Soden, Deutschland

Curcumin: Calbiochem; Bad Soden, Deutschland

GF-109203X: Calbiochem; Bad Soden, Deutschland

Wortmannin: Alexis Biochemicals; Grünberg, Deutschland

PD98059: Calbiochem; Bad Soden, Deutschland

Rapamycin: Calbiochem; Bad Soden, Deutschland

Cicaprost: freundlichsterweise zur Verfügung gestellt von Dr. Schneider Schering AG; Berlin, Deutschland

Trapidil: freundlichsterweise zur Verfügung gestellt von UCB; Kerpen, Deutschland

2.7 Statistik

Die Ergebnisse der Migrationsversuche sind jeweils als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) von n der Experimenten aufgeführt. Die statistische Analyse wurde entweder mit Hilfe des „t-Test nach Student“ für unverbundene Stichproben oder mit der Varianzanalyse (ANOVA)/Bonferroni-Test für multiple Vergleiche durchgeführt. Ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Die Effekte von PDGF-BB auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Unter basalen Bedingungen zeigte sich, in einem Zeitraum von 72 Stunden, eine nur sehr geringe Migration der Gefäßmuskelzellen in den Wundspalt. Durch die Inkubation mit PDGF-BB (10 ng/ml) wurde eine starke Migration der Zellen induziert (Abb. 3), die im Mittel einer zwölffachen Steigerung entsprach (Abb. 4).

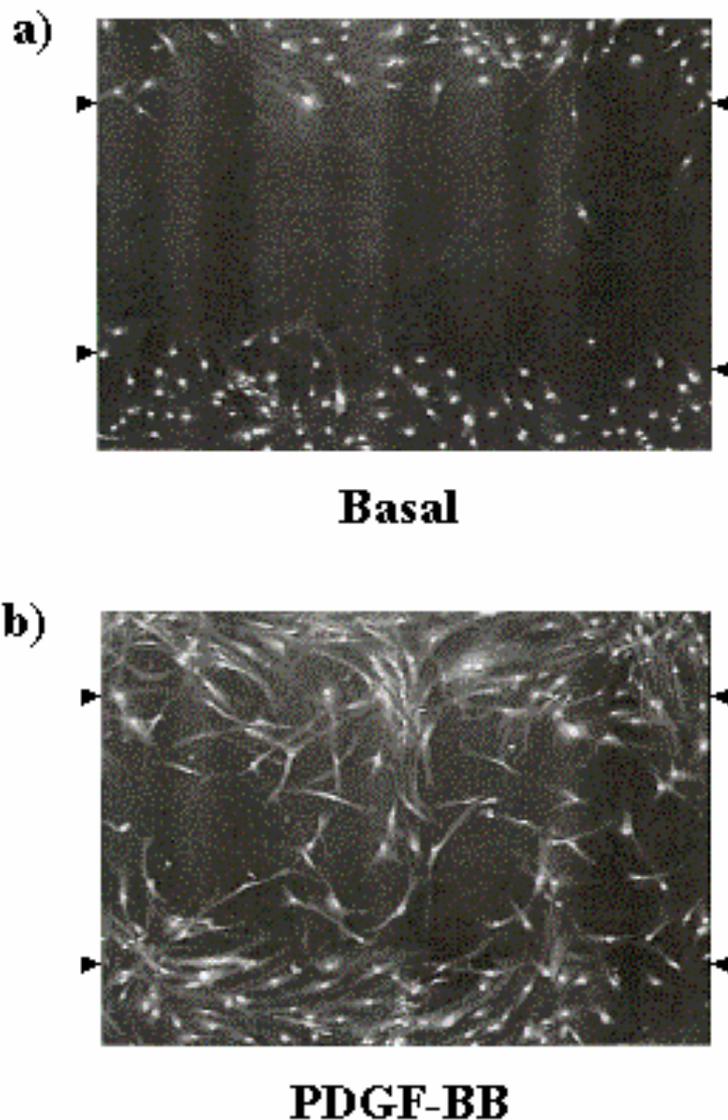


Abb. 3

Originalbild migrierender humaner glatter Gefäßmuskelzellen unter basalen Bedingungen (a) und nach Stimulation der Zellen mit PDGF-BB (10 ng/ml) (b). Die Pfeile zeigen die Breite des Migrationskanals an.

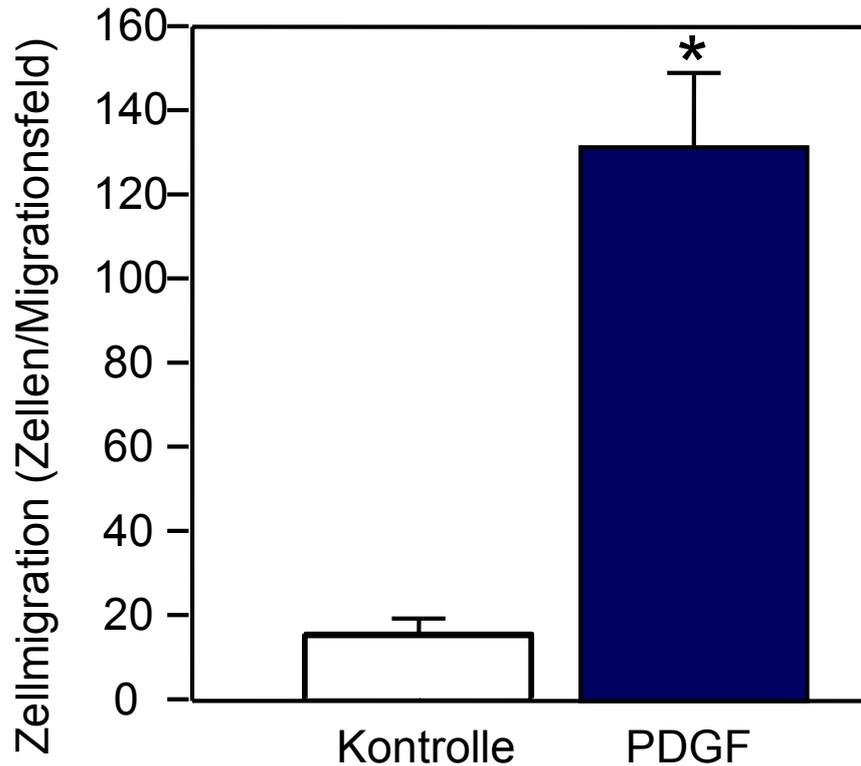


Abb. 4

Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen unter basalen Bedingungen (Kontrolle) und nach Stimulation der Zellen mit PDGF-BB (10 ng/ml). (Quantitative Auswertung von n = 9 Experimenten, * p < 0,05 vs. Kontrolle).

3.2. Die Effekte der p38-MAP-Kinase-Inhibitoren SB203580 und SB202190 auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Die p38-MAP-Kinase-Inhibitoren SB203580 und SB202190 (jeweils 1-10 µM) zeigten keine signifikante Hemmung der PDGF-BB-induzierten Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Abb. 5, Abb. 6).

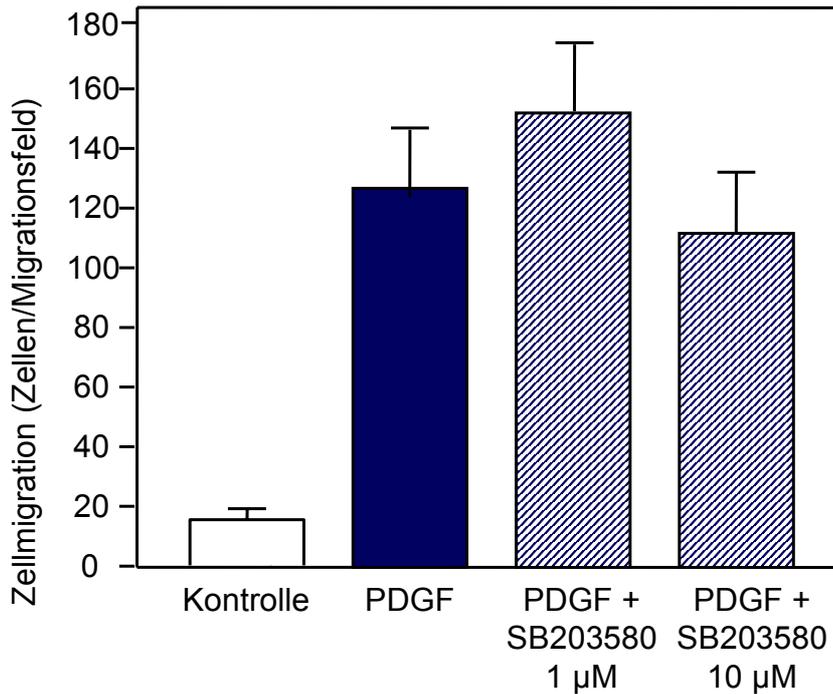


Abb. 5

Effekte von SB203580 (1-10 µM) auf die PDGF-BB (PDGF, 10 ng/ml)-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Quantitative Auswertung von n = 3-6 Experimenten).

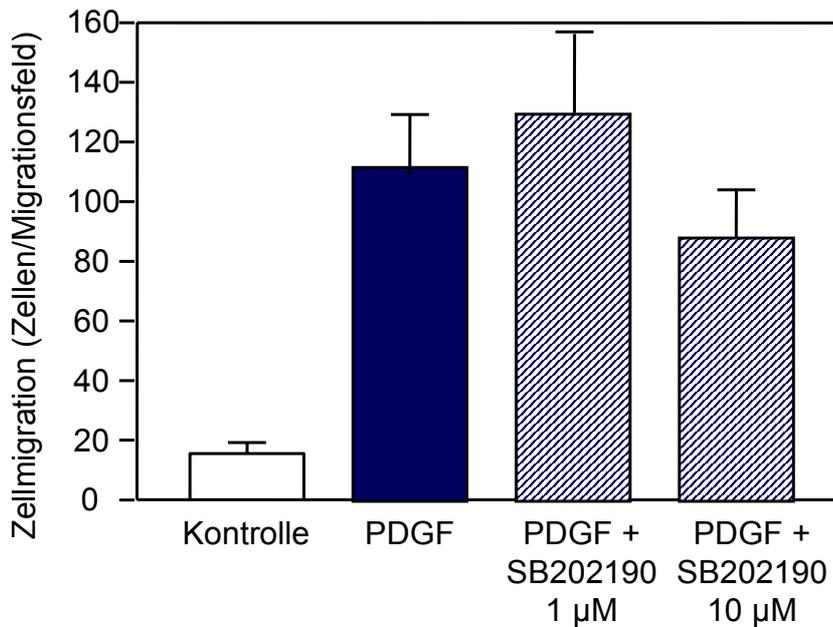


Abb. 6

Effekte von SB202190 (1-10 µM) auf die PDGF-BB (PDGF, 10 ng/ml)-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Quantitative Auswertung von n = 4-6 Experimenten).

3.3 Die Effekte des JNK-Inhibitors Curcumin auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Der JNK-Inhibitor Curcumin zeigte in einer Konzentration von 10 μM und 100 μM keine signifikante Inhibition der PDGF-BB induzierten Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Abb. 7).

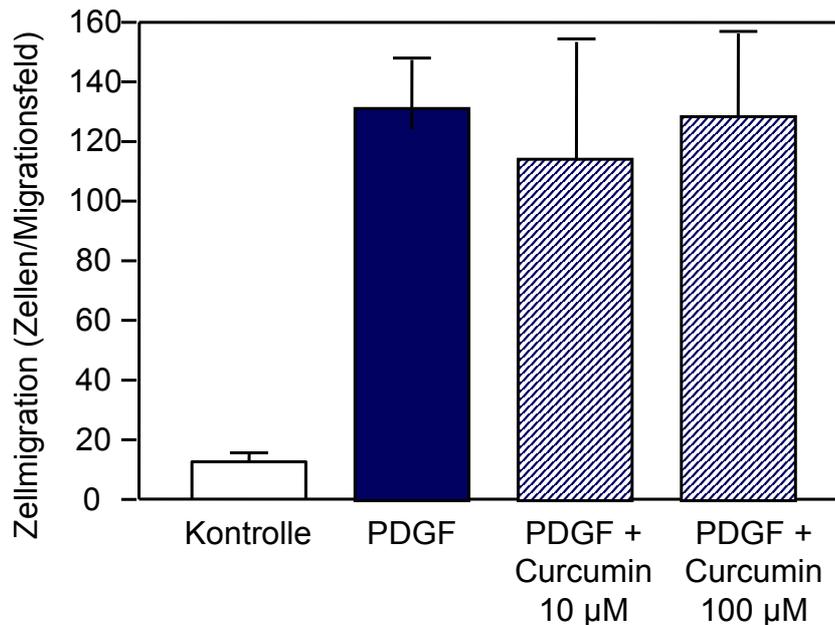


Abb. 7

Effekte von Curcumin (10-100 μM) auf die PDGF-BB (PDGF, 10 ng/ml)-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Quantitative Auswertung von n = 6-9 Experimenten).

3.4 Effekte des PKC-Inhibitors GF-109203X (Bisindolylmaleimid-1) auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Aus der Vorinkubation mit GF-109203X resultierte keine deutliche Reduktion des Migrationsverhaltens, der mit PDGF-BB inkubierten humanen glatten Gefäßmuskelzellen (Abb. 8).

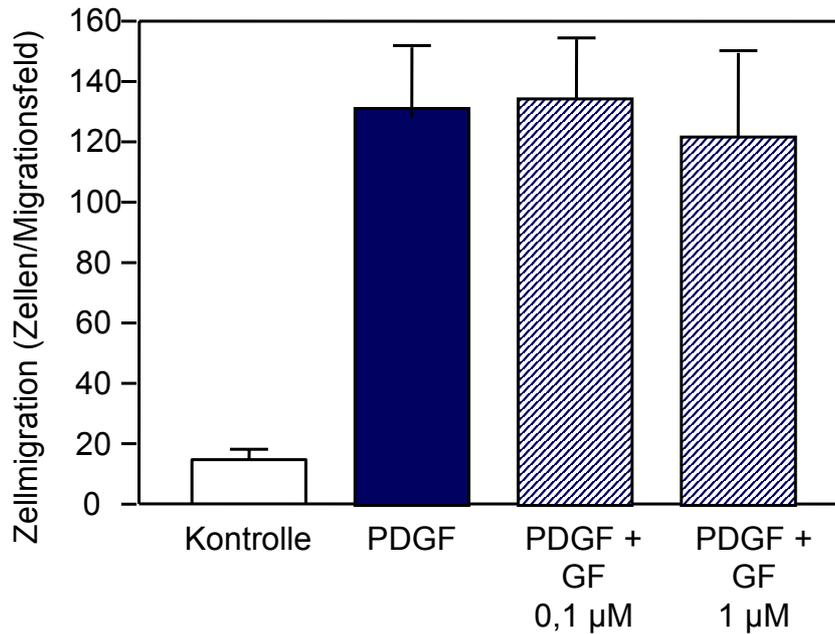


Abb. 8

Effekte von GF-109203X (GF, 0,1-1 µM) auf die PDGF-BB (PDGF, 10 ng/ml)-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Quantitative Auswertung von n = 3-4 Experimenten).

3.5 Die Effekte der PI-3-Kinase-Inhibitoren LY294002 und Wortmannin auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Der PI-3-Kinase-Inhibitor LY294002 reduzierte, in einer Konzentration von 1 µmol/l, die PDGF-BB (10 ng/ml)-induzierte Zellmigration nicht signifikant um 26% (Abb. 9, Abb. 10). In einer Konzentration von 10 µmol/L LY294002 wurde eine signifikante Hemmung der Migration um 86 % erreicht (Abb. 9, Abb. 10).

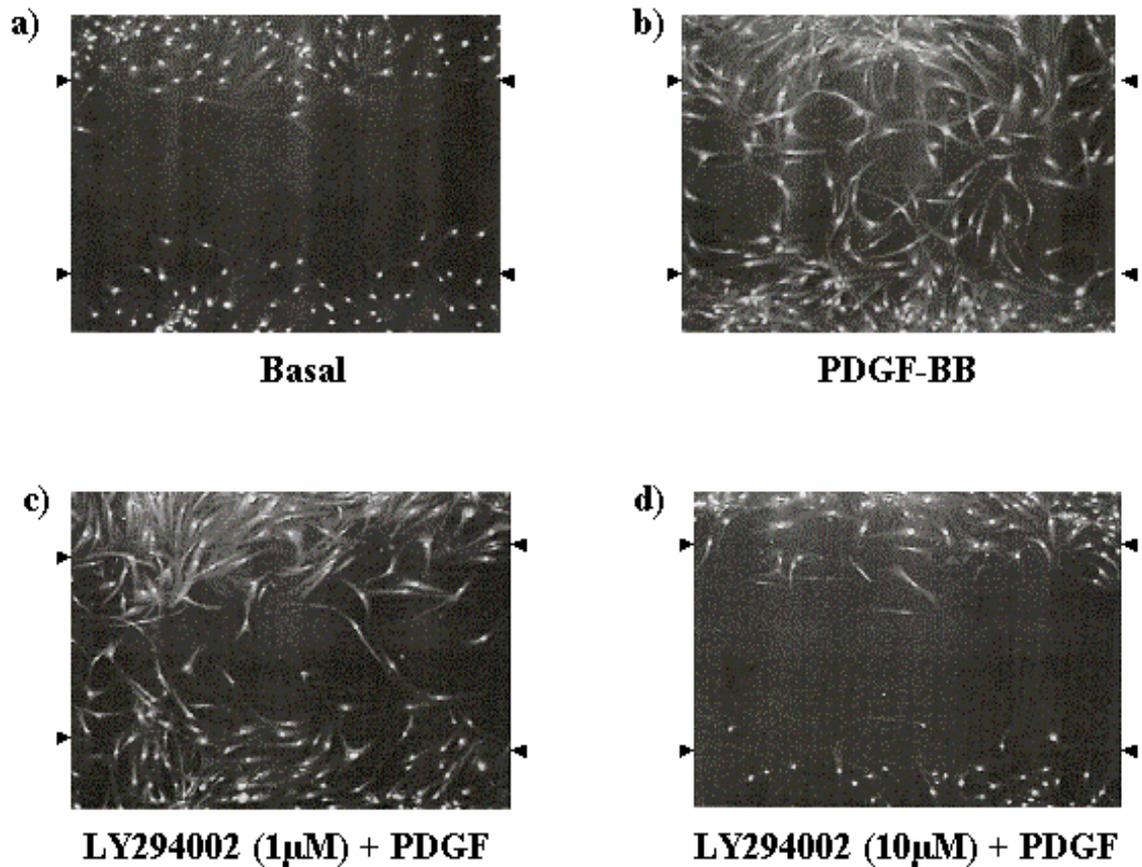


Abb. 9
 Effekte von LY294002 (1-10 μM) auf die PDGF-BB (PDGF, 10 ng/ml)-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Originalexperiment).

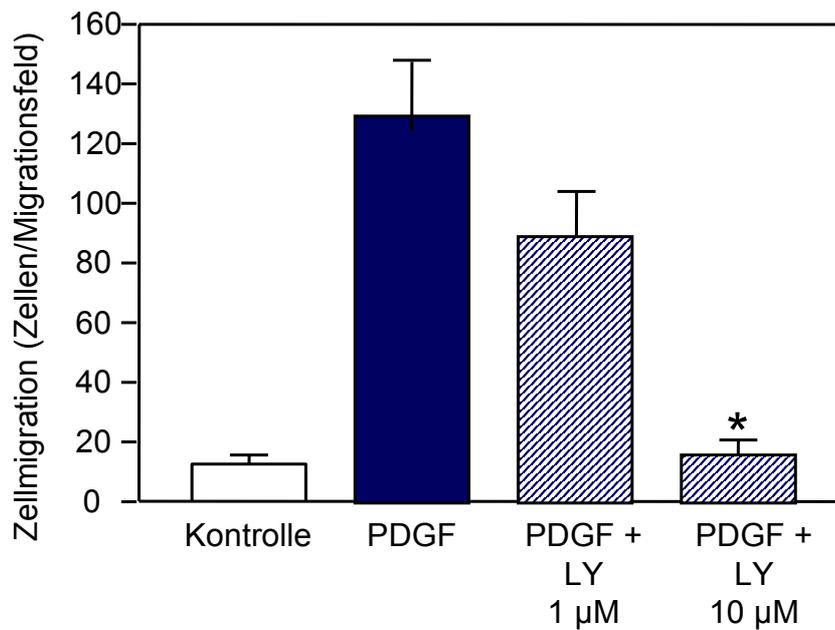


Abb. 10
 Effekte von LY294002 (LY, 1-10 μM) auf die PDGF-BB (PDGF, 10 ng/ml)-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Quantitative Auswertung von n = 6 Experimenten, * $p < 0,05$ vs. PDGF).

Mit einem weiteren Inhibitor der PI-3-Kinase, Wortmannin, wurde in einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ ebenfalls eine signifikante Reduktion der Zellmigration beobachtet (Abb. 11)

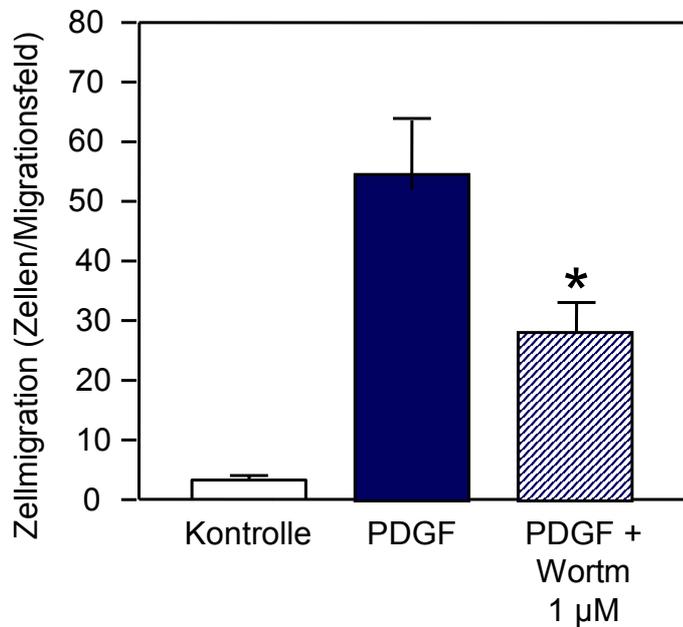


Abb. 11

Effekte von Wortmannin (Wortm, 1 μM) auf die PDGF-BB (PDGF, 10 ng/ml)-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Quantitative Auswertung von n = 4 Experimenten, * p < 0,05 vs. PDGF).

3.6 Die Effekte des MEK-1-Inhibitors PD98059 auf die Migration humaner glatter Muskelzellen

Die Hemmung der MEK-1 durch PD98059 (10 μM) ergab eine signifikante Reduktion der PDGF-BB (10 ng/ml)-induzierten Zellmigration (Abb. 12, Abb. 13).

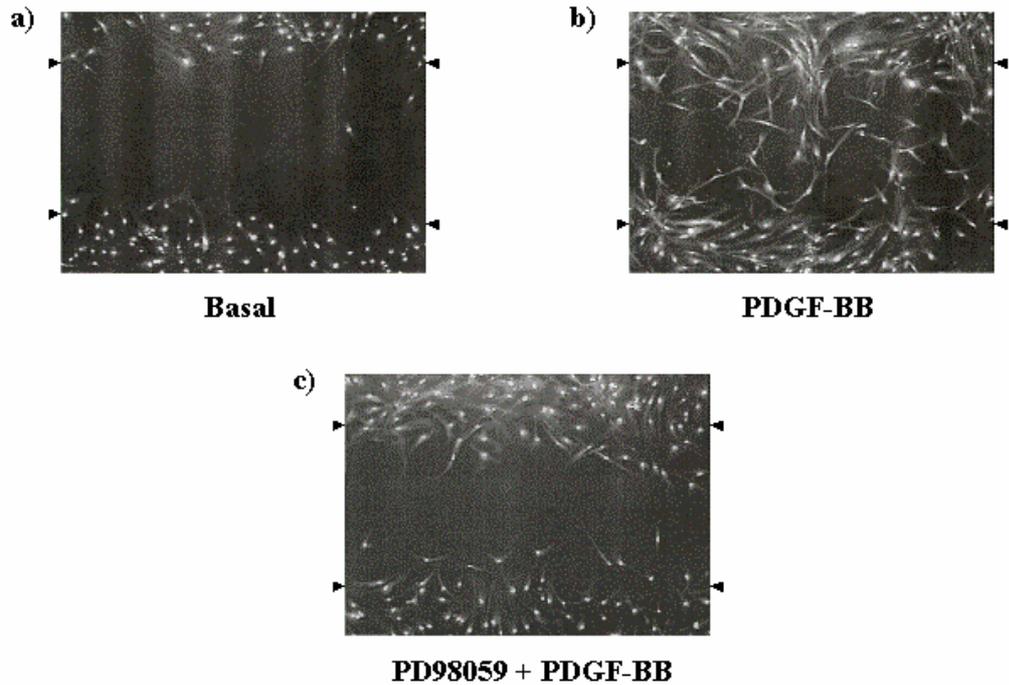


Abb. 12
 Effekte von PD98059 (10 μ M) auf die PDGF-BB (PDGF, 10 ng/ml)-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Originalexperiment).

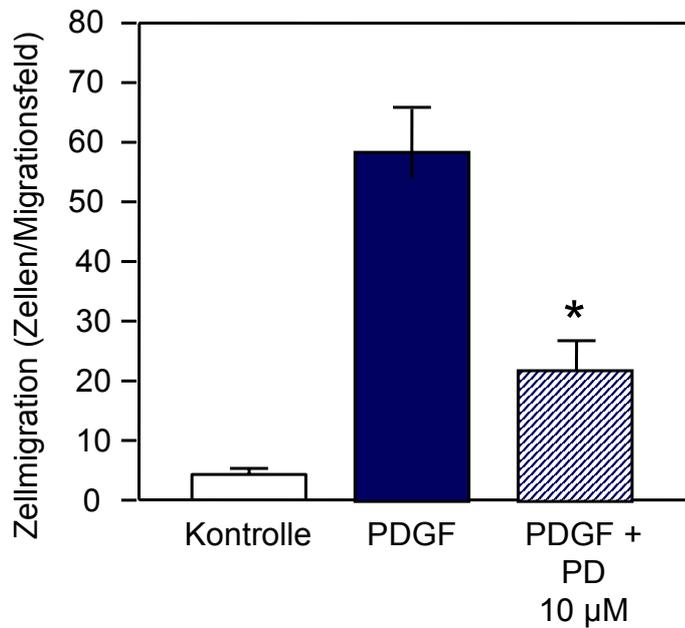


Abb. 13
 Effekte von PD98059 (PD, 10 μ M) auf die PDGF-BB (PDGF, 10 ng/ml)-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Quantitative Auswertung von n = 4 Experimenten, * p < 0,05 vs. PDGF).

3.7 Die Effekte von Rapamycin auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Aus der Vorinkubation der Myozyten mit dem Immunsuppressivum Rapamycin (10 nM) resultierte ebenfalls ein signifikant abgeschwächtes Migrationverhalten der durch PDGF-BB (10 ng/ml) stimulierten Zellen (Abb. 14).

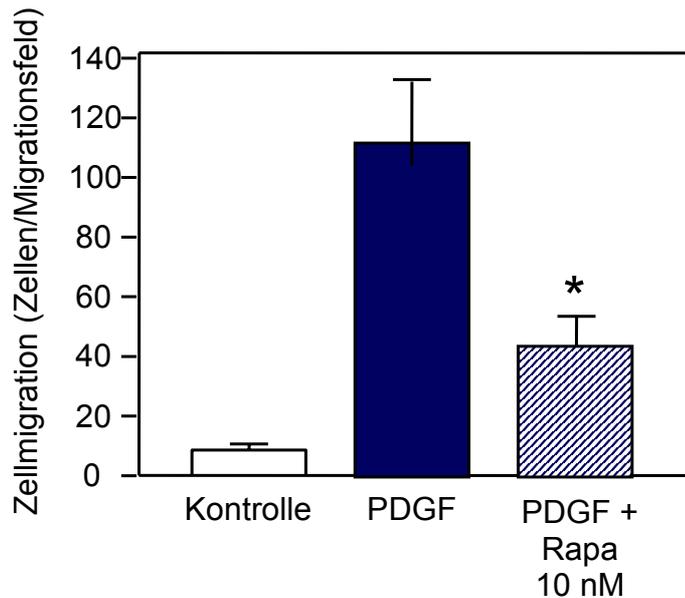


Abb. 14

Effekte von Rapamycin (Rapa, 10 nM) auf die PDGF-BB (PDGF, 10 ng/ml)-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Quantitative Auswertung von $n = 5$ Experimenten, * $p < 0,05$ vs. PDGF).

3.8 Die Effekte von Cicaprost auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Nach Vorinkubation der Myozyten mit Cicaprost (100 nM) für 15 Minuten zeigte sich eine deutliche Inhibition, der durch PDGF-BB (10 ng/ml) induzierten Zellmigration um 74 ± 4 % ($n = 6$; $p < 0,05$) (Abb. 15, Abb. 16).

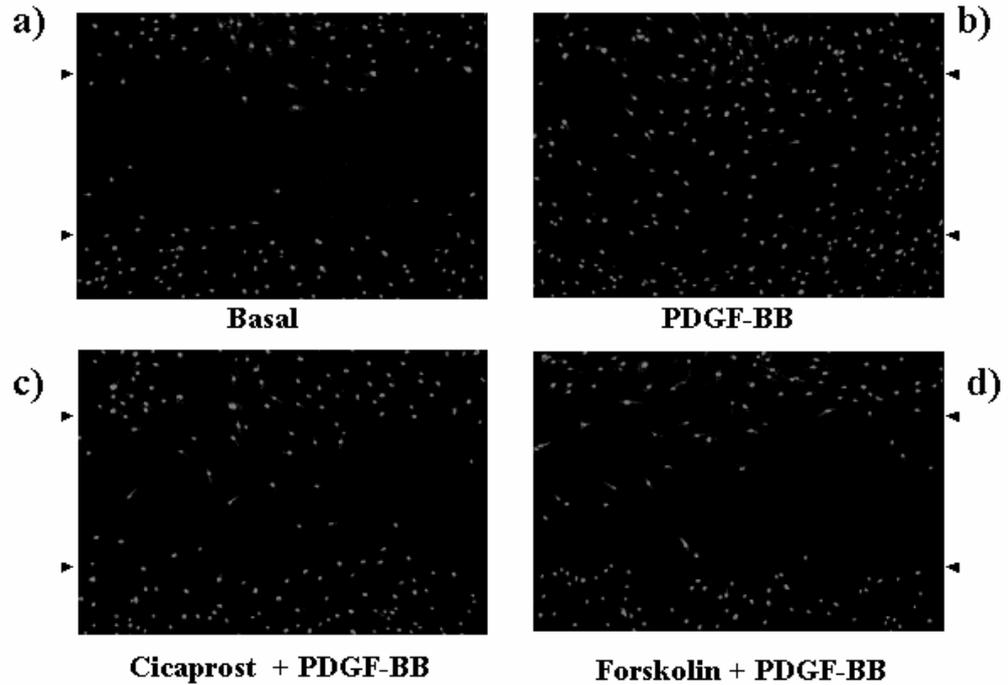


Abb. 15
Effekte von Cicaprost (100 nM) bzw. Forskolin (10 μ M) auf die PDGF-BB (PDGF, 10 ng/ml)-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Originalexperiment).

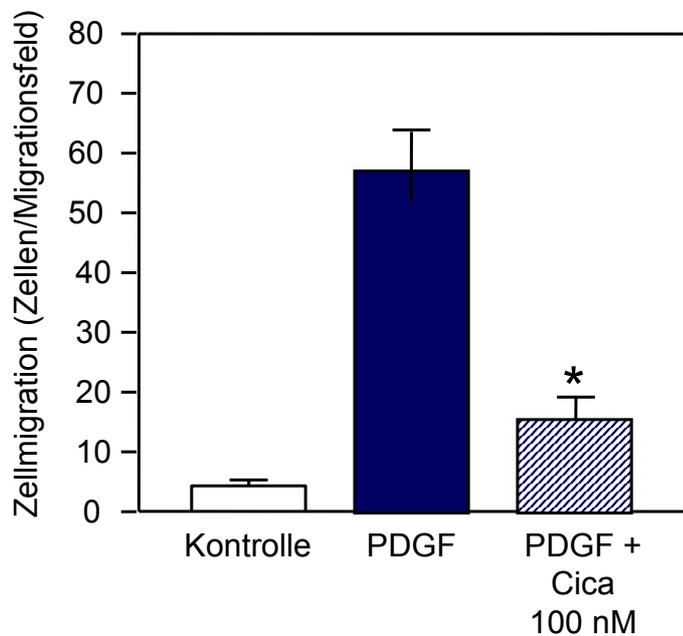


Abb. 16
Effekte von Cicaprost (Cica, 100 nM) auf die PDGF-BB (PDGF, 10 ng/ml)-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Quantitative Auswertung von n = 6 Experimenten, * p < 0,05 vs. PDGF).

3.9 Die Effekte von Forskolin und Trapidil auf die Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Die Steigerung des Cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP)-Spiegels durch direkte Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) mit Forskolin (10 $\mu\text{mol/L}$), ergab eine signifikante Hemmung der PDGF-BB induzierten Migration der glatten Gefäßmuskelzellen (Abb. 17, Abb. 18).

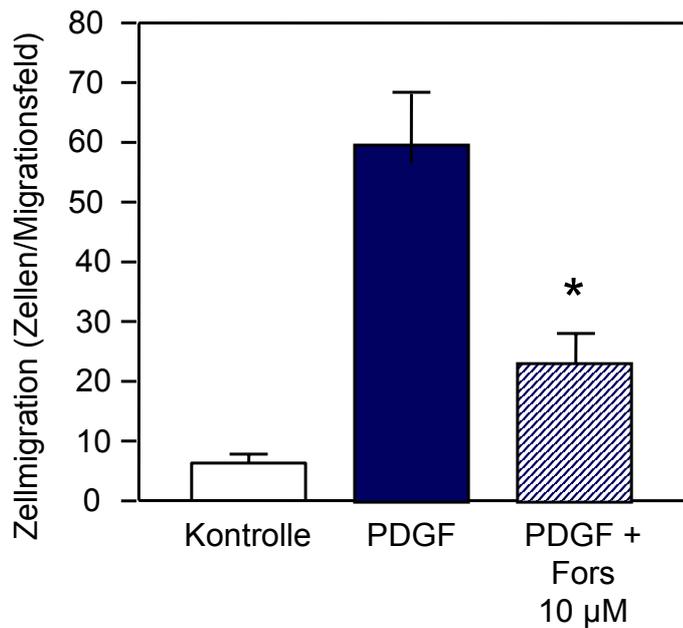


Abb. 17

Effekte von Forskolin (Fors, 10 μM) auf die PDGF-BB (PDGF, 10 ng/ml)-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Quantitative Auswertung von $n = 5$ Experimenten, * $p < 0,05$ vs. PDGF).

Die Vorinkubation mit dem direkten PKA-Aktivator Trapidil (100 μM) (Bönisch et al., 1998) reduzierte ebenfalls signifikant die Zellmigration nach Stimulation durch PDGF-BB (10 ng/ml) (Abb. 18). Die verwendete Trapidil-Konzentration beeinflusste den cAMP-Spiegel nicht (Daten nicht gezeigt, $n = 3$)

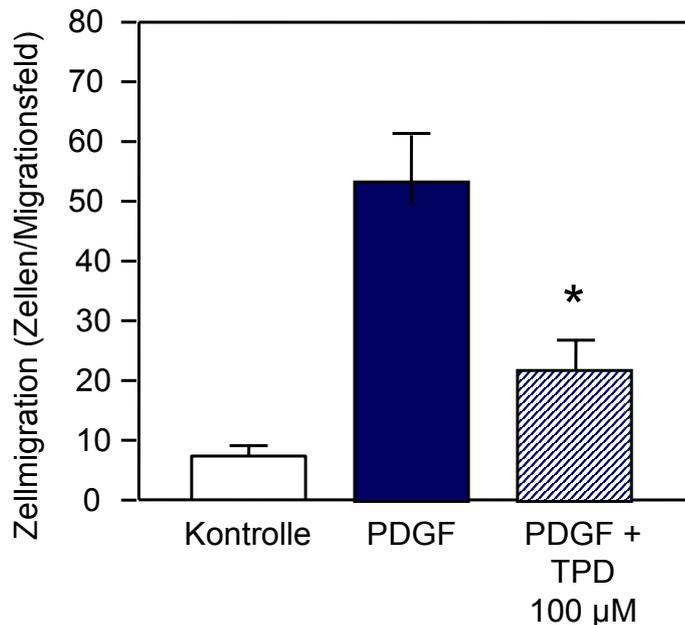


Abb. 18

Effekte von Trapidil (TPD, 100 µM) auf die PDGF-BB (PDGF, 10 ng/ml)-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen (Quantitative Auswertung von n = 6 Experimenten, * p < 0,05 vs. PDGF).

3.10 Die Effekte von Cicaprost auf die PDGF-BB induzierte Signaltransduktion humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Durch PDGF-BB (10 ng/mL) stimulierte Myozyten zeigen eine Aktivierung der PI-3-Kinase, die in einer Phosphorylierung von Akt an den Aminosäureresten Threonin 308 und Serin 473 resultiert. Die maximale Phosphorylierungsrate an beiden Stellen lag in einem Zeitfenster zwischen 10 und 30 Minuten.

Eine Vorinkubation (15 Minuten) der Zellen mit Cicaprost (100 nM) zeigte eine partielle Inhibition der PDGF-BB (10 ng/ml)-induzierten Akt-Phosphorylierung sowohl an Threonin 308 als auch an Serin 473 (Abb. 19).

Mit dem PI-3-Kinase Inhibitor LY 294002 (10 µmol/L) konnte in anderen Experimenten eine komplette Hemmung, der durch PDGF-BB induzierten Akt-Phosphorylierung an beiden Phosphorylierungsstellen, erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

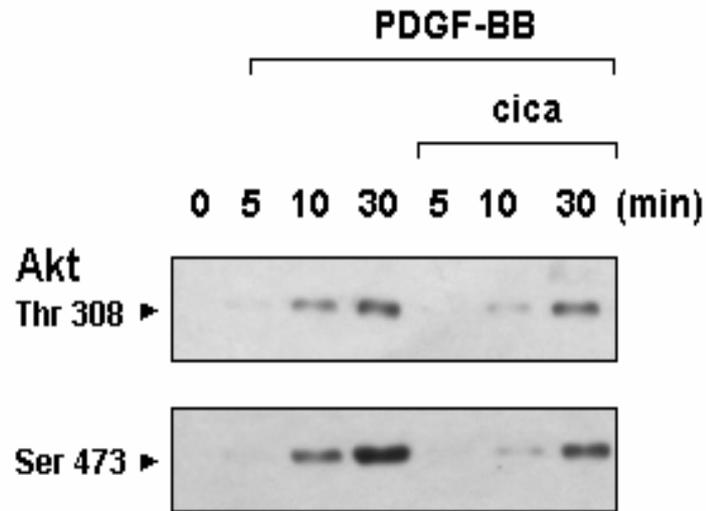


Abb. 19

Effekte von Cicaprost (100 nM) auf die PDGF-BB (10 ng/ml)-induzierte Akt-Phosphorylierung an Thr 308 und Ser 473. Der Western Blot ist repräsentativ für n = 3 unabhängige Versuche.

PDGF-BB (10 ng/ml) induzierte eine transiente ERK 1/2-Phosphorylierung mit einem maximalen Effekt zwischen 10 und 30 Minuten.

Die vorausgehende Inkubation (15 Minuten) der Myozyten mit Cicaprost (100 nmol/L) reduzierte deutlich die PDGF-BB induzierte ERK 1/2-Phosphorylierung (Abb 20).

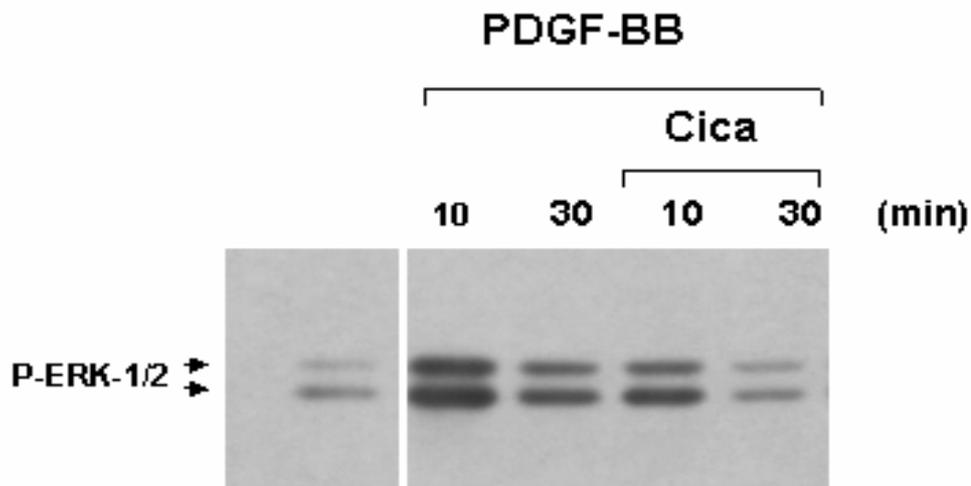


Abb. 20

Effekte von Cicaprost (100 nM) auf die PDGF-BB (10 ng/ml)-induzierte ERK-1/2-Phosphorylierung. Der Western Blot ist repräsentativ für n = 3 unabhängige Versuche.

4 Diskussion

Die vorgelegten Ergebnisse demonstrieren eine starke Hemmung der PDGF-BB induzierten Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen durch das Prostacyclin-Analogon Cicaprost. Diese Hemmung der Migration wird auf der Signaltransduktionsebene sowohl von einer Inhibition der PDGF-BB induzierten ERK 1/2-Phosphorylierung als auch von einer Hemmung der Akt-Phosphorylierung in glatten Gefäßmuskelzellen, induziert durch Cicaprost, begleitet.

Das chemotaktische Verhalten der Myozyten wurde in einem etablierten *in vitro* Modell für Zellmigration nach mechanischer Verletzung untersucht (Majack et al., 1984; Sakar et al., 1996). Hierzu wurde in konfluent gewachsene humane glatte Muskelzellen aus der Vena saphena magna mit einer Pipettenspitze mechanisch ein definierter Spalt eingebracht. Nach der Verletzung wurde die Migration der Myozyten in den zellfreien Wundspalt quantitativ ausgewertet.

Zur Differenzierung von Zellmigration und Zellproliferation wurden die Zellen mit der zytostatisch wirksamen Verbindung Hydroxyharnstoff (Hydroxycarbamid) vorinkubiert. Nach der Behandlung der glatten Muskelzellen stellte sich eine komplette Hemmung der Proliferation ein, wobei die Chemotaxis unbeeinflusst blieb. Dadurch läßt sich eine exklusive Bewertung der Migration glatter Muskelzellen ohne die verfälschenden Ergebnisse durch Zellproliferation, die ebenfalls zur Wiederbewachung des Wundspaltes beitragen (Sakar et al., 1996), verwirklichen. Eine weitere beeinflussende Komponente, die durch die Verwendung von Hydroxyharnstoff gehemmt werden kann, ist die Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO). NO ist ein potenter Inhibitor der Proliferation glatter Muskelzellen (Sakar et al., 1996) und wird auf diese Weise durch die komplette Inhibition der Proliferation durch Hydroxyurea als beeinflussender Faktor ausgeschaltet. Hydroxyharnstoff inhibiert konzentrationsabhängig die durch PDGF-BB (10 ng/mL) oder Serum (1 %) induzierte Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Synthese. Bei einer Höchstmenge von 5 mmol/L Hydroxyharnstoff wurde die DNA-Synthese vollständig gehemmt. Das Auftreten zytotoxischer Effekte auf die glatten Muskelzellen wurde nicht beobachtet.

Ein weiteres, häufig eingesetztes *in vitro* Modell zur quantitativen Messung der Migration glatter Muskelzellen, ist die modifizierte Boyden-Kammer (Koyama et al., 1993; Kohno et al., 1997). Kultivierte glatte Muskelzellen werden suspendiert und in die obere Kammer des Modells eingebracht. Der unteren Kammer wird die bezüglich ihrer promigratorischen Potenz zu untersuchende Substanz zugesetzt. Zwischen beiden Kammern befindet sich ein kollagenbeschichteter Polykarbonatfilter, der je nach benutztem Zelltyp mit Porengrößen im einstelligen Mikrometerbereich ausgewählt wird. Nach der Inkubationszeit werden Zellen, die sich auf der Oberseite des Filters befinden, mechanisch entfernt. Zellen, die durch den beschichteten Polykarbonatfilter auf die Unterseite transmigriert sind, werden fixiert und gefärbt. Die quantitative Auswertung erfolgt mit einem Mikroskop.

Die modifizierte Boyden-Kammer ist im Gegensatz zum Migrationsmodell nach mechanischer Verletzung/„Verletzungsmodell“ eine Versuchsanordnung, die mit mehr Arbeitsaufwand verbunden ist, da sie mehr Arbeitsschritte erfordert. Die Kultivierung der Zellen zur Versuchsdurchführung muß in anderen Kulturgefäßen vorgenommen werden als der Versuch selber. Dieser Schritt entfällt im „Verletzungsmodell“, denn die Zellkultivierung und Versuchsdurchführung werden in der gleichen 24-Loch Platte durchgeführt. Das „Verletzungsmodell“ läßt durch die Breite des Spaltes zusätzlich eine quantitative Bewertung der migrierten Distanz der einzelnen Zellen zu, was einen weiteren Bewertungsfaktor der Chemotaxis darstellt. Die modifizierte Boyden-Kammer

lässt dies nicht zu, da in diesem Modell das Durchtreten der Zellen durch den Mikrofilter als Migration interpretiert wird (Kohno et al., 1997).

PDGF-BB, in dieser Arbeit als chemotaktischer Faktor benutzt, wird als wichtigster Induktor der Migration von Myozyten in die Intima des Gefäßes angesehen (Ross, 1993; Abendi & Zachary, 1995). Die wichtigsten Produzenten von PDGF in der atherosklerotischen Läsion sind, neben Thrombozyten, glatte Muskelzellen. Auf Myozyten, die eine phänotypische Veränderung durchlaufen haben, wirkt PDGF promigratorisch. Es kommt zur Einwanderung der glatten Muskelzellen aus der Media des Gefäßes in die geschädigte Intima mit darauffolgender Proliferation und verstärkter Produktion von Extrazellulärmatrix und sukzessiver Formation einer Neointima (Newby & Zaltman, 2000).

In den Migrationsversuchen dieser Arbeit zeigte sich durch die Inkubation der Myozyten mit PDGF-BB (10 ng/ml) eine hochsignifikante Induktion der Migration. In den Kontrollversuchen waren im Mittel 15 Zellen in den Wundspalt migriert. Im Vergleich dazu führte die Inkubation mit PDGF-BB (10 ng/ml) zu einer zwölffachen Zunahme der Migration mit durchschnittlich 131, in den Wundspalt migrierten, glatten Muskelzellen.

Eine selektive Hemmung der Migration glatter Muskelzellen in die Intima, induziert durch Depletion von Thrombozyten in einem Tiermodell nach PTCA von Rattenkarotiden, hatte einen stark hemmenden Effekt auf die Neointimabildung (Newby & Zaltman, 2000). Dieser Effekt konnte durch einen spezifischen PDGF-Antikörper bestätigt werden. Die frühe Proliferation der glatten Muskelzellen hingegen wurde, post PTCA, dadurch nicht inhibiert (Newby & Zaltman, 2000). Ein Antikörper gegen FGF-2, der direkt aus verletzten glatten Muskelzellen freigesetzt wird, zeigte hingegen eine antiproliferative Wirkung auf die frühe mediale Proliferationsphase nach PTCA.

Weitere Mitglieder der MAP-Kinase Familie sind, neben den ERK1/2-Kinasen, die durch Stress aktivierbaren Proteinkinasen (SAPK), auch c-jun N-terminal Kinasen (JNK) genannt, und die p38-Proteinkinasen (Tibbles & Woodgett, 1999).

JNK wird sowohl durch die MAP-Kinase-Kinase MEK4 als auch durch MEK7 aktiviert (Takahashi et al., 1998). SAPKs binden an den Transkriptionsfaktor c-Jun und phosphorylieren diesen. c-Jun ist ein Teil des Aktivator-Protein-1 (AP-1) Transkriptionskomplexes (Tibbles et al., 1999). Die meist zitierte Funktion der SAPK-Signalkaskaden ist deren Rolle in der Apoptose. Dies wurde exemplarisch an neuronalen Zellen (PC12) gezeigt, die auf den Entzug eines wichtigen Wachstumsfaktors (Nerve Growth Factor = NGF) mit der Aktivierung der SAPK-Signalkaskade und Apoptose reagierten (Tibbles et al., 1998; Ichijo et al., 1997).

Die in den Migrationsversuchen dieser Arbeit benutzte Substanz Curcumin (Diferuloylmethan) ist als ein potenter JNK-Inhibitor charakterisiert (Shin et al., 2001). Curcumin ist Bestandteil der Javanischen Gelbwurz (*Curcumae xanthorrhizae rhizoma*) aus der Familie der Ingwergewächse (*Zingiberaceae*) und wird in weiten Teilen des tropischen Asiens kultiviert (CAC Araújo et al., 2001). Aufgrund seiner vielfältigen biologischen Aktivitäten (antiinflammatorisch, antibakteriell, antioxidativ etc.) wird es als Heilpflanze verwendet (CAC Araújo⁺ et al., 2001).

In den Migrationsversuchen dieser Arbeit zeigte sich nach Vorinkubation mit Curcumin keine signifikante Inhibition der PDGF-BB (10 ng/ml) induzierten Chemotaxis. In einer Konzentration von 100 µM wurde die Migration im Durchschnitt um 6±7 % (n = 9) gehemmt.

Iloroi et al. (2003) zeigten an glatten Gefäßmuskelzellen aus der Rattenaorta, die mit einem rekombinanten Adenovirus infiziert wurden, dass die PDGF-BB induzierte

Migration, zusätzlich zu anderen MAP-Kinasen (ERK), ebenfalls über die JNK-Signalkaskade induziert wird. Die voneinander abweichenden Ergebnisse könnten Ursache unterschiedlicher Versuchsbedingungen sein.

Die p38 MAP-Kinase wurde erstmals in Hyperosmolaritätsexperimenten mit Hefepilzen identifiziert (Tibbles et al., 1999). p38 MAP-Kinasen werden durch inflammatorische Stimuli wie zum Beispiel TNF- α und IL-1 via MEK3, 4, 6 und 7 aktiviert und phosphorylieren ATF-2 (aktivierender Transkriptionsfaktor-2) (Tibbles et al., 1999).

Hedges et al. (1999) zeigten die Hemmung der Migration glatter Muskelzellen der Trachea am Hund durch den p38-Inhibitor SB203580. Hierbei resultierte die Aktivierung der p38-Kinase in der Phosphorylierung des HSP27 (Hitze-Schock-Protein 27), welches im Zusammenhang mit Veränderung des Zytoskeletts durch intrazellulären Stress und Zellwachstum gesehen wird.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Experimente, die PDGF-BB induzierte Migration mit den p38-MAP-Kinase-Inhibitoren SB203580 und SB202190 (1 μ M und 10 μ M) zu inhibieren, zeigten keinen signifikanten Einfluß auf die Chemotaxis humaner glatter Gefäßmuskelzellen.

Der antimigratorische Effekt von Cicaprost erfolgt über die Stimulation der Adenylatzyklase, was die Beteiligung eines Gs-Protein gekoppelten Rezeptors und eine cAMP-abhängige Signaltransduktion impliziert. Braun et al. (1997) haben nachgewiesen, dass Cicaprost (100 nmol/L) eine 77-fache Zunahme des cAMP-Spiegels in humanen glatten Muskelzellen der Vena saphena magna induziert. Der Anstieg des cAMP-Spiegels durch Cicaprost war vergleichsweise stärker als der erreichte Effekt durch Forskolin. Dies zeigte sich in einem nur 23-fach erhöhten cAMP-Spiegel nach Zugabe von Forskolin (Braun et al., 1997).

In den Migrationversuchen dieser Arbeit zeigte sich nach Vorinkubation mit Cicaprost (100 nM) eine hochsignifikante Inhibition der Migration der Myozyten um 74 ± 4 %. Mit humanen arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen durchgeführte Migrationsversuche zeigten vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Die PDGF-BB (10 ng/ml) induzierte Migration wurde hier signifikant um 58 ± 16 % gehemmt.

Aus der Vorinkubation mit Forskolin (10 nmol/L) resultierte ebenfalls eine signifikante Hemmung der PDGF-BB induzierten Migration der glatten Muskelzellen um 55 ± 8 %. Experimente mit humanen arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen zeigten mit einer Inhibition der PDGF-BB-induzierten Migration um 47 ± 9 % ebenfalls die antimigratorische Potenz des Forskolin. Die antimigratorischen Effekte beider Substanzen an humanen venösen und arteriellen glatten Muskelzellen unterstreicht den hohen Stellenwert des zyklischen Adenosinmonophosphates (cAMP) in der antimigratorischen Signaltransduktion.

In Übereinstimmung mit diesen Überlegungen berichten Palmer et al. (1998), dass die Phosphodiesterase-Inhibitoren Cilostamide (PDE-3 selektiv) und Ro20-1724 (PDE-4 selektiv) die PDGF-BB induzierte Chemotaxis glatter Muskelzellen in Kombination mit Forskolin potent inhibieren. Der antimigratorische Effekt von Forskolin, einem Aktivator der Adenylatzyklase, wurde durch die PDE-Inhibitoren additiv verstärkt. Der alleinige Einsatz des PDE-Inhibitors Cilostamide und Ro20-1724 hatte keinen inhibitorischen Effekt auf die PDGF-BB induzierte Migration glatter Muskelzellen. Die Ergebnisse zeigten eine komplexe Interaktion der PDE-Inhibitoren 3 und 4 in Bezug auf die Forskolin induzierte Inhibition der Migration glatter Muskelzellen. Den PDE-Isoformen 3 und 4 kommt somit eine bedeutende Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion durch cAMP in glatten Muskelzellen zu (Palmer et al., 1998).

Trapidil wurde in früheren Studien (Bönisch et al., 1998) als direkter Aktivator der Proteinkinase A charakterisiert, der klinisch bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit eingesetzt wird, ohne eine Zunahme des cAMP-Spiegels zu induzieren. Chemisch ist Trapidil ein Triazolpyrimidin mit einem breiten Spektrum an biologischen Funktionen, wie zum Beispiel der Dilatation der Koronararterien, Hemmung der Thrombozytenfunktion und Stimulation der endothelialen Prostacyclinsekretion (Bönisch et al., 1998). Bönisch et al. (1998) konnten zeigen, dass Trapidil ein potenter Inhibitor der PDGF-BB induzierten Mitogenese ist.

Hoshiya & Awazu (1998) berichten ebenfalls über eine antimitogene Wirkung durch Trapidil, jedoch stellten sie eine Trapidil induzierte Erhöhung der cAMP-Spiegels fest, was sie dazu veranlaßte eine cAMP-abhängige Wirkung von Trapidil zu postulieren. Da die beobachtete Trapidil-induzierte cAMP-Spiegelelevation um das 1,3 bis 1,9 fache relativ gering war, spekulieren Hoshiya & Awazu (1998), dass neben der leichten cAMP-Induktion durch Trapidil selbst auch dem Umweg über eine Prostacyclinfreisetzung induzierte cAMP-Spiegelerhöhung durch Trapidil eine wichtige Bedeutung zukommen könnte. Eine putative PDGF-Rezeptor (PDGF-R) antagonistische Wirkung des Trapidil (Gesualdo et al., 1994) wurde von Hoshiya & Hawaza (1998) angezweifelt, da ihre Beobachtungen keine Trapidil-induzierte Inhibition der PDGF induzierten Tyrosinkinase-Aktivität zeigten. Weiter konnten sie zeigen, dass die Substrate der Tyrosinkinase, wie zum Beispiel die PI-3-Kinase, die eine wichtige Rolle in der Mitogenese glatter Muskelzellen zu spielen scheint, nicht durch diese phosphoryliert wurde. Dies veranlasst Hoshiya & Hawaza (1998) zu der Annahme, dass sich die Wirkung von Trapidil weiter peripher in der Signalkaskade manifestieren muss.

Der antimitogene Effekt von Cicaprost auf glatte Muskelzellen wird ebenfalls auf eine Induktion der Adenylatzyklase und die darauf folgende Aktivierung der PKA zurückgeführt (Bönisch et al., 1998; Osinski et al., 2000).

Die Migrationsexperimente mit Trapidil (100 µmol/L) zeigten eine signifikante Inhibition der PDGF-BB induzierten Migration und legten nahe, dass die Aktivierung der PKA möglicherweise eine bedeutende Rolle für den antimigratorischen Effekt des Prostacyclin-Mimetikums Cicaprost spielt. Nach Vorinkubation mit Trapidil wurde die Chemotaxis der Zellen um 40±9 % reduziert. In den mit humanen arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen durchgeführten Migrationsversuchen zeigten sich, mit 34±6 prozentiger Hemmung der Migration vergleichbare antimigratorische Effekte auf die PDGF-BB induzierte Chemotaxis der Myozyten .

Die Proteinkinase A stellt sich auf diese Weise als ein weiteres Glied der Signalkaskade zur Hemmung der Zellmigration humaner glatter Muskelzellen dar.

Ein wichtiges Merkmal des in dieser Arbeit verwendeten Migrations-Assays ist die eindeutige Messbarkeit nur migratorisch bedingter Effekte auf die Myozyten, da die Fähigkeit zur Proliferation gänzlich durch die Vorbehandlung der Myozyten mit Hydroxyharnstoff gehemmt wurde. Dies spielt eine entscheidende Rolle, denn es gibt zum Teil starke Überlappungen in den Signalkaskaden der PDGF-BB induzierten Migration und Proliferation glatter Muskelzellen. Ein einzelner Signalweg kann verschiedene Zellantworten auslösen. Es ist möglich, dass die Kinetik und die Intensität des transduzierten Signals darüber entscheiden, welcher Signalweg induziert wird (Heldin et al., 1998; Nelson et al., 1998). Als ein Beispiel berichten Heldin et al. (1998), dass die PI-3-Kinase als Musterbeispiel für die Vielfältigkeit einer einzelnen Komponente der Signaltransduktion in verschiedenen Zelltypen eine außerordentliche Vielzahl von Signalkaskaden „beschreitet“. Die PI-3-Kinase aktiviert Ras und wird wiederum selbst durch Ras induziert. Desweiteren ist eine Induktion der kleinen

GTPasen bindenden Proteine Rho, Rac und Cdc 42 eng assoziiert mit der Aktivierung durch die PI-3-Kinase (Heldin et al., 1998).

Die Bedeutung der ERK-Signalkaskade in der PDGF-BB induzierten Migration glatter Muskelzellen wird kontrovers diskutiert. Der MEK-1 Inhibitor PD 98059 reduziert die PDGF-BB induzierte Migration in glatten Muskelzellen, aquiriert aus Ratten- und Kaninchenaorten (Graf et al., 1997; Cospedal et al., 1999), wohingegen glatte Muskelzellen aus Mausearten keine Reduktion der Migration zeigten (Kraemer et al., 1999). Graf et al. (1997) arbeiteten mit glatten Muskelzellen aus der Rattenaorta und humanen glatten Muskelzellen aus der Umbilikalvene. Sie zeigten eine signifikante Hemmung der Wachstumsfaktor induzierten Migration durch den MEK-Inhibitor PD98059 an tierischen und humanen glatten Muskelzellen. Um die herausragende Rolle der MAP-Kinase Kaskade als Signalweg der Chemotaxis glatter Muskelzellen weiter zu bekräftigen, benutzten Graf et al. (1997) Antisense-Oligodesoxynukleotide gegen ERK1 und ERK2 Messenger-RNA und zeigten eine signifikante Suppression der MAP-Kinase-Proteinsynthese sowie eine konsekutive Inhibition der PDGF-BB induzierten Chemotaxis der Myozyten. Kraemer et al. (1999) zeigten mit ihren Versuchen keine Verbindung zwischen der Migration glatter Muskelzellen aus der Maus und der MAP-Kinase Kaskade. Der MEK1/2-Inhibitor PD98059 (15 $\mu\text{mol/L}$) hatte keine hemmenden Effekt auf die PDGF-BB oder NGF induzierte Chemotaxis der Myozyten.

Die Versuche dieser Arbeit zeigen eine signifikante, PD98059 induzierte, Inhibition der Migration glatter Muskelzellen, was ein Hinweis darauf ist, dass die ERK1/2-Aktivierung einen bedeutenden Beitrag zur PDGF-BB induzierten Migration nach mechanischer Verletzung humaner glatter Muskelzellen der Vena saphena magna leistet. Die Hemmung der MEK1/2 durch deren spezifischen Inhibitor, PD98059 (100 $\mu\text{mol/L}$), reduzierte die Anzahl in den Wundspalt migrierter glatter Muskelzellen um 59 ± 7 %. Die hochsignifikante aber nicht komplette Inhibition der Chemotaxis lässt vermuten, dass die MAP-Kinase Kaskade eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der Motilität humaner glatter Muskelzellen spielt, andere Signalwege jedoch wahrscheinlich sind. PDGF-BB induzierte eine deutliche ERK1/2-Phosphorylierung mit einem Maximum zwischen 10 und 30 Minuten. Dieser Effekt wurde durch Cicaprost signifikant inhibiert. Die im Western-Blot nachgewiesene ERK1/2-Phosphorylierung zeigte durch ihren transienten Charakter eine deutliche zeitliche Abhängigkeit der PDGF-BB (10 ng/mL) induzierten MAP-Kinase-Aktivierung. Die nach 15 minütiger Vorinkubation mit Cicaprost (100 nmol/L) beobachtete Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung im Western-Blot machte es wahrscheinlich, dass cAMP induziert durch Cicaprost inhibitorisch mit der MAP-Kinase Kaskade interagiert.

In einer anderen Studie haben Nelson et al. (1998) zwei PDGF-BB induzierte Phasen der ERK1/2-Aktivierung in humanen, venösen glatten Muskelzellen beschrieben. Das mit nach 15 Minuten frühe Phosphorylierungsmaximum korreliert mit der PDGF-BB induzierten Migration, wohingegen die späte ERK-Aktivierung, nach 1 - 4 Stunden, mit der Proliferation der glatten Muskelzellen assoziiert war. Durch intervallförmige Applikation des MEK-1 Inhibitors PD98059 wurde ermittelt, dass innerhalb der ersten 15 Minuten nach Stimulation der Myozyten mit PDGF-BB die Zugabe von PD98059 die Chemotaxis inhibierte. Im Zeitraum über die 15 Minuten hinaus blieb die Migration durch die PD98059-Applikation unbeeinflusst (Nelson et al., 1998). Die positive Korrelation dieser Ergebnisse macht eine zeitabhängige Induktion der Migration und Proliferation über die gleiche Signalkaskade sehr wahrscheinlich und wäre so eine adäquate Erklärung für die Wirkung des MEK-Inhibitors PD98059 auf beide Zellantworten.

Auf Grund dieser Beobachtung scheint die Inhibition der ERK-Phosphorylierung durch Cicaprost, eine erhebliche Bedeutung für das beobachtete antimigratorische Potential des Prostacyclinmimetikums zu haben. Der Mechanismus der Interaktion zwischen dem erhöhten cAMP-Spiegel und der ERK-Signalkaskade ist Gegenstand der momentanen Forschung (Bornfeldt & Krebs, 1999). Die Inhibition der Raf1- und Rap1-Aktivität könnte eine Rolle spielen (Bornfeldt und Krebs, 1999; Wang et al., 2001).

Da die Effektor-Domäne von Rap1 der von Ras gleicht wird postuliert, dass eine Aktivierung von Rap1 eine kompetitive Hemmung der Bindung von Ras an Raf induziert (Bornfeldt & Krebs, 1999). Bornfeldt & Krebs (1999) berichten ebenfalls über die PKA unabhängige Aktivierung der MAP-Kinase/ERK Signalkaskade über das Protein Epac (exchange protein directly activated by cAMP) das cAMP bindet und selektiv Rap1 aktiviert indem es als Guaninnukleotid-Austauschfaktor fungiert. Wang et al., 2001 berichten über die cAMP-PKA induzierte Inhibition von ERK durch die direkte Interaktion der PKA, via Phosphorylierung von Raf-1, an zwei Aminosäureresten, was wiederum die Ras-Bindung und die Raf-1-Aktivierung unterbindet. Trotz vieler Ansätze ist der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen cAMP/PKA und der MAP-K/ERK-Signalkaskade weiterhin nicht genau definiert (Bornfeldt & Krebs, 1999).

Eine zweite wichtige Signalkaskade, die in die im Zellkern durch PDGF-BB induzierten Effekte involviert ist, ist die PI-3-Kinase (Heldin & Westermark, 1999). Es besteht die berechnete Annahme, daß die Aktivierung der PI-3-Kinase an der Aktinorganisation und an Veränderungen des Zytoskeletts, welche die Chemotaxis regulieren, beteiligt ist (Wennström et al., 1994; Duronio, 1998; Jiménez et al., 2000). Jiménez et al. (2000) zeigten eine PDGF-BB/PI-3-Kinase induzierte Aktivierung der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac mit nachfolgenden Zytoskelettveränderungen, die essentiell für die Migration sind. Cdc42 wird über die Bindung an die regulatorische Untereinheit, p85, der PI-3-Kinase aktiviert und induziert wiederum N-WASP (N-Wiskott-Aldrich Syndrom family Protein). Rac hingegen wird durch die katalytische Untereinheit, p110, der PI-3-Kinase aktiviert und triggert Effektoren wie zum Beispiel Pak (p21-aktivierte Kinase) (Jiménez et al., 2000). Die Rolle der PI-3-Kinase Aktivierung in der Zellmigration ist jedoch weiterhin nur marginal verstanden. Sowohl in glatten Muskelzellen aus der Aorta von Ratten als auch von Kaninchen wurde PDGF-BB induzierte Migration der Myozyten weder durch LY294002 noch durch Wortmannin, zwei spezifische Inhibitoren der PI-3-Kinase Signalkaskade, beeinflußt (Higaki et al., 1996; Cospedal et al., 1999). Beide Autoren benutzten eine modifizierte Boyden-Kammer, die die Chemotaxis der glatten Muskelzellen nach einigen Stunden zeigte. Im Gegensatz dazu ließ sich PDGF-AB induzierte Migration caniner glatter Muskelzellen aus der Pulmonalarterie, durch LY294002 und Wortmannin hemmen (Yamboliev et al., 2001). Eine Erklärung für die stark abweichenden Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen könnte in der Verwendung unterschiedlicher Zellen liegen, wobei die vielen Abweichungen in der Signaltransduktion eindeutig für zellindividuelle Signalkaskaden der Migration sprechen. Higaki et al. (1996) erklärten daß es möglicherweise PI-3-Kinase abhängige und unabhängige chemotaktische Signalwege gibt und verschiedene Zellen unterschiedliche Signalkaskaden haben.

Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit zeigten im Migrationsassay nach mechanischer Verletzung eine signifikante Inhibition der PDGF-BB induzierten Migration glatter Muskelzellen durch zwei verschiedene Inhibitoren der PI-3-Kinase. In einer Konzentration von 1 µmol/L reduzierte LY294002 die PDGF-BB (10 ng/mL) induzierte Migration der Myozyten um 26±6 % (n = 6). Bei einer Konzentration von 10 µmol/L, die als spezifisch für die Hemmung der PI-3 Kinase gilt (Vlahos et al., 1994), inhibierte

LY294002 wirkungsvoll die Zellmigration um 86 ± 3 %. Mit LY294002 (10 μ M) durchgeführte Migrationsexperimente an humanen arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen zeigten ebenfalls eine eindeutige Hemmung der PDGF-BB induzierten Chemotaxis um 68 ± 8 %.

Diese konzentrationsabhängige, hochsignifikante Inhibition der Zellmotilität durch den PI-3-Kinase Inhibitor LY294002 charakterisiert die PI-3-Kinase als ein zentrales Element der Signaltransduktion der PDGF-BB induzierten Migration humaner glatter Muskelzellen.

Ein weiteres die PI-3-Kinase inhibierendes Pharmakon ist Rapamycin (Sirolimus), das einen Komplex mit dem FKBP12-Rezeptor (FK506 binding protein) bildet und verschiedene Substrate wie das FKBP-12-rapamycinassoziierte Protein (mTOR) und die p70^{S6}-Kinase hat, welche eine Rolle in der Progression des Zellzyklus spielen und die DNA- und Proteinsynthese beeinflussen (Reinhard et al., 1992; Lane et al., 1993; Poon et al., 1996). Rapamycin (Sirolimus) ist ein klinisch eingesetztes Immunsuppressivum. Es wird durch das Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* synthetisiert und dient hauptsächlich der prophylaktischen Immunsuppression nach Organtransplantation. Der Wirkungsmechanismus basiert auf der Suppression der Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten (Krensky et al., 2001).

In dieser Arbeit inhibierte Rapamycin signifikant die Chemotaxis glatter Muskelzellen, und macht so die Beteiligung der p70^{S6}-Kinase oder der Substrate von mTor an der PDGF-BB induzierten Migration nach mechanischer Verletzung wahrscheinlich. Nach Vorinkubation der glatten Muskelzellen mit Rapamycin (10 nmol/L) resultierte eine 57 ± 5 prozentige Abnahme der PDGF-BB induzierten (10 ng/mL) Migration der Myozyten in den Wundspalt.

Die von Poon et al. (1996) gezeigte Inhibition PDGF-BB induzierter Zellmigration durch Rapamycin, an humanen und aus Ratten aquirierten glatten Muskelzellen aus der Aorta, unterstützen diese Überlegungen. Die therapeutischen Wirkungen von Rapamycin wurden in der Prävention der Neointimabildung am Schweinmodell (Suzuki et al., 2001) und am Menschen gezeigt (Sousa et al., 2001). Sousa et al. (2001) zeigten das erste Mal an 30 Patienten mit KHK, dass durch die Implantation eines Stent, der mit Rapamycin beschichtet war, eine Neointimaproliferation nach PTCA signifikant inhibiert werden konnte. Post Ballon-Angioplastie erreichte keiner der 30 behandelten Patienten die definitionsgemäß geforderte 50 prozentige Stenosierung, um die Kriterien einer Restenose zu erfüllen. Mit Sirolimus versehene Stents scheinen vier Monate nach Implantation eine stenosierende Neointimaproliferation zu verhindern (Sousa et al., 2001). Der Beweis einer Langzeitwirkung bleibt noch zu erbringen. Suzuki et al. (2001) verglichen die Wirkung von Sirolimus beschichteten Stents mit Dexamethason-Stents bezüglich ihres Potentials die neointimale Hyperplasie post PTCA zu inhibieren. Im Vergleich zu „reinen“ Metallstents zeigte sich bei der Verwendung eines mit Rapamycin beschichteten Stents eine 50-prozentige Inhibition der Neointimahyperplasie. Sirolimus in Kombination mit Dexamethason hatte keinen additiven Effekt.

Das wichtigste Substrat der PI-3-Kinase ist die Proteinkinase Akt, die wachstumsfaktor-induziert an zwei Aminosäureresten phosphoryliert wird (Vanhaesebroeck & Alessi, 2000). Die Akt-Phosphorylierung am Aminosäurerest Thr308 durch die Phosphoinositid abhängige Kinase-1 (PDK-1), ist im Gegensatz zur Identifikation der Kinase, die verantwortlich ist für die Phosphorylierung des Aminosäurerestes Ser473, etabliert (Toker, 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine PDGF-BB induzierte Akt-Phosphorylierung

an beiden Aminosäureresten Thr308 und Ser473. Die Phosphorylierung an beiden Resten wird durch Cicaprost beeinflusst. Im Western-Blot zeigten sich maximale Akt-Phosphorylierungsraten nach Stimulation mit PDGF-BB (10 ng/mL) bei 10 Minuten und 30 Minuten. Nach Vorinkubation von Cicaprost (100 nmol/L) über 15 Minuten resultierte eine partielle Abschwächung des Phosphorylierungssignals an beiden Aminosäureresten (Threonin 308 und Serin 473). Auch hier zeigte sich eine zeitabhängige Phosphorylierungsrate.

Ein weiterer spezifischer Inhibitor der PI-3-Kinase ist das 2-(4-Morpholinyl-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY 294002) (Vlahos et al., 1994). Durch LY294002 (10 µmol/L) konnte im Western-Blot eine komplette Hemmung der PDGF-BB (10 ng/mL) induzierten Akt-Phosphorylierung erreicht werden. Beide Aminosäurereste, Thr308 und Ser473, waren von der Hemmung der Phosphorylierung betroffen.

Diese Ergebnisse unterstützend zeigten Kim et al. (2001) und Wang et al. (2001) eine cAMP induzierte Inhibition der Akt-Phosphorylierung an beiden Aminosäureresten. Kim et al. (2001) zeigten ebenfalls eine Inhibition der PDK1 durch die Hemmung ihrer Translokation in die Plasmamembran und nicht durch die Hemmung der PDK-Aktivität.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit, könnten eine Nutzung der positiven Effekte von Prostacyclin und deren Analoga auf die Atherogenese und Neointimaproliferation nach PTCA in Tiermodellen bringen (Braun et al., 1993; Isogaya et al., 1995; Banning et al., 1997; Numaguchi et al., 1999; Alt et al., 2000).

Braun et al. (1993) berichteten das erste Mal über die Auswirkungen der oralen Applikation des Prostacyclinmimetikums Cicaprost auf die Progression atherosklerotischer Läsionen im Kaninchenmodell, nach cholesterinreicher Diät über 12 Wochen. Cicaprost inhibierte signifikant die Bildung atheromatöser Läsionen und verbesserte die Endothelfunktion. Unter cholesterinreicher Diät zeigte sich eine signifikante Reduktion der Synthese von Prostacyclin (PGI₂). Offensichtlich korrelierte die Hemmung der Prostacyclinsynthese mit dem Ausmaß der Gefäßschädigung durch atheromathöse Plaquebildung. Cicaprost induzierte eine partielle Verbesserung der eingeschränkten endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit der Gefäße erzielt (Braun et al., 1993).

Das Prostacyclinanalogon Beraprost reduzierte klar, nach subkutaner Applikation, die Ausbildung einer Restenose nach PTCA im Tiermodell am Kaninchen (Isogaya et al., 1995). Isoyaga et al. (1995) verglichen die Wirkung von Beraprost und dem Thrombozytenaggregationshemmer Azetylsalizylsäure (ASS). Eine Population von 65 Kaninchen wurde in sechs verschiedenen Gruppen mit unterschiedlichen Behandlungsregimen aufgeteilt. Beraprost (100 µg/kg 2x/Tag für 30 Tage) induzierte eine signifikante Reduktion der Ausbildung einer Restenose nach vorgenommener PTCA. Ebenfalls erfolgreich war die Applikation von Beraprost (100 µg/kg 2x/Tag) über 2 Tage. Im Vergleich dazu zeigte sich unter ASS (30 mg/Tag) und Beraprost (50 µg/kg 2x/Tag) plus ASS (30 mg/Tag) keine signifikante Inhibition der Ausbildung einer Restenose innerhalb eines Zeitraumes von vier Wochen post PTCA. Isoyaga et al. (1995) postulierten aufgrund ihrer Ergebnisse eine inhibitorische Wirkung des Prostacyclinanalogons Beraprost auf die Thrombozytenaktivierung mit konsekutiver Reduktion der PDGF-Freisetzung durch die Thrombozyten.

Harada et al. (1999) verglichen die Wirkung von Beraprost (300 µg/kg/Tag), subkutan appliziert, und dem Prostacyclin-Synthase Gentransfer auf die Neointimabildung nach PTCA im Rattenmodell. Beide Verfahren hatten den gleichen positiven Effekt auf die Reduktion der Neointimaformation. Im Gegensatz zum Prostacyclinsynthase-Gentransfer wurde in der Gruppe der Tiere die mit Beraprost (300 µg/kg/Tag),

systemisch appliziert, behandelt wurden eine signifikante Verlängerung der Blutungszeit (BZ) festgestellt. Am vierzehnten Tag post PTCA war die BZ von 145 ± 7 Sekunden auf 185 ± 9 Sekunden angestiegen. Weiterhin wurde eine vermehrte Neigung zur Ausbildung von Hämatomen bei den mit Beraprost ($300 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$) behandelten Ratten beobachtet. Die Thrombozytenzahl blieb sowohl durch die Beraprostapplikation als auch den Prostacyclinsynthese Gentransfer unbeeinflusst (Harada et al., 1999). Harada et al. (1999) bewerteten aufgrund ihrer Beobachtungen das Verfahren des Prostacyclin-Synthese Gentransfers als das risikoärmere, da hierbei keine Blutungskomplikationen auftraten. Schrör (1997) berichtete über eine weitere unerwünschte Wirkung unter der Behandlung mit Prostacyclinanaloga. Eine potente vasodilatierende Wirkung die einen signifikanten Abfall des Blutdruckes zur Folge haben kann. Bei Patienten mit fortgeschrittener Atherosklerose oder Koronarsklerose mit hämodynamisch relevanter Stenosierung der Gefäße, kann eine Senkung des reaktiv erhöhten Perfusionsdruckes zum Beispiel des Herzens oder Gehirns zu einem Abfall des Perfusionsdruckes führen mit konsekutiver Ischämie des Stromgebietes der betroffenen Arterie (Schrör, 1997). Andererseits ließe sich die vasodilatierende Wirkung der Prostacyclinmimetika therapeutisch bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) nutzen, da in diesem Falle eine Vasodilatation sinnvoll ist (Schrör, 1997). Numaguchi et al. (1999) und Todaka et al. (1999) zeigten beide im Rattenmodell einen inhibierenden Effekt auf die Neointimabildung nach PTCA, induziert durch Gentransfer der Prostacyclin-Synthese und konsekutiver endogener Prostacyclinspiegelerhöhung, in glatten Muskelzellen. Der Hauptmetabolit des sehr kurz wirksamen Prostacyclins ist das 6-Keto-PGF_{1 α} und wurde in beiden Arbeitsgruppen als Surrogat-Parameter der induzierten Prostaglandinsynthese eingesetzt. Die Fokussierung der Autoren auf die neointimale Hyperplasie als Maß für den Erfolg des Verfahrens läßt jedoch einen bedeutenden Faktor der Ausbildung einer Restenose nach Ballon-Angioplastie außer Acht. Post PTCA ist die elastische Retraktionskraft der Gefäßwand ein entscheidender Faktor der zur Ausbildung einer Restenose führen kann (Serruy et al., 1994). Alt et al. (2000) untersuchten das Problem der Restenose nach PTCA mit der immer mehr in den Vordergrund gelangenden Methode der Stentimplantation einem Verfahren der interventionellen Kardiologie. Im Tiermodell an Schafen und Schweinen wurden nach Ballon-Angioplastie mit Hirudin und Prostacyclin beschichtete Stents implantiert. Hirudin ist ein Protein gewonnen aus Blutegeln das thrombininhibitorisch wirkt. Die Idee war durch lokale Applikation die nicht unerheblichen Nebenwirkungen der systemischen Prostacyclinapplikation zu vermindern. Eine sukzessive Freisetzung ermöglichte einen lokalen kontinuierlichen Wirkspiegel der Stoffe. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Neointimaformation und keine histologischen Anzeichen für eine Stent induzierte Entzündungsreaktion. Die Vermeidung der Induktion einer inflammatorischen Reaktion im Gebiet des implantierten Stent führen die Autoren auf die Verwendung einer Polylaktatpolymerbeschichtung des Stent zurück. Banning et al. (1997) zeigten einen interessanten Ansatz für den möglichen klinischen Einsatz des Prostacyclinanalogons Iloprost. Ähnlich wie beim Einsatz zum Beispiel Prostacyclin beschichteter Stents (Alt et al., 2000) ist hier das Ziel das Prostacyclin möglichst lokal seine inhibierenden Effekte auf die Neointimaformation induzieren zu lassen um systemische Nebenwirkungen zu minimieren. Als Vehikel fungieren Thrombozyten die intrazellulär Iloprost aufgenommen haben. Durch kurze starke Stromimpulse kann die Plasmamembran der Plättchen reversibel permeabel gemacht werden (Banning et al., 1997). Iloprost diffundiert daraufhin dem Konzentrationgradienten folgend in die Thrombozyten, wenn sich spannungsinduziert die Permeabilität ändert. Aufgrund einer direkten Beziehung zwischen Thrombozytenadhäsion und dem frühen Verschluss von Gefäßen nach PTCA (Banning

et al., 1997) ist anzunehmen, daß die Thrombozyten direkt dort ihre Wirkung entfalten können wo es indiziert ist. Durch den Einsatz derart modifizierter Plättchen konnte am Schwein eine signifikante Reduktion der Adhäsion von Thrombozyten an der dilatierten Stelle erreicht werden.

Die hier beobachtete Hemmung der Migration glatter Muskelzellen ist ein wichtiger Mechanismus, der zur antiatherosklerotischen/antistenotischen Wirkung von Prostacyclin-Mimetika bzw. PGI₂- Gentransfer beitragen könnte.

5 Literaturverzeichnis

Abendi H, Zachary I. Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovasc Res* 1995; 30:544-556.

Ai S, Kuzuya M, Koike T, Asai T, Kanda S, Maeda K, Shibata T, Iguchi A. Rho-Rho kinase is involved in smooth muscle cell migration through myosin light chain phosphorylation-dependant and independant pathway. *Atherosclerosis* 2000; 155:321-327.

Alt E, Haehnel I, Beilharz C, Prietzel K, Preter D, Stemberger A, Fliedner T, Erhard W, Schömig A. Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting—A new biodegradable stent coating releasing hirudin and the prostacyclin analogue Iloprost. *Circulation* 2000; 101:1453-458.

Anand-Apte B, Zetter B. Signaling mechanisms in growth factor-stimulated cell motility. *Stem Cells* 1997; 15:259-267.

Aspenström P. Effectors for the rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 95-102.

Banning A, Brewer L, Wendt M, Groves PH, Cheadle H, Penny WJ, Crawford N. Local delivery of platelets with encapsulated iloprost to balloon injured pig carotid arteries: effect on platelet deposition and neointima formation. *Thromb Haemost* 1997; 77:190-96.

Bennet MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res* 1999; 41:36–368.

Bönisch D, Weber A-A, Wittpohl M, Osinski M, Schrör K. Antimitogenic effects of trapidil in coronary artery smooth muscle cells by direct activation of PKA. *Mol Pharmacol* 1998; 54:241-248.

Bornfeld KE, Raines EW, Nakano T, Graves LM, Krebs EG, Ross R. Insulin-like growth factor-1 and PDGF-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest* 1994; 93:1266-1274.

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.

Braun M, Hohlfeld T, Kienbaum P, Weber A-A, Sarbia M, Schrör K. Antiatherosclerotic effects of oral cicaprost in experimental hypercholesterolemia in rabbits. *Atherosclerosis* 1993; 103:93-105.

Braun M, Pietsch P, Schrör K, Bauman G, Felix SB. Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 1999; 41:395-401.

Braun M, Pietsch P, Zepp A, Schrör K, Baumann G, Felix SB. Regulation of TNF α and IL-1 β induced adhesion molecule expression in human vascular smooth muscle cells by cAMP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2568-2575.

Cannon-Carlson S, Tang J. Modification of Laemmli sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis procedure to eliminate artifacts on reducing and nonreducing gels. *Anal Biochem* 1997; 246:146-148.

Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells-critical events in restenosis. *Circulation* 1992; 86:723-729.

- Chan TO, Ritterhouse SE, Tschlis PN. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:965-1014.
- Clowes AW. Regulation of smooth muscle cell proliferation and migration. *Transplantation Proc* 1999; 31:810-811.
- Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR. PKB (c-Akt): a multifunctional mediator of PI-3-K activation. *Biochem J* 1998; 335:1-13.
- Concepcion J, Portela AR, Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Collard J, Serrano A, Martine AC, Avila J, Carrera AC. Role of PI-3-K regulatory subunit in the control of actin organisation and cell migration. *J Cell Biol* 2000; 151:249-261.
- Corvera S, Czech MP. Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. *Trends Cell Biol* 1998; 8:442-446.
- Cospedal R, Abedi H, Zachary I. PDGF-BB regulation of migration and focal adhesion kinase phosphorylation in rabbit aortic vascular smooth muscle cells: roles of PI-3-K and MAPKs. *Cardiovasc Res* 1999; 41:708-721.
- Couffinhal T, Duplaa C, Moreau C, Lamaziere JMD, Bonnet J. Regulation of vascular cell adhesion molecule - 1 and intercellular adhesion molecule - 1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74:225-234.
- Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM. Serine/Threonine protein kinase and apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; 256:34-41.
- Darius H, Nixdorff U, Zander J, Rupprecht HJ, Eberl R, Meyer J. Effects of coprostene on restenosis rate during therapeutic transluminal coronary angioplasty. *Prostaglandins in the Cardiovascular System, 1992 Birkhäuser Verlag, Basel: 305-311.*
- Davis RJ. The MapK signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993; 268:14553-14556.
- Derman MP, Toker A, Hartwig JH, Spokes K, Falck JR, Chen CS, Cantley LC, Cantley LG. The lipid products of phosphoinositol 3-kinase increase cell motility through protein kinase C. *J Biol Chem* 1997; 272:6465-6470.
- Duckworth BC, Cantley LC. Conditional inhibition of the MapK cascade by wortmannin. *J Biol Chem* 1997; 272:27665-670.
- Duronio V, Scheid MP, Ettinger S. Downstream signalling events regulated by phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Cell Signal* 1998; 10:233-239.
- Fallier-Becker P, Rupp J, Fingerle J, Betz E. Smooth muscle cell from rabbit aorta. In: Piper HM. *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*. 1990.
- Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, Virmani R. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation* 1999; 99:44-52.
- Gesualdo L, Di Paolo S, Ranieri E, Schena FP. Trepidil inhibits human mesangial cell proliferation: effect on PDGF β -receptor binding and expression. *Kidney Int* 1994; 46:1002-1009.

- Graf K, Xi XP, Yang D, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by smooth muscle cells. *Hypertension* 1997; 29:334-339.
- Graves LM, Bornfeldt KE, Sidhu JS, Argast GM, Raines EW, Ross R, Leslie CC, Krebs EG. PDGF stimulates PKA through a MapK dependent pathway in human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; 27:505-511.
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Front Cell Biol* 1998; 279:509-514.
- Hara S, Morishita R, Tone Y, Yokoyama C, Inoue H, Kaneda Y, Ogihara T, Tanabe T. Overexpression of prostacyclin synthase inhibits growth of vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 216:862-867.
- Harada M, Toki Y, Numaguchi Y, Osanai H, Ito T, Okumura K, Hayakawa T. Prostacyclin synthase gene transfer inhibits neointimal formation in rat balloon-injured arteries without bleeding complications. *Cardiovasc Res* 1999; 43:481-491.
- Hauck CR, Hsia DA, Schläpfer DD. Focal adhesion kinase facilitates PDGF-BB-stimulated erk2 activation required for chemotaxis migration of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001; 275:41092-41099.
- Hayashi K, Takahashi M, Kimura K, Nishida W, Saga H, Sobue K. Changes in the balance of phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B and the Mitogen-activated protein kinase (ERK/P38MAPK) determine a phenotype of visceral and vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1999; 145:727-740.
- 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, 274:24211-24219.
- Heldin CH, Östman A, Rönstrand L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1378:79-113.
- Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and In vivo role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiol Res* 1999; 79:1283-316.
- Higaki M, Sakaue H, Ogawa W, Kasuga M, Shimokado K. Phosphatidylinositol 3-kinase-independent signal transduction pathway for platelet-derived growth factor-induced chemotaxis. *J Biol Chem* 1996; 271:29342-29346.
- Hoshiya M, Awazu M. Trapidil inhibits PDGF stimulated MapK cascade. *Hypertension* 1998; 31: 665-671.
- Hsieh CC, Lau YT. Migration of vascular smooth muscle cells is enhanced in cultures derived from spontaneously hypertensive rat. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 1998; 435:286-292.
- Hughes AD, Clunn GF, Refson J, Demoliou - Mason C. Platelet - Derived Growth Factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle. *Gen Pharmacol* 1996; 27:7:1079-1089.
- Iroji T, Yamamori M, Yagi K, Hirai M, Zhan Y, Kim S, Iwao H. Dominant negative c-Jun inhibits PDGF-directed migration by VSMC. *J Pharmacol Sci* 2003, 91:145-148.

- Isogaya M, Yamada N, Koike H, Ueno Y, Kumagai H, Ochi Y, Okazaki S, Nishio S. Inhibition of restenosis by beraprost sodium (a Prostaglandin I₂ analogue) in the atherosclerotic rabbit artery after angioplasty. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25:947-952.
- Jones SM, Kazlauskas A. Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling. *Nat Cell Bio* 2001; 3:165-172.
- Kasper HU, Schmidt A, Roessner A. Expression of the adhesion molecules ICAM, VCAM, and ELAM in arteriosclerotic plaque. *Gen Diagn Pathol* 1995; 141:289-294.
- Kim S, Jee K, Kim D, Koh H, Chung J. Cyclic AMP inhibits akt activity by blocking the membrane localization of PDK1. *J Biol Chem* 2001; 276:12864-12870.
- Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanrolle P, Cheresch DA. Regulation of cell motility by MAPK. *J Cell Biol* 1997; 137:481-492.
- Kockx MM, Knaapen MWM. The role of apoptosis in vascular disease. *J Pathol* 2000; 190:267-280.
- Kohno M, Yokohawa K, Yasunari K, Kano H, Minami M, Ueda M, Kawa J. Effect of natriuretic peptide family on the oxidized LDL- induced migration of human coronary artery smc. *Circ Res* 1997; 81:585-590.
- Kolch W. Meaningful relationship: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interaction. *Biochem J* 2000; 351:289-305 .
- Koyama N, Harada K, Yamamoto A, Morisaki N, Saito Y, Yoshida S. Purification and characterisation of an autocrine migration factor for vascular smc, smc-derived migration factor. *J Biol Chem* 1993; 268:13301-13308
- Koyoma H, Olson NE, Dastvan FF, Reidy MA. Cell replication in the arterial wall- activation of signaling pathway following in vivo injury. *Circ Res* 1998; 82:713-721.
- Kraemer R, Nguyen H, March KL, Hempstead B. NGF activates similar intracellular signalling pathways in vascular smooth muscle cells as PDGF-BB but elicits different biological responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1041-1050.
- Kundra V, Escobedo JA, Kazlauskas A, Kim HK, Rhee SG, Williams LT, Zetter BR. Regulation of chemotaxis by the PDGF receptor- β . *Nature* 1994; 367:474-476.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- Landau C, Lange RA, Hillis LD. PTCA. *New Engl J Med* 1994; 330: 981-993.
- Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 2000; 247:349-358.
- Lim L, Manser E, Leung T, Hall C. Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases- The p21 ras-related rho subfamily and its role in phosphorylation signaling pathways. *Eur J Biochem* 1996; 242:171-185.
- Löbel P, Steinhagen-Thissen E, Schrör K. Cholestyramin treatment of type IIa hypercholesterinemia normalizes platelet reactivity against prostacyclin. *Eur J Clin Invest* 1988; 18:256-260.

- Lopez - Ilasaca M, Li W, Uren A, Yu J, Kaslauskas A, Gutkind JS, Heidarman MA. Requirement of Phosphatidylinositol - 3 kinase for activation of JNK/SAPKs by PDGF. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232:273-277.
- Lopez - Ilasaca. Signaling from G - Protein - coupled receptors to Mitogen - activated (MAP) - kinase cascades. *Biochemical Pharmacology* 1998; 56:269-277
- Maghazachi AA. Intracellular signalling events at the leading edge of migrating cells. *Intern J Biochem Cell Bio* 2000; 32:931-943.
- Majack RA, Clowes A. W. Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by heparin-like glycosaminoglycans. *J Cell Physiol* 1984; 118:253-256.
- Matsumoto T, Yokote K, Tamura K, Takemoto M, Ueno H, Saito Y, Mori S. Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a ras-dependent pathway that is important for actin reorganisation and cell migration. *J Biol Chem* 1999; 274:13954-13960.
- McBride W, Lange RA, Hillis LD. Restenosis after successful coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1988; 318:1734-1737.
- McKenzie FR, Pouyssegur J. cAMP-mediated growth inhibition in fibroblasts is not mediated via mitogen-activated protein (MAP) kinase (ERK) inhibition. *J Biol Chem* 1996; 271:13476-13483.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiol Rev* 1999; 79:1193-1226.
- Neville DM Jr. Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J Biol Chem* 1971; 246:6328-6334.
- Nelson PR, Yamamura S, Mureebe L, Itoh H, Kent KC. Smooth muscle cell migration and proliferation are mediated by distinct phases of activation of the intracellular messenger mitogen-activated kinase. *J Vasc Surg* 1998; 27:117-125.
- Newby AC. An overview of the vascular response to injury: a tribute to the late Russell Ross. *Toxicol Lett* 2000; 112: 519 – 529.
- Newby AC. Molecular and cell biology of native coronary and vein-graft atherosclerosis: regulation of plaque stability and vessel-wall remodelling by growth factors and cell-extracellular matrix interactions. *Coron Artery Dis* 1997; 8:213-224.
- Newby AC, Zaltsman A. B. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* 2000; 190:300 -309.
- Nilius SM, Hasse A, Kuger P, Schrör K, Meyer-Kirchrath J. Agonist-induced long-term desensitization of the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett* 2000; 484:211-216.
- Numaguchi Y, Naruse K, Harada M, Osanai H, Mokuno S, Murase K, Matsui H, Toki Y, Ito Y, Okumura K, Hayakawa T. Prostacyclin synthase gene transfer accelerates reendothelialization and inhibits neointimal formation in rat carotid arteries after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:727-733.
- Okada T, Sakuma L, Fukui Y, Hazeki O, Ui M. Blockage of chemotactic peptide induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of PI-3-K. *J Biol Chem* 1994; 269:3563-3567.

- Osinski MT, Rauch BH, Schrör K. Antimitogenic actions of organic nitrates are potentiated by sildenafil and mediated via activation of PKA. *Mol Pharmacol* 2001; 59:1044-1050.
- Osinski MT, Weber AA, Schrör K. Complex actions of PKA inhibitors on mitogenesis of bovine coronary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 2000; 395:173-176.
- Owens GK. Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation. *Acta Physiol Scand* 1998; 164:623-635.
- Palmer D, Tsoi K, Maurice DH. Synergistic inhibition of vascular smooth muscle cell migration by phosphodiesterase 3 and phosphodiesterase 4 inhibitors. *Circ Res* 1998; 82:852-861.
- Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J Clin Invest* 1996; 98:2277-2283.
- Rankin S, Hooshmand-Rad R, Claesson-Welsh L, Rozengurt E. Requirement for PI-3-K activity in PDGF stimulated tyrosin phosphorylation of p125 FAK and Paxillin. *J Biol Chem* 1996; 271:7829-7834.
- Reiske HR, Kao SC, Cary LA, Guan JL, Lai JF, Chen HC. Requirement of PI-3-K in FAK-promoted cell migration. *J Biol Chem* 1999; 274:12361-12366.
- Roessner A, Schneider I, Kirkpatrick CJ, Böcker W. Gefäße. In: Böcker W, Denk H, Heitz U. (Eds.). *Pathologie, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1997.*
- Roovers K, Assoian RK. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* 2000; 22:818-826
- Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *New Engl J Med* 1999; 340:115-126.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-809.
- Sarkar R, Meinberg E, Stanley JC, Gordon D, Webb RC. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1996; 78:225-230.
- Scheid MP. Protein kinase B. *Current biology* 2000; 10:R358.
- Schrör K. Prostacyclin (Prostaglandin I₂) and atherosclerosis. In: Rubanyi GM, Dzau VJ. *The Endothelium in Clinical Practice. 1997 :1-44; Marcel Dekker, INC.*
- Schrör K, Löbel P, Steinhagen-Thiessen E. Simvastatin reduces platelet thromboxane formation and restores normal platelet sensitivity against prostacyclin in type IIa hypercholesterinemia. *Eicosanoids* 1989; 2:39-46
- Shin EY, Kim SY, Kim EG. c-Jun N-terminal kinase is involved in motility of endothelial cells. *Exp Mol Med* 2001, 33,:276-283.
- Sigematsu K, Koyama H, Olson NE, Cho A, Reidy MA. Phosphoinositol 3-Kinase signaling is important for smooth muscle cell replication after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2373-2378
- Stoker M, Gherardi E. Regulation of cell movement: the motogenic cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072:81-102.

- Surreys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emannuellson H, Marco J, Legrand V, Materme P, Belardi J, Sigwart U, Colombo A, Goy JJ, van den Heuvel P, Declan J, Morel M. A comparison of Balloon-expandible-Stent implantation with Balloon Angioplastie in patients with coronary artery disease. *New Engl J Med* 1994; 331:489-495.
- Suzuki T, Kopia G, Hayashi SI, Bailey LR., Llanos G, Wilensky R, Klugherz BD, Papandreou G, Narayan P, Leon MB, Yeung AC, Tio F, Tsao PS, Falotico R, Carter AJ. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 2001; 104:1188-1193.
- Takahashi E, Berk BC. MAP kinases and vascular smooth muscle function. *Acta Physiol Scand* 1998; 164:611-621.
- Tan, Lusinskas FW, Homer-Vanniasinkam S. Cellular and molecular mechanisms of inflammation and thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999; 17:373-389.
- Tibbles LA, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55:1230-1254.
- Todaka T, Yokoyama C, Yanamoto H, Hashimoto N, Nagata I, Tsukahara T, Hara S, Hatae T, Morishita R, Aoki M, Ogihara T, Kaneda Y, Tanabe T. Gene transfer of human prostacyclin synthase prevents neointimal formation after carotid balloon injury in rats. *Stroke* 1999; 30:419-426.
- Toker A. Protein kinases as mediators of PI-3-kinase signalling. *Mol Pharmacol* 2000; 57: 652-658.
- Tolias KF, Cantley LC, Carpenter CL. Rho family GTPases bind to PI-K. *J Biol Chem* 1995; 270:17656-17659.
- Ui M, Okada T, Hazeki K, Hazeki O. Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, PI-3-K. *Trends Biochem Sci* 1995; 20:303-306.
- Valhos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3 kinase, 2-(4- Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY 294002). *J Biol Chem* 1994; 269:5241-5248.
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000; 346:561-576.
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lesson from sudden coronary death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1262-1275.
- Walsh DA, Van Patten SM. Multiple pathway signal transduction by the cAMP - dependent protein kinase. *FASEB J* 1994; 8:1227-1236.
- Wang L, Liu F, Adamo ML. Cyclic AMP inhibits extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by inhibiting Rap1. *J Biol Chem* 2001; 276:37242-37249.
- Weber A-A, Schrör K. The significance of platelet-derived growth factors for proliferation of vascular smooth muscle cells. *Platelets* 1999; 10:77-96.
- Weber A-A, Zucker TP, Hasse A, Bönisch D, Wittpoth M, Schrör K. Antimitogenic effects of vasodilatory prostaglandins in coronary artery smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 1998; 93: Suppl 3, 54-57.

Wright KL, Ward SG. Interactions between Phosphatidylinositol 3-Kinase and nitric oxide: Explaining the paradox. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; 4:137-143.

Yamboliev IA, Chen J, Gerthoffer WT. PI-3-K and src kinase regulate spreading and migration of VSMCs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281:709-718.

Zohlhöfer D, Klein CA, Richter T, Brandl R, Murr A, Nührenberg T, Schömig A, Baeuerle PA, Neumann FJ. Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy. *Circulation* 2001; 103:1396-1402.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. KARSTEN SCHRÖR möchte ich für die Aufnahme in das Institut, für die Überlassung des Themas und die Arbeitsmöglichkeiten innerhalb seines Institutes herzlich danken.

Frau Dr. MARINA BRAUN und Herrn Priv.-Doz. Dr. ARTUR-ARON WEBER danke ich für die hervorragende und engagierte Betreuung während aller Phasen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, die mich bei der Durchführung meiner Arbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Gisela und Fritz Wiebel und meiner Freundin Caterina Schulte-Eversum für tatkräftige Unterstützung in allen Lebenslagen.

Den Herstellerfirmen möchte ich für die freundliche Überlassung der Substanzen danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Martin Wiebel
Anschrift: Sternstr. 42, 44137 Dortmund
Geburtsdatum: 21.05.1976
Geburtsort: Mönchengladbach
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: römisch-katholisch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1982 - 1986 Katholische Grundschule Günhoven
1986 - 1992 Gymnasium Rheindahlen
1992 - 1995 Math.-Nat. Gymnasium Mönchengladbach

Zivildienst

09/ 1995 - 09/ 1996 Krankenhaus Maria Hilf GmbH, Sandradstrasse
43, 41061 Mönchengladbach

Berufsausbildung

10/ 1996 - 12/ 2003 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf
03/1999 Physikum
03/2000 1. Staatsexamen
Seit 04/2000 Doktorand am Institut für Pharmakologie und
Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf; Direktor: Prof. Dr. med. K.
Schrör
01/2001 United States Medical Licensing Examination
Step1

08/2002	2. Staatsexamen
01/2003	United States Medical Licensing Examination Step2
12/2003	3. Staatsexamen
03/2004	Arzt im Praktikum im St.-Johannes Hospital Dortmund, Kardiologie
10/2004	Assistenzarzt im St.-Johannes Hospital Dortmund, Kardiologie

Dortmund den 25.11.2004

Zusammenfassung

Die Atherosklerose ist die Hauptursache für die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und im Besonderen für die Manifestation als Myokardinfarkt, zerebralem Insult sowie als periphere arterielle Verschlusskrankheit. Eine der wichtigsten Komponenten in der Pathophysiologie der Atherosklerose ist die Wachstumsfaktor-induzierte Migration medialer glatter Gefäßmuskelzellen (SMC) in die Intima des Gefäßes. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Migrationverhalten von SMC aus der Vena saphena magna untersucht. Hauptaugenmerk lag auf der Untersuchung der für die Inhibition der Migration bedeutsamen Signalkaskaden. Die Chemotaxis der kultivierten SMC wurde in einem etablierten *in vitro*-Modell für Zellmigration nach mechanischer Verletzung untersucht.

Es ist bekannt, dass Prostacyclin verschiedene biologische Funktionen von SMC, wie zum Beispiel Proliferation, Matrixproduktion und Expression von Adhäsionsmolekülen, moduliert. Die möglichen antimigratorischen Wirkungen von Prostacyclin auf humane SMC und die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch bislang nur unzureichend untersucht.

Diese Arbeit beschreibt eine signifikante Inhibition der „platelet-derived growth factor-BB“ (PDGF-BB)-induzierten Migration humaner SMC, aus der Vena saphena magna durch das Prostacyclin-Mimetikum Cicaprost. Sowohl Forskolin (als direkter Aktivator der Adenylatzyklase) als auch Trapidil (als ein direkter Aktivator der Proteinkinase A) führten zu einer signifikanten Hemmung der Zellmigration. Die Aktivierung der Adenylatzyklase und der Anstieg des cAMP-Spiegels mit nachfolgender Aktivierung der PKA spielen somit wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Inhibition der Zellmigration durch Cicaprost. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit hemmende Effekte von Cicaprost auf zwei für die Regulation der Zellmotilität bedeutsame Signalkaskaden, nämlich der ERK- und PI-3-Kinase-Kaskade nachgewiesen. Mit den spezifischen Inhibitoren der PI-3-Kinase LY294002 bzw. Wortmannin wurde eine signifikante Hemmung der Chemotaxis von SMC erreicht. Durch die Inkubation der Myozyten mit dem MEK-Inhibitor PD98059 konnte die Migration von SMC ebenfalls signifikant reduziert werden.

Der in dieser Arbeit gezeigte antimigratorische Effekt von Cicaprost könnte eine wichtige Bedeutung, sowohl für die physiologischen Wirkungen als auch für die therapeutischen Einsatzmöglichkeiten von Prostacyclin bzw. dessen Mimetika, haben.