

# **Der Einfluss vasodilatatorischer Prostaglandine auf fokale Adhäsionen und den Phänotyp glatter Muskelzellen der menschlichen Aorta**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Claudia Bulin  
aus Suhl

Düsseldorf  
2005

Referent: Prof. Dr. rer. nat. J.W. Fischer

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. P. Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 2005

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

# Inhaltsverzeichnis

## 1 EINLEITUNG

1.1	Vorstellung und Zielsetzung der Arbeit.....	1
1.2	Atherosklerose .....	2
1.2.1	Die Bedeutung von COX, PGI <sub>2</sub> und PGE <sub>2</sub> in der Atherosklerose .....	4
1.2.2	Synthese, Signaltransduktion und Wirkungen von PGE <sub>2</sub> und PGI <sub>2</sub> .....	5
1.3	Aktin-Zytoskelett, Fokale Adhäsionen und Fokale Adhäsionskinase .....	7
1.3.1	Das Aktin-Zytoskelett.....	7
1.3.2	Die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts für Migration, Proliferation, Form und Kontraktilität der Zellen.....	8
1.3.3	Fokale Adhäsionen und die Rolle der Fokalen Adhäsionskinase.....	12
1.4	Regulation von Tyrosin-Phosphorylierungen.....	14
1.4.1	Tyrosinkinase.....	14
1.4.2	Tyrosinphosphatasen .....	15

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1	Materialien .....	18
2.1.1	Substanzen und Wachstumsfaktoren.....	18
2.1.2	Chemikalien und Kits .....	19
2.1.3	Immunochemikalien .....	19
2.1.4	Zellkultur .....	20
2.1.5	Verbrauchsmaterialien .....	21
2.1.6	Puffer und Lösungen.....	21
2.2	Geräte .....	22
2.3	Zellkultur.....	24
2.3.1	Kultivierung menschlicher glatter Gefäßmuskelzellen .....	24
2.3.2	Durchführung der Experimente .....	24
2.4	RT-PCR.....	25
2.5	Immuncytochemie.....	27
2.6	Proteinanalyse .....	28
2.6.1	Probenvorbereitung und elektrophoretische Auftrennung im Polyacrylamidgel.....	28

2.6.2	Western Blot.....	28
2.6.3	Hybridisierung und Detektion von Proteinen.....	28
2.7	Bestimmung von cyclo-Adenosinmonophosphat.....	29
2.8	Migrations-Assay.....	30
2.9	Messung der DNA-Synthese.....	31
2.10	Genexpressions-Analyse.....	31
2.10.1	Puffer und Lösungen.....	33
2.10.2	RNA-Isolierung.....	34
2.10.3	Aufreinigung der RNA.....	34
2.10.4	RNA-Qualitätskontrolle.....	34
2.10.5	cDNA-Synthese.....	34
2.10.6	Aufreinigung und Konzentrierung der cDNA.....	36
2.10.7	<i>In-vitro</i> Transkription (IVT).....	36
2.10.8	Aufreinigung und Konzentrierung der biotinylierten cRNA.....	37
2.10.9	Fragmentierung der cRNA.....	37
2.10.10	Hybridisierung.....	37
2.10.11	Färbung und Detektion.....	38
2.10.12	Qualitätskontrolle und Expressionsanalyse.....	38

### 3 ERGEBNISSE

3.1	Expression von IP- und EP-Rezeptoren in hASMC.....	41
3.2	Der Einfluss von Iloprost und PGE <sub>2</sub> auf Zytoskelett und fokale Adhäsionen.....	42
3.3	Einfluss von Iloprost und PGE <sub>2</sub> auf den Phosphorylierungsgrad von Proteinen fokaler Adhäsionen.....	44
3.3.1	Zeitabhängige Veränderung des FAK-Phosphorylierungsgrades durch Iloprost.....	44
3.3.2	Konzentrationsabhängigkeit der FAK-Hypophosphorylierung durch Iloprost.....	45
3.3.3	cAMP-abhängige morphologische Veränderungen in hASMC.....	46
3.3.4	cAMP-Abhängigkeit der FAK-Hypophosphorylierung durch Iloprost.....	47
3.3.5	cAMP-Abhängigkeit der FAK-Hypophosphorylierung durch PGE <sub>2</sub> .....	48
3.3.6	Vergleich Iloprost- und PGE <sub>2</sub> -induzierter Hypophosphorylierungen der FAK.....	49
3.3.7	Veränderung der Phosphorylierungsgrades von Paxillin durch Iloprost und PGE <sub>2</sub> .....	50
3.4	Mechanismen der FAK-Hypophosphorylierung durch Iloprost.....	51
3.4.1	Beteiligung von Tyrosinkinasen.....	51
3.4.2	Beteiligung von Tyrosinphosphatasen.....	53

3.4.3	Quantitative Analyse der Wirkungen von Tyrosinkinase- und Tyrosinphosphatase-Inhibitoren .....	55
3.4.4	Beteiligung von Rho-GTPasen an den Effekten nach Iloprost- bzw. PGE <sub>2</sub> -Stimulation....	56
3.5	Unterschiedliche cAMP-Freisetzung durch Iloprost und PGE <sub>2</sub> .....	57
3.6	Unterschiedliche Migrationshemmung durch Iloprost und PGE <sub>2</sub> .....	58
3.7	Regulation von Proliferation und Zellzyklusproteinen.....	60
3.7.1	Hemmung der DNA-Synthese .....	60
3.7.2	Einfluss von Iloprost und PGE <sub>2</sub> auf die Expression der Zellzyklusproteine p27 <sup>Kip1</sup> und Cyclin D <sub>1</sub> .....	61
3.8	Genexpressionsanalyse zum Einfluss von Iloprost auf hASMC .....	63
3.8.1	Verifizierung von Arraydaten: Amphiregulin .....	64

## 4 DISKUSSION

4.1	Expression der IP- und EP-Rezeptoren in hASMC .....	65
4.2	Der Einfluss von Iloprost und PGE <sub>2</sub> auf Fokale Adhäsionen und Aktin-Zytosklett glatter Gefäßmuskelzellen.....	66
4.2.1	Die unterschiedliche FAK-Hypophosphorylierung durch Iloprost und PGE <sub>2</sub> – Auswirkungen auf Proliferation und Migration von hASMC .....	66
4.2.2	Mechanismen der Hypophosphorylierung durch Iloprost – Beteiligung von Phosphatasen	68
4.2.3	Die Protein-Tyrosinphosphatase SHP-2.....	69
4.2.4	Mechanismen der Hypophosphorylierung durch Iloprost - Die Rolle von Rho .....	70
4.2.5	Mechanismen der Rephosphorylierung nach Iloprost-Stimulation - Die Rolle von Tyrosin-Kinasen und Rho .....	71
4.3	Der Einfluss von Iloprost und PGE <sub>2</sub> auf die atherogenen Prozesse Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen.....	73
4.3.1	Der antiproliferative Effekt von Iloprost und PGE <sub>2</sub> .....	73
4.3.2	Der differentielle antimigratorische Effekt von Iloprost und PGE <sub>2</sub> .....	75
4.4	Genexpressionsanalyse – Diskussion regulierter Gene .....	76
4.4.1	Regulation von Genen des Zellzyklus.....	76
4.4.2	Regulation von Genen des Zytoskeletts .....	77
4.4.3	Regulation von Genen der EZM .....	79
4.4.4	Regulation von Wachstumsfaktoren .....	80
4.5	Fazit & Schlusshypothese .....	82
4.6	Ausblick .....	84

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>112</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>113</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Adenylatzyklase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> , Cyclin-abhängige Kinase
COX	Cyclooxygenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamino –N,N,N',N'- tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FA	fokale Adhäsion
FAK	fokale Adhäsionskinase
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fötales Rinderserum
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
G-Protein	Guanylnukleotide-bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein-2</i>
GSK-3 $\beta$	Glycogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$
GTP	Guanosintriphosphat
hASMC	<i>human aortic smooth muscle cell</i> , menschliche glatte Muskelzellen der Aorta
HBSS	<i>Hanks buffered salt solution</i> , Hanks' gepufferte Salzlösung
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin

kDa	kilo Dalton
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPA	Lysophosphatidsäure
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>MAPK kinase kinase</i>
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit Tween 20
PDGF-BB	<i>platelet derived growth factor</i> , Homodimer der B-Ketten
PG	Prostaglandin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> , Prostacyclin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i>
PTK	Protein-Tyrosinkinase
PTP	Protein-Tyrosinphosphatase
PTP-PEST	<i>PTP-prolin, glutamate, serine, threonine sequence protein</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SH-Domäne	<i>src homology domain</i>
SMC	<i>smooth muscle cell</i> , glatte Muskelzellen
Sos	„ <i>son of sevenless</i> “
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TXA	Thromboxan

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Zielsetzung der Arbeit

Atherosklerotischen Gefäßerkrankungen liegt eine Dysfunktion des Endothels zugrunde. Unter dem Einfluss vermehrt ausgeschütteter Zytokine und Wachstumsfaktoren dedifferenzieren glatte Muskelzellen bereits in frühen Stadien der Atherosklerose und entwickeln eine ausgeprägte Fähigkeit zu Proliferation, Migration und Sezernierung von extrazellulärer Matrix. Ein Faktor, der die proliferativen Eigenschaften entdifferenzierter glatter Muskelzellen unterstützt ist der mitogene Stimulus PDGF-BB. Die Produktion vasoaktiver Verbindungen wie Prostaglandine und Thromboxan A<sub>2</sub> durch Cyclooxygenasen wird ebenfalls kausal mit dem Fortschreiten der entzündlichen, atherosklerotischen Gefäßveränderungen assoziiert. Der atheroprotektive Nutzen einer Cyclooxygenase-Inhibition unterliegt jedoch einer kontroversen Diskussion. Sie hat sich durch die aktuellen Ergebnisse zu den selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitoren (z.B. Rofecoxib, Valdecoxib) erneut verschärft. Wie Untersuchungen zur Balance von Prostacyclin und Thromboxan A<sub>2</sub> exemplarisch zeigen, spielt das Verhältnis der Prostaglandine zueinander eine entscheidende Rolle. Vergleichende Studien sind für das Verständnis um die komplexen Regulationsmechanismen in arteriellen Gefäßen von wachsender Bedeutung.

1. Im Fokus dieser Arbeit stand die Gegenüberstellung der Wirkungen von Prostacyclin und Prostaglandin E<sub>2</sub> an PDGF-BB-stimulierten glatten Muskelzellen der menschlichen Aorta hinsichtlich:

- a. ihrer Effekte auf fokale Adhäsionen und Zytoskelett,
- b. der Identifizierung vermittelnder Rezeptoren und Signaltransduktionswege,
- c. ihrer Effekte auf den Phänotyp (Proliferation, Migration).

2. Der zweite Teil konzentrierte sich auf den Einfluss von Prostacyclin auf die PDGF-BB-induzierte Genexpression. So sollten für die Prostacyclin-Wirkungen verantwortliche Kandidatengene identifiziert werden.

## 1.2 Atherosklerose

Atherosklerose ist die Folge eines pathologischen Prozesses im subendothelialen Gewebe elastischer und muskulärer Arterien. Dieser ist gekennzeichnet durch eine chronische Entzündung und fibroproliferative Reparaturmechanismen in der Arterienwand. Diverse Faktoren werden mit einem erhöhten atherosklerotischen Risiko assoziiert. Dazu zählen a) ein erhöhter Cholesterin-Spiegel im Plasma, besonders des *low density lipoprotein* (LDL), b) Bluthochdruck, c) Rauchen, d), Übergewicht e) Diabetes mellitus, f) ein erhöhter Homozystein-Spiegel, g) Immunreaktionen des Körpers auf Infektionen (Chlamydien). Die resultierende endotheliale Dysfunktion gilt als initiales Ereignis der Atherosklerose (Ross und Fuster, 1996; Hajjar et al., 1986; Kuo et al., 1993).

Die physiologischen Funktionen des Endothels sind vielfältig. Es dient als Permeabilitätsbarriere, wirkt antithrombogen und antiadhäsiv, produziert Proteoglykane, Kollagene und andere Matrixmoleküle sowie Zytokine und Wachstumsfaktoren und reguliert den Gefäßtonus durch Bildung vasoaktiver Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), Endothelin, Angiotensin II. Eine endotheliale Dysfunktion stellt somit eine fundamentale Störung innerhalb eines komplex organisierten Regulationssystems dar. Eingeschränkte Vasodilatation oder eine übermäßige Vasokonstriktion atherosklerotischer Gefäße sind nur einige der möglichen Folgen.

Im Verlauf der Atherosklerose entwickeln sich Läsionen innerhalb der Intima der Arterienwand. Dabei treten 3 kritische Vorgänge in den Vordergrund:

- die Migration, Proliferation und Akkumulation von Monozyten / Makrophagen, T-Lymphozyten, Thrombozyten und glatten Gefäßmuskelzellen (*smooth muscle cell*, SMC),
- die Bildung einer Bindegewebsmatrix aus Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) wie Kollagenen und Proteoglykanen durch SMC,
- die Akkumulation von Lipiden in Makrophagen (Schaumzellen).

Eine ausgebildete Plaque besitzt eine fibröse Kappe. Sie umgibt einen nekrotischen Kern, der extra- und intrazellulär eingelagerte Fette sowie T-Zellen, Makrophagen und SMC enthält (Übersicht in: Ross und Fuster, 1996).

Den SMC kommt während der Entstehung und Reifung von Plaques eine Schlüsselrolle zu. Sie liegen als kontraktile Zellen in der Media der Arterienwand vor. Bereits in frühen atherosklerotischen Stadien transformieren sie vom kontraktilen, stationären zum synthetischen Phänotyp und entwickeln eine ausgeprägte Fähigkeit zur Replikation und

Migration. Transformierte, dedifferenzierte SMC produzieren vermehrt Moleküle der EZM (z.B. Fibronectin), chemotaktische Stoffe (Interleukin-8 = IL-8; *Monocyte Chemotactic Protein-1* = MCP-1) und sezernieren proinflammatorische Zytokine (IL-1, Tumornekrosefaktor  $\alpha$  = TNF $\alpha$ , *Transforming Growth Factor*  $\beta$  = TGF $\beta$ ), die die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche und die Infiltration von Leukozyten fördern (Rainger und Nash, 2001).

Die umgebende EZM hat Einfluss auf die Transformation von SMC. Dabei erfolgt die Interaktion zwischen EZM und Zelle über Integrin-Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen. *In vitro* wurde auf Fibronectin ein rascher Wechsel vom kontraktilen zum synthetischen SMC-Phänotyp festgestellt, Laminin trägt zum Erhalt des kontraktilen Typs bei (Hedin et al., 1988). Die Beeinflussung von SMC-Proliferation und -Migration durch EZM-Moleküle wurde ebenfalls in anderen Arbeiten untersucht (Wary et al., 1996; Zhu et al., 1996; Hynes, 1992; Hynes und Lander, 1992). Somit unterliegen Proliferation und Migration von SMC sowohl einer Regulation durch Wachstumsfaktoren als auch einer Regulation durch Komponenten der EZM.

Die Progression der Atherosklerose wird mit einer veränderten Balance der Cyclooxygenasen (COX) in Verbindung gebracht. In atherosklerotischen Läsionen konnten beide Isoformen, COX-1 und COX-2, nachgewiesen werden (Schonbeck et al., 1999; Belton et al., 2000). Die PGI<sub>2</sub>-Synthese erfolgt maßgeblich COX-2-vermittelt (McAdam et al., 1999; Catella-Lawson, 2001). Die Induktion von COX-2 durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren bei entzündlichen Prozessen atherosklerotischer Gefäße gilt als Schutzmechanismus, um die beeinträchtigte endotheliale Synthese des vasodilatatorischen und Plättchenaggregation-hemmenden PGI<sub>2</sub> zu kompensieren (Dembinska-Kiec et al., 1977; Rimarachin et al., 1994; Mitchell und Evans, 1998). Parallel wird so, der besonders in aktivierten Plättchen, COX-1-vermittelten Synthese von vasokonstriktorischem und aggregationsförderndem Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) entgegengewirkt (Belton et al., 2000; Catella-Lawson, 2001).

Bedingt durch die erhöhte COX-2-Expression kommt es gleichzeitig zu einer verstärkten Produktion von vasodilatatorischem Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Wohlfeil und Campbell, 1999; Yamamoto et al., 1999).

### 1.2.1 Die Bedeutung von COX, PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> in der Atherosklerose

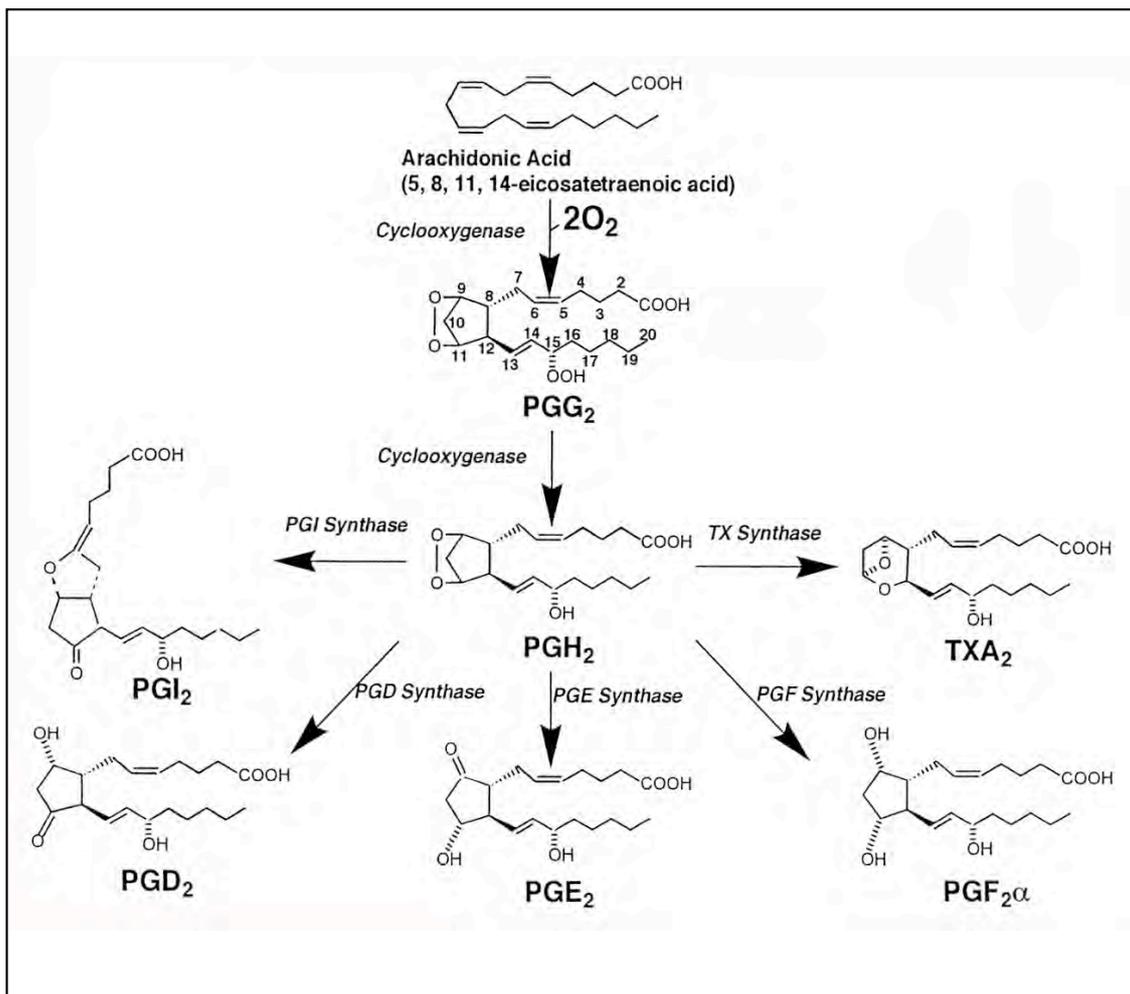
Die Rolle der Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 und ihrer Produkte PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> im Verlauf atherosklerotischer Prozesse wird kontrovers diskutiert. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien belegen sowohl eine Proliferationshemmung als auch eine Migrationshemmung durch PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub>, in der Konsequenz also einen antiatherosklerotischen Effekt (Yamamoto et al., 1999; Libby et al., 1988; Braun et al., 1993).

Im Gegensatz dazu stehen proliferative und promigratorische Effekte von PGE<sub>2</sub> (Pasricha et al., 1992; Blindt et al., 2002). Außerdem bewirkt PGE<sub>2</sub>, u.a. nach Chlamydien-Infektion mit anschließender COX-2-Induktion, eine verstärkte Matrix-Metalloproteinase-Bildung (MMP), die zur Plaque-Instabilität beiträgt (Rupp et al., 2004). Durch COX-2-Inhibitor konnte die MMP-Produktion reduziert werden (Cipollone et al., 2001). PGE<sub>2</sub> induziert ferner die Synthese von Hyaluronsäure, einem proatherogenen Molekül, durch Induktion von Hyaluronsäure-Synthase 2 (HAS-2) (Sussmann et al., 2004). Eine COX-2-Hemmung könnte somit eine naheliegende antiatherosklerotische Strategie darstellen.

Dies gilt auch im Hinblick auf die verstärkte Expression der proinflammatorischen COX-2 in atherosklerotischen Läsionen als Orten ausgeprägten Entzündungsgeschehens (Schonbeck et al., 1999). Burleigh et al. stellen nach COX-2-Inhibition eine Reduktion atherosklerotischer Läsionen in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen fest (Burleigh et al., 2002). Doch erlauben auch die Arbeiten zur selektiven COX-2-Hemmung keine eindeutige Interpretation. Pratico et al. finden weder einen positiven noch einen negativen Einfluss der COX-2-Hemmung auf das Fortschreiten der Atherosklerose. Erst die nichtselektive COX-Hemmung durch Indomethacin und die reduzierte Produktion von sowohl PGI<sub>2</sub> wie auch TXA<sub>2</sub> führt zu einem Rückgang der Atherosklerose in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen (Pratico et al., 2001). In der VIGOR-Studie wurde ein erhöhtes Myokardinfarkt-Risiko unter Rofecoxib (COX-2-Inhibitor) verglichen mit dem nichtselektiven COX-Inhibitor Naproxen ermittelt (Bombardier et al., 2000). Es häufen sich Arbeiten, die die Bedeutung des Verhältnisses von COX-1 und COX-2 hervorheben. Diese Balance scheint über pro- oder antiatherosklerotische Konsequenzen mitzuentcheiden. Während COX-1 vornehmlich die TXA<sub>2</sub>-Synthese katalysiert, fördert COX-2 die PGI<sub>2</sub>-Produktion (Catella-Lawson, 2001; Belton et al., 2000). Eine selektive COX-2-Hemmung würde somit die TXA<sub>2</sub>-PGI<sub>2</sub>-Balance zu Gunsten des Vasokonstriktors und Plättchenaktivators TXA<sub>2</sub> verschieben. Dies könnte die beobachteten kardiovaskulären Zwischenfälle in Studien mit COX-2-Inhibitoren erklären (Cheng et al., 2002).

### 1.2.2 Synthese, Signaltransduktion und Wirkungen von PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>

Bei Schädigungen der Zellmembran wird membranständige Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) aktiviert und setzt Arachidonsäure (5,8,11,14-Eikosatetraensäure) aus den Phospholipiden der Zellmembran frei. Zu den Metaboliten der Arachidonsäure (Eikosanoide, Prostanoiden) gehören Prostaglandine (PG) und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Sie entstehen über die Zwischenstufen der zyklischen Endoperoxide PGG<sub>2</sub> und PGH<sub>2</sub> unter katalytischer Einwirkung der Cyclooxygenasen und spezifischer Synthasen.



**Abbildung 1** Biosynthese der Prostanoiden aus Arachidonsäure (nach Narumiya et al., 1999)

Die Cyclooxygenasen, auch Prostaglandin G/H-Synthasen (PGHS) genannt, existieren im Wesentlichen in 2 Isoformen, COX-1 und COX-2. COX-1 stellt die konstitutiv exprimierte Isoform dar und ist nahezu ubiquitär verbreitet, z.B. in Endothelzellen und in SMC (Vane und Botting, 1995). Bei der COX-2 handelt es sich um die induzierbare Isoform, deren Expression besonders durch inflammatorische Prozesse, wie rheumatoide Arthritis und auch

Atherosklerose, lokal gesteigert wird (Schonbeck et al., 1999). Beide Isoformen wurden in atherosklerotischen Plaques identifiziert (Schonbeck et al., 1999; Wong et al., 2001). Die natürlich vorkommenden Prostanoiden entstehen alle aus dem gleichen Vorläufermolekül, dem PGH<sub>2</sub>. Die Expression und die resultierende Balance der einzelnen Prostaglandin- und Thromboxan-Synthasen (Gewebespezifität, äußere Faktoren, etc.) ist somit ausschlaggebend für die Bildung der individuellen Prostaglandine PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub>. Es handelt sich um bioaktive Stoffe mit teilweise gegensätzlichen Effekten, die wegen sehr kurzer Halbwertszeiten nur lokal begrenzt auftreten und wirken. PG üben ihre spezifischen Wirkungen über heterotrimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die PG-Rezeptoren, aus (Namba et al., 1994; Übersicht in: Narumiya et al., 1999; Breyer et al., 1996).

PGI<sub>2</sub> wirkt außerordentlich stark vasodilatatorisch und antiaggregatorisch und darüberhinaus proliferations- und migrationshemmend auf SMC (Kothapalli et al., 2003; Koh et al., 1993; Kohyama et al., 2002; Numaguchi et al., 1999). Es bindet an den PGI<sub>2</sub>-Rezeptor (IP-Rezeptor), der an ein stimulatorisches G<sub>S</sub>-Protein gekoppelt ist. Die α-Untereinheit von G<sub>S</sub>-Proteinen führt über die Aktivierung der Adenylatzyklase (AZ) zu einer Freisetzung des intrazellulären Botenstoffes cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP) und zur nachfolgenden Aktivierung von Proteinkinase A (PKA).

Die Hemmung von Proliferation und Migration durch PGI<sub>2</sub> wird maßgeblich über eine Interaktion von cAMP/PKA-abhängigen Mechanismen mit der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Kaskade vermittelt (Wu et al., 1993). Die cAMP/PKA-medierte Phosphorylierung von Raf-1 reduziert dessen Affinität zu Ras und führt zur Hemmung des Ras/Raf-1/MEK/ERK-Weges (Bornfeldt und Krebs, 1999). Für die vasodilatatorische Wirkung von PGI<sub>2</sub> werden cAMP-abhängige und cAMP-unabhängige Mechanismen verantwortlich gemacht, die über die Öffnung von Kalium-Kanälen zur Hyperpolarisation und Relaxation von SMC führen (Übersicht in: Tanaka et al., 2004).

PKA kann darüberhinaus durch Phosphorylierung von *cAMP-responsive element binding protein* (CREB) die Transkription von Genen beeinflussen (Gonzalez und Montminy, 1989; Mayr et al., 2001).

PGI<sub>2</sub> sowie das stabile PGI<sub>2</sub>-Analogon Iloprost können auch an den G<sub>q</sub>-gekoppelten EP<sub>1</sub>-Rezeptor binden (Oka et al., 1993; Norel et al., 2004; Schwaner et al., 1992). Es kommt zur Aktivierung von Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinositol-bis-phosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. DAG aktiviert Proteinkinase C (PKC). Über IP<sub>3</sub> kommt es zur Öffnung von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen des endoplasmatischen Retikulums und einer Erhöhung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels, was u.a. eine übermäßige

Vasokonstriktion atherosklerotischer Gefäße erklären könnte. Diese könnte jedoch auch eine Folge der endothelialen Dysfunktion sein, die mit einer verminderten NO-Bildung einhergeht. Doch werden auch andere Mechanismen für den vasokonstriktorischen PGI<sub>2</sub>-Effekt diskutiert, wie z.B. eine Beeinflussung von TXA<sub>2</sub>-Rezeptoren bei hohen PGI<sub>2</sub>-Konzentrationen (Williams et al., 1994).

PGE<sub>2</sub> zeigt ebenfalls eine ausgeprägte vasodilatorische Wirkung; die Plättchenaggregation wird von PGE<sub>2</sub> jedoch nur in hohen Konzentrationen gehemmt (Vargaftig und Chignard, 1975). Wie PGI<sub>2</sub> inhibiert auch PGE<sub>2</sub> die Proliferation und Migration von SMC (Goncharova et al., 2003; Yamamoto et al., 1999; Proudfoot et al., 1999; Libby et al., 1988). Doch wurden für PGE<sub>2</sub> auch gegenteilige Reaktionen beschrieben. So fördert PGE<sub>2</sub> die Proliferation von pulmonalen SMC (Pasricha et al., 1992). Die selektive Stimulation des G<sub>i</sub>-gekoppelten, überexprimierten EP<sub>3</sub>-Rezeptors steigert die Migration von SMC (Blindt et al., 2002).

PGE<sub>2</sub> ist Ligand an speziellen PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren (EP-Rezeptoren), von denen 4 Subtypen, EP<sub>1-4</sub>, bekannt sind. EP<sub>2</sub> und EP<sub>4</sub> induzieren über eine G<sub>s</sub>-Kopplung die Freisetzung des Botenstoffes cAMP, der die Vasodilatation über die Öffnung von Kalium-Kanälen induziert (Zhu et al., 2002). cAMP wird, wie bereits für PGI<sub>2</sub> beschrieben, auch für die Proliferations- und Migrationshemmung durch PGE<sub>2</sub> verantwortlich gemacht. Die Stimulation des EP<sub>3</sub>-Rezeptors führt durch Kopplung an inhibitorische G<sub>i</sub>-Proteine zur Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration. Der EP<sub>1</sub>-Rezeptor koppelt an G<sub>q</sub>-Proteine und induziert über PLC eine Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Übersicht in: Narumiya et al., 1999).

### **1.3 Aktin-Zytoskelett, Fokale Adhäsionen und Fokale Adhäsionskinase**

#### **1.3.1 Das Aktin-Zytoskelett**

Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen ist ein dynamisches Netzwerk aus filamentösen Strukturen, das den Zellen mechanische Stabilität und Form verleiht. Es ist an bewegungsabhängigen Prozessen aber auch an der Vermittlung biologischer Zellfunktionen wie Wachstum und Teilung beteiligt. Drei interagierende Filamentsysteme werden anhand ihrer Komponenten und Größe unterschieden: die aus Aktinmonomeren zusammengesetzten Aktin- oder Mikrofilamente, die Intermediärfilamente und die Mikrotubuli.

In Muskelzellen bilden Aktin- und Myosinfilamente das sogenannte Sarkomer, das unter

Energieverbrauch zur Kontraktion des ganzen Muskels beiträgt. Nicht-muskuläre Zellen kennzeichnet ein dynamischer Auf- und Abbau der Aktinfilamente, es existiert keine permanente Aktinstruktur. Viele Zelltypen werden von langen Bündeln aneinander gelagerter Aktinfilamente, den Stressfasern durchzogen (Hall, 1998).

Das filamentöse Aktin (F-Aktin) wird aus monomerem Aktin (G-Aktin) unter Adenosintriphosphat-Verbrauch (ATP) gebildet. In der Nukleationsphase lagern sich mehrere Aktinmonomere zu einem Trimer zusammen. Während der Polymerisation kommt es zur Anlagerung weiterer Monomere. Aktinfilamente wachsen längsgerichtet. Die Anheftung der Monomere kann an beiden Enden erfolgen, allerdings in unterschiedlichen Raten. Es existiert ein schnell wachsendes (+) und ein langsam wachsendes (-) Ende. Aufgrund der ständigen Reorganisation des Zytoskeletts finden laufend Polymerisations- und Depolymerisationsprozesse statt (Yin und Stull, 1999).

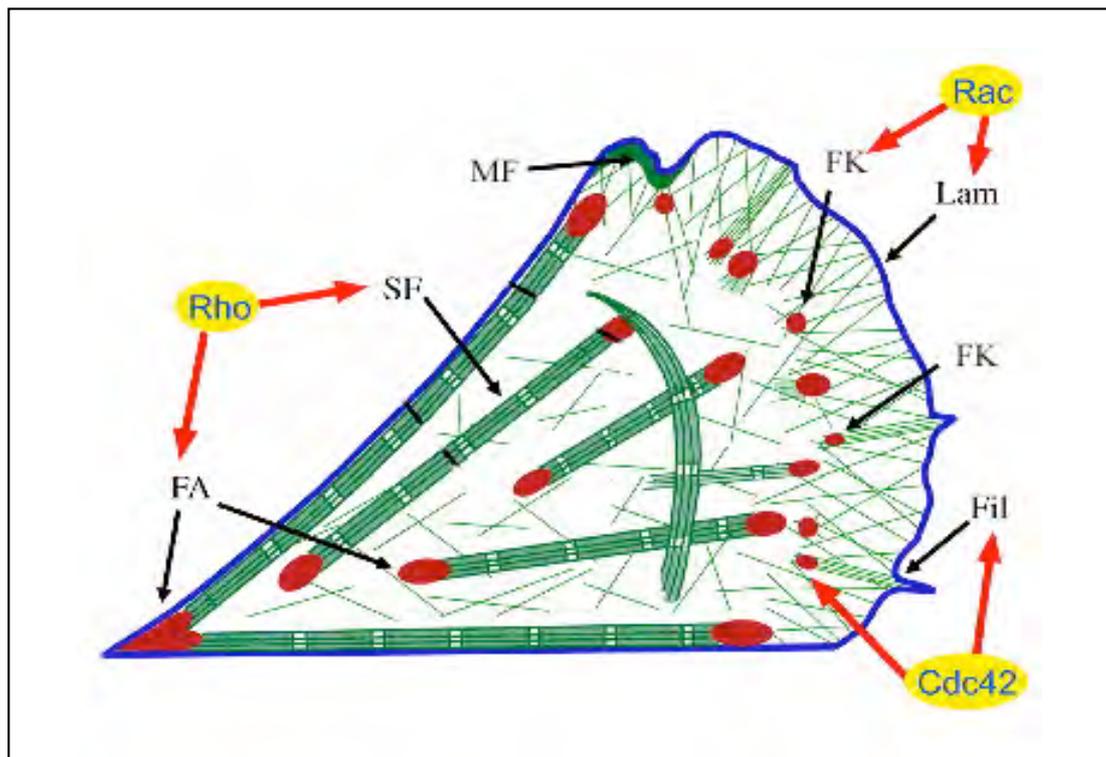
Viele Proteine assoziieren mit dem Aktin-Zytoskelett bzw. mit G-Aktin-Monomeren und stellen Zielmoleküle intrazellulärer Signalkaskaden dar (Dubreuil, 1991; Matsudaira, 1994). Diese Aktin-bindenden Proteine lassen sich nach ihrer Funktion in Gruppen einteilen. So sind Myosine an Kontraktionsprozessen,  $\alpha$ -Actinin an komplexeren Filamentstrukturen beteiligt. Andere Proteine (z.B. Talin) dienen der Verbindung der Aktinfilamente mit der zellulären Membran. Die Proteine des Arp2/3-Komplexes sorgen für die Nukleation monomeren Aktins und die Verzweigung von Aktinfilamenten (Higgs und Pollard, 2001). Es gibt Proteine, die an das schnell wachsende Ende binden (Cap-Proteine), so dass nur das langsam wachsende Ende zur Filamentverlängerung zur Verfügung steht. Ein Protein, das an das langsam wachsende Ende bindet, ist Tropomodulin (Fischer und Fowler, 2003). An der Depolymerisation von Aktinfilamenten sind Proteine wie das Gelsolin beteiligt (Sun et al., 1999).

### **1.3.2 Die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts für Migration, Proliferation, Form und Kontraktilität der Zellen**

Das Aktin-Zytoskelett ist eine dynamische Struktur, die durch bestimmte Stimuli und während der Zellzyklus-Progression raschen Veränderungen seiner Form und Organisation unterliegt. So kennzeichnet migrierende Zellen ein ständiger Wechsel aus Neubildung und Auflösung von Adhäsionspunkten (*turnover*). Relativ langlebige Adhäsionskontakte zwischen Zellmembran und EZM sind die fokalen Adhäsionen (FA), die durch Rho-Aktivierung entstehen. Rho initiiert die Bildung von Aktinstressfasern, die mit den FA assoziieren (Hall et al., 1998; Ridley und Hall, 1992).

Rho gehört zur Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine. Inaktives GDP-Rho liegt im Zytosol gebunden an *Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitors* (RhoGDI) vor. Die Aktivierung von Rho erfolgt durch *Rho-guanine nucleotide exchange factors* (RhoGEF) und erzeugt membranständiges GTP-Rho. Als wichtiger Effektor von Rho wurde Rho-Kinase (p160ROCK) identifiziert. Sie agiert selber als Myosin-Leichtketten-Kinase (*myosin light chain kinase*, MLCK) und phosphoryliert Myosin-Leichtketten (*myosin light chain*, MLC) (Amano et al., 1996). Die gleichzeitige Phosphorylierung von Myosin-Phosphatase hemmt deren Phosphatase-Aktivität und somit die Dephosphorylierung und Inaktivierung von MLC (Kimura et al., 1996). Aktive MLC führen zur Zusammenlagerung von F-Aktinbündeln und nachfolgenden Bildung von F-Aktinfilamenten, zu denen auch die Stressfasern gehören. Damit verbunden sind auch Phosphorylierungen von Proteinen der FA, z.B. fokale Adhäsionskinase (FAK) und Paxillin (Seufferlein und Rozengurt, 1994; Sinnett-Smith et al., 2001).

Zu den GTP-bindenden Proteinen der Rho-Familie gehören außerdem Rac und Cdc42. Sie spielen bei der Ausbildung anderer zytoskeletärer Strukturen eine Rolle (Abb 2). Rac bewirkt den Aufbau eines engmaschigen Netzwerkes aus Aktin-Filamenten in der Zellperipherie bzw. die Formierung sogenannter Lamellipodien. Membranfalten (*membran ruffles*) sind ein Merkmal sich ausdehnender und entwickelnder Lamellipodien. Unter Cdc42-Einfluss entstehen aktinreiche Fortsätze, sogenannte Filopodien. Außerdem induzieren Rac und Cdc42 die kurzzeitige Formation fokaler Komplexe, die innerhalb von Minuten wieder abgebaut werden oder zu FA differenzieren (Ridley und Hall, 1992; Kozma et al., 1995).



**Abbildung 2** Schematische Darstellung des Aktin-Zytoskeletts und seiner zytoskeletären Strukturen: Stressfasern (SF), Lamellipodien (Lam), Filopodien (Fil) in einer Zelle. Rolle der GTPasen der Rho-Familie: Rho, Rac, Cdc42. FA – fokale Adhäsionen, MF – Membranfalten, FK – fokale Komplexe (Quelle: Cell Biology, Institute of Molecular Biology, Salzburg; <http://cellix.imolbio.oeaw.ac.at>).

Die Familie der kleinen GTPasen liefert somit Schlüsselmoleküle, die verknüpfend in der Signaltransduktion zwischen Membranrezeptoren und der Organisation des Aktin-Zytoskeletts tätig werden. Der Übergang von fokalen Komplexen (assoziiert mit Lamellipodien) zu FA (assoziiert mit Stressfasern) wird durch eine Verlagerung des Signalcharakters von Rac zu Rho gesteuert. Dafür notwendig ist das Strukturprotein Myosin, das die Aktinfilamente bündelt und zu Stressfasern zusammenfasst. Stressfasern stabilisieren Integrin-Cluster und unterstützen so die Integrität der FA. Ein Hauptmodulator der Aktin-Myosin-Interaktion ist die MLC. Sie kann direkt durch Rho-Kinase, den Effektor von Rho, phosphoryliert und aktiviert werden (Amano et al., 1996).

Während mit Rho ein Aufbau des Aktin-Zytoskeletts assoziiert wird, korrelieren sein Abbau und damit verbundene morphologische Umgestaltungen der Zelle häufig mit einer erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentration (Lamb et al., 1988; Yasumura et al., 1966). Durch cAMP-induzierende Stimuli wurden sowohl PKA-abhängige als auch PKA-unabhängige Aktin-Depolymerisationen in menschlichen Atemwegszellen festgestellt (Hirshman et al.,

2001). Han et al. registrieren darüberhinaus, cAMP-induziert, eine Tyrosin-Dephosphorylierung des FA-Proteins Paxillin (Han und Rubin, 1996).

In zeitlicher Verzögerung zum Maximum der morphologischen Veränderungen kommt es zur Hemmung der Proliferation durch cAMP (Kothapalli et al., 2003). Die Menge freigesetzten cAMP korreliert dabei nicht zwingend mit dem antiproliferativen Potential, wie eine vergleichende Studie verschiedener Prostacyclin-Analoga in menschlichen pulmonal-arteriellen SMC ergab (Clapp et al., 2002).

PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> stimulieren ebenfalls die cAMP-Freisetzung. Sie ist ursächlich an der Hemmung der Migration und Proliferation durch diese Prostaglandine beteiligt (Kohyama et al., 2002; Kothapalli et al., 2003; Uehara et al., 1988). Die Proliferationshemmung durch PGI<sub>2</sub>-Analoga und PGE<sub>2</sub> erfolgt als Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase (Li et al., 2001; de Silva et al., 2003). An der Progression des Zellzyklus sind Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) beteiligt, die durch Assoziation mit Cyclinen aktiviert werden. Zu den Cyclin/CDK-Komplexen der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus gehören: CyclinD/CDK4, CyclinD/CDK6 und CyclinE/CDK2. CDK unterliegen darüberhinaus einer Regulation durch endogene CDK-Inhibitoren der Cip/Kip-Familie (p27<sup>Kip1</sup>, p21<sup>Cip1</sup>), für die Inhibition der Cyclin/CDK-Komplexe sind die Vertreter der INK-Familie von Bedeutung. Die Funktionsfähigkeit von CDK bzw. Cyclin/CDK-Komplexen wird durch Inhibitoren herabgesetzt und die Progression des Zellzyklus gehemmt. Während der frühen G<sub>1</sub>-Phase sind die D-Typ-Cycline (Cyclin D1 ,2 ,3) von Bedeutung, die mit CDK4 bzw. CDK6 assoziieren, im späteren Teil gewinnt CyclinE/CDK2 an Bedeutung. Die aktiven Komplexe translozieren in den Nukleus und hyperphosphorylieren Retinoblastoma-Protein (Rb), was schließlich zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F führt. Dieser induziert die Expression verschiedener Wachstums- und Zellzyklusgene, die notwendig für die weitere Zellzyklus-Progression sind, wie den Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase und den S-Phasen-Durchgang (Bornfeldt et al., 2003; Sherr und Roberts, 1999).

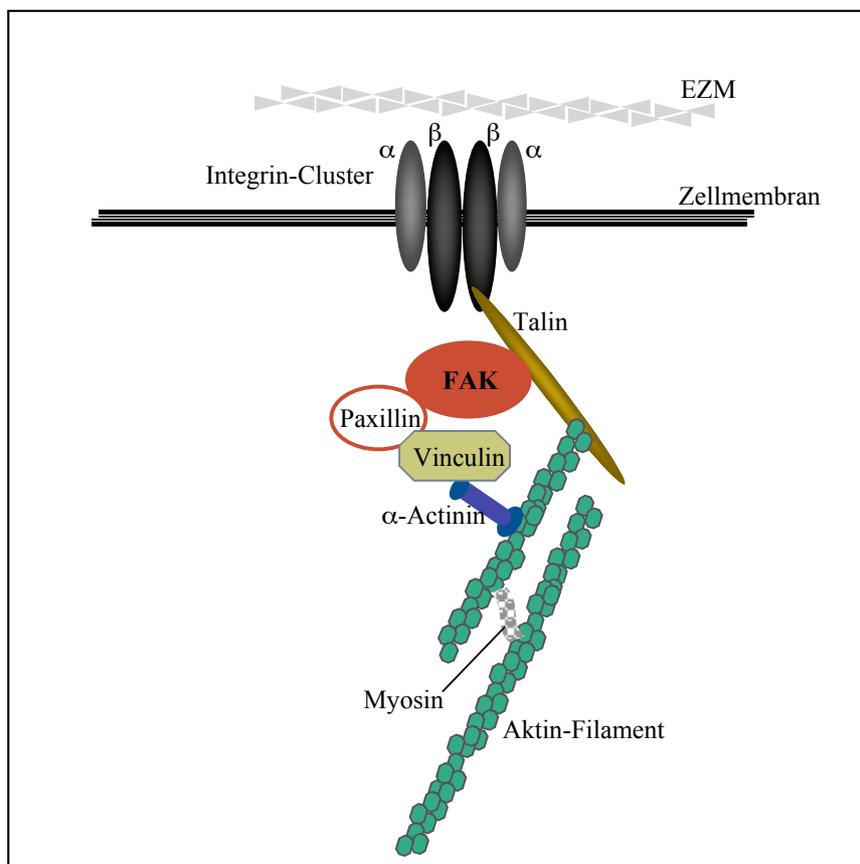
Im Falle von PGE<sub>2</sub> sind die Effekte abhängig von der Rezeptorexpression. So wurde EP<sub>3</sub>-vermittelt eine Migrationsförderung aufgrund der G<sub>i</sub>-Kopplung des Rezeptors und reduzierten cAMP-Freisetzung festgestellt (Blindt et al., 2002).

Über die Rolle des Aktin-Zytoskeletts oder eine Beteiligung fokaler Proteine (z.B. FAK) bei den durch PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> induzierten phänotypischen Veränderungen von Zellen ist nichts bekannt.

### 1.3.3 Fokale Adhäsionen und die Rolle der Fokalen Adhäsionskinase

Fokale Adhäsionen (FA) sind membran-assoziierte komplexe Formationen, die als Nukleationsort für Aktin-Filamente fungieren. Darüberhinaus nehmen sie eine Vermittlerposition zwischen Extrazellulärraum, Plasmamembran und Aktin-Zytoskelett ein. Sie erfüllen einerseits eine rein strukturelle Funktion, partizipieren aber auch an und initiieren selber Signaltransduktionen als Reaktion auf Adhäsionsvorgänge und andere Stimulationen.

FA entstehen, wenn adhärenente Zellen über ihre membranständigen Integrin-Rezeptoren in Kontakt mit Proteinen der EZM treten. Die Integrine sind intrazellulär mit einem fokalen Proteinkomplex verknüpft, der aus mehr als 50 verschiedenen Struktur-, Signal- und Adapterproteinen zusammengesetzt ist (Zamir und Geiger, 2001). Dazu gehören u.a. FAK, Talin, Vinculin,  $\alpha$ -Actinin, Paxillin, Tensin, Zyxin. Nach Stimulation durch Komponenten der EZM lagern sich die Integrin-Rezeptoren zu Clustern zusammen, in deren Folge es verstärkt zu Tyrosinphosphorylierungen der FA-Proteine kommt. Integrine interagieren auch mit membranständigen Rezeptor-Tyrosinkinasen und beeinflussen so die zelluläre Antwort auf, z.B., eine Stimulation mit Wachstumsfaktoren.



**Abbildung 3** Schematische Illustration des Multiproteinkomplexes einer fokalen Adhäsion (FA) als Schnittstelle zwischen EZM und Aktin-Zytoskelett.

Eine zentrale Stellung innerhalb der FA nimmt die Tyrosinkinase FAK ein. So zeigen Schaller et al., dass FAK in die Signaltransduktion der Integrine involviert ist (Schaller und Parsons, 1994a). FAK ist eine Protein-Tyrosinkinase ohne Rezeptoreigenschaften, die Anfang der 90-er Jahre identifiziert wurde (Hanks et al., 1992; Whitney et al., 1993). Die eigentliche Kinasedomäne ist zentral lokalisiert und wird von großen N- und C-terminalen Domänen flankiert. Am C-Terminus liegt die *focal adhesion targeting domain* (FAT-Domäne), an die Paxillin und Talin binden können. Eine Interaktion mit Integrinen wird über den N-Terminus vermutet (Übersicht in: Schlaepfer et al., 1999). Verschiedene *Splice*-Varianten von FAK sind bekannt, darunter die nicht-katalytisch wirkende *FAK-related nonkinase* (FRNK), die als endogener, negativer Regulator von FAK agieren kann (Richardson und Parsons, 1996).

In ihrer inaktiven Form liegt FAK im Zytosol vor, ihre Aktivierung unterliegt multiplen Regulationen. Die Lokalisierung von FAK in der Nähe fokaler Adhäsionen ist Voraussetzung für die FAK-Aktivierung u.a. in Integrin-Signalkaskaden. Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Paxillin wurde eine Rekrutierung von FAK in FA-Nähe festgestellt (Tachibana et al., 1995; Hildebrand et al., 1995). Talin ist ein Strukturprotein, das an FAK und an den zytoplasmatischen Teil von  $\beta$ -Integrin binden kann (Chen et al., 1995). Eine direkte Bindung von FAK an Integrinsequenzen wurde von Schaller et al. beobachtet (Schaller et al., 1995a).

Tyrosinphosphorylierungen spielen eine entscheidende Rolle für die Aktivität und Funktion der FAK. Sie können an 6 Positionen innerhalb des FAK-Moleküls erfolgen, von denen 2 im N-Terminus (Tyr-397, Tyr 407), 2 innerhalb der Kinase-Domäne (Tyr-576, Tyr-577) und 2 im C-Terminus (Tyr-861, Tyr-925) liegen. Der Tyrosinrest 397 wurde als Autophosphorylierungsposition identifiziert. Die Autophosphorylierung schafft die Voraussetzung für die Assoziation mit der *src homology 2 domain* (SH2-Domäne) von Vertretern der Familie der Src-Kinasen (Schaller et al., 1994b). Andere FAK-Tyrosinreste werden durch die Src-Kinasen transphosphoryliert.

Nach Autophosphorylierung kann FAK als Kinase andere FA-Proteine phosphorylieren. So wurde *in vitro* die Phosphorylierung von Paxillin an den Tyrosinresten 31 und 118 festgestellt (Bellis et al., 1995; Schaller und Parsons, 1995b). Untersuchungen haben ergeben, dass für die Aktivierung der Kinasefunktion der FAK neben der Autophosphorylierung auch die Phosphorylierungen an den Tyrosinresten 576 und 577 notwendig sind (Calalb et al., 1995). Jedoch scheint die Kinase-Aktivität nicht essentiell für alle FAK-Funktionen zu sein.

FAK kann mit einer Vielzahl verschiedener Signal-, Adapter- und Strukturproteine assoziieren. Diese Interaktionen werden durch die Autophosphorylierung und durch

Phosphorylierungen an sekundären Positionen, teilweise Src-abhängig, reguliert. So ermöglicht die Tyrosinphosphorylierung an Position 925 die Bindung des kleinen Adapterproteins *growth factor receptor-bound protein-2* (Grb2) über dessen SH2-Domäne (Schlaepfer et al., 1994; Schlaepfer und Hunter, 1996). Die Assoziation von Grb2 mit dem GDP-GTP-Austauschprotein Sos führt über Ras und Raf zur Aktivierung der *mitogen-activated protein kinase*-Kaskade (MAPK-Kaskade). Somit könnte FAK, vermittelt über *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), in die Expression von Genen des Zellzyklus wie Cyclin D1 eingreifen (Schlaepfer et al., 1994; Chen et al., 1998).

FAK beeinflusst jedoch nicht nur Signalwege von zellulären Wachstumsprozessen. Sie wird auch mit Migrationsprozessen in Verbindung gebracht. So wurde die Migration von Zellen durch FAK-Überexpression und in Abhängigkeit von der FAK-Autophosphorylierung gefördert. Durch Überexpression von FRNK konnte sie gehemmt werden (Cary et al., 1996; Gilmore und Romer, 1996). FAK-defiziente Zellen weisen eine verringerte Motilität auf (Ilic et al., 1995). Verantwortlich für die Rolle von FAK bei Migrationsprozessen ist das Adapterprotein p130<sup>CAS</sup>. Es bindet über seine SH<sub>3</sub>-Domäne an phosphorylierte Prolinreste im C-Terminus von FAK und wird durch Src-medierte Tyrosinphosphorylierung aktiviert (Polte und Hanks, 1995/1997; Cary et al., 1998). Dabei scheint die Migrationshemmung in Zusammenhang mit einer veränderten Zellmorphologie und einem eingeschränkten *turnover* (engl., Umsatz, Erneuerung) der FA zu stehen.

## 1.4 Regulation von Tyrosin-Phosphorylierungen

Sowohl PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> als auch FAK beeinflussen die Proliferation und die Migration von Zellen. Ein Zusammenhang zwischen PG und FA wurde bisher nicht beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> zur Regulation des Phosphorylierungsgrades der FAK unter Beteiligung von Kinasen (Phosphorylierung) und Phosphatasen (Dehosphorylierung) beitragen können.

### 1.4.1 Tyrosinkinasen

Protein-Tyrosinkinasen (PTK) werden unterteilt in membranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen und nicht-membranständige Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinasen. Erstere besitzen eine extrazelluläre Domäne zur Ligandbindung und eine intrazelluläre katalytische

Domäne mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität. FAK ist selber eine PTK und gehört zu der zweiten Gruppe, den nicht-membran-assoziierten PTK.

Inhibitoren von PTK besetzen entweder die ATP- oder die Substrat-Bindestelle des Enzyms. Genistein, ein vielfach eingesetzter PTK-Inhibitor, hemmt kompetitiv die ATP-Bindung. Bisher sind keine Interaktionen mit der FAK-Autophosphorylierung bekannt.

Tyrosinphosphorylierungen der FAK können durch verschiedene Stimuli und Signalwege hervorgerufen werden: nach EZM-Zell-Kontakten via Integrine, über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (z.B. Angiotensin-Rezeptor), durch Wachstumsfaktoren, Lysophosphatidsäure (LPA), Scherstress, regulatorische Peptide (Bombesin, Endothelin) u.a.m (Burrige et al., 1992; Polte et al., 1994; Abedi et al., 1995; Seufferlein und Rozengurt, 1994; Li et al., 1997; Rodriguez-Fernandez und Rozengurt, 1998; Koyama et al., 2000). Dabei scheinen G-Protein-vermittelte Phosphorylierungen häufig mit einer Rho-Aktivierung zu korrelieren (Needham und Rozengurt, 1998). Welche Signalwege vor oder nach Rho eine Verbindung mit FAK herstellen könnten oder ob die Rho-Effekte über Umgestaltungen des Aktin-Zytoskeletts vermittelt werden, ist nicht bekannt. Ein intaktes Aktin-Zytoskelett ist jedoch Voraussetzung für FAK-Tyrosinphosphorylierungen.

#### 1.4.2 Tyrosinphosphatasen

Protein-Tyrosinphosphatasen (PTP) katalysieren die Abspaltung von Phosphatgruppen an Tyrosinresten, Serin-Threonin-Phosphatasen (PP) die an Serin- und Threoninresten. Im Zusammenhang mit FAK scheinen besonders PTP von Bedeutung und können zu einer Beeinträchtigung der FAK-Aktivität führen. FAK-PTP-Interaktionen wurden u.a. beschrieben für *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10* (PTEN) und *PTP-prolin, glutamate, serine, threonine sequence protein* (PTP-PEST).

Die duale Lipid- und Proteinphosphatase PTEN ist primär eine Lipidphosphatase, wobei Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PtdIns[3,4,5]P<sub>3</sub>) das vorherrschende Substrat darstellt. Erst in zweiter Linie fungiert sie an Tyrosinresten als PTP (Maehama und Dixon, 1998; Übersicht in: Yamada und Araki, 2001). Die Dephosphorylierung von FAK konnte gezeigt werden: a) durch PTEN-Überexpression, b) durch nachträgliche zelluläre PTEN-Rekonstitution oder c) in Tyrosinphosphatase-Assays mit nativen FAK- und PTEN-Präparationen (Tamura et al., 1999; Aikawa et al., 2002; Liliental et al., 2000; Haier und Nicolson, 2002). Die Vermutung liegt daher nahe, dass FAK auch unter physiologischen Bedingungen als Substrat für PTEN fungieren könnte.

PTP-PEST ist eine zytosolische Phosphatase, für die eine Assoziation mit Paxillin beschrieben wurde (Shen et al., 1998). FAK gilt als ein eher schwaches Substrat für PTP-PEST (Lyons et al., 2001).

Nach Integrinaktivierung wandert PTP-PEST in die Peripherie und interagiert mit seinem Substrat p130<sup>CAS</sup> (Nakamoto et al., 1997). Angers-Loustau et al. stellten in PTP-PEST-defizienten Zellen sowohl eine Hyperphosphorylierung von p130<sup>CAS</sup>, wie auch von Paxillin und FAK fest (Angers-Loustau et al., 1999), so dass auch PTP-PEST den Phosphorylierungsstatus der FAK und somit deren Aktivität und Funktion regulieren könnte.

Die *SH2 domain containing non-transmembrane PTP* (SHP-2) ist eine zytosolische PTP, für die einige Arbeiten einen Einfluss auf fokale oder zytoskeletäre Proteine beschrieben. Nach Integrinaktivierung wandert sie aus dem Zytosol zu den fokalen Kontakten (Tsuda et al., 1998). Mit Hilfe einer inaktiven SHP-2-Mutante identifizieren Yu et al. eine signifikante Abnahme der FAK-Dephosphorylierung (Yu et al., 1998). Eine ebenfalls katalytisch-inaktive SHP-2-Mutante führt bei Inagaki et al. zu einer Hyperphosphorylierung des SHP-2-Substrates SHPS-1 und einer verstärkten Paxillin-Phosphorylierung (Inagaki et al., 2000).

SHP-2 wurde Anfang der 90-er Jahre entdeckt und unter verschiedenen Bezeichnungen bekannt: SHP-2, SH-PTP2, SH-PTP3, PTP2C, PTP1D, Syp (Adachi et al., 1992; Feng et al., 1993; Vogel et al., 1993). SHP-2 wird in zahlreichen Zelltypen, darunter auch hämatopoetische Zellen, exprimiert. Es besteht eine große Sequenzhomologie mit SHP-1, der ausschließlich in den hämatopoetischen Zellen lokalisierten SHP-Isoform.

SHP-2 spielt eine Rolle bei Signaltransduktionen, die u.a. durch Wachstumsfaktoren (*platelet derived growth factor* =PDGF, *epidermal growth factor* =EGF, *insulin-like growth factor I* =IGF-I), Zytokine (z.B. IL-3) sowie Insulin und Interferon initiiert wurden (Bennett et al., 1996; Milarski und Saltiel, 1994; Inagaki et al., 2000). Dabei scheint es möglich, dass SHP-2 innerhalb einer Signalkaskade mehrfach wirksam werden kann. Die dephosphorylierende Wirkung impliziert eine Hemmung der Signalwege durch SHP-2. Die überwiegende Zahl der Studien beschreibt SHP-2 jedoch als einen positiven Regulator, z.B. als Förderer der MAPK-Kaskade oder der Fibronectin-induzierten Migration (Cunnicket al., 2002; Inagaki et al., 2000). Doch auch inhibitorische Einflüsse auf intrazelluläre Prozesse wurden festgestellt (You et al., 1999).

Bisher identifizierte Substrate und Bindeproteine für SHP-2 sind *SHP-substrate 1* (SHPS-1; stammt aus der Ratte), SIRPalpha1 (das menschliche Äquivalent zu SHPS-1), sogenannte PZR-Proteine sowie die „*pleckstrin homology domain-containing scaffolding or docking*“-Proteine Gab1 und Gab2 (Fujioka et al., 1996; Zhao und Zhao, 1998; Nishida et al., 1999).

Inhibitoren von PTP blockieren die Abspaltung von Phosphatgruppen an Tyrosinresten, Inhibitoren von PP blockieren sie an Serin- und Threoninresten. Ein spezifischer Inhibitor der Protein-Phosphatasen 1 (PP1) und 2A (PP2A) ist Okadasäure. Es handelt sich um eine reversible Phosphatase-Inhibition.

Ein gängiger PTP-Inhibitor mit breitem Wirkungsspektrum ist Vanadat (Natrium-orthovanadat).

Als spezifischer SHP-2-Inhibitor wurde kürzlich Calpeptin identifiziert (Schoenwaelder et al., 2000). Calpeptin gehört eigentlich in die Gruppe der Protease-Inhibitoren. Es hemmt effektiv die Calpain-induzierte Proteolyse. Schoenwaelder und Burrige erbrachten jedoch den Nachweis einer Phosphatase-Hemmung durch Calpeptin (Schoenwaelder und Burrige, 1999). Sie zeigen, dass Calpeptin die durch Forskolin (einem Aktivator der Adenylatzyklase) induzierte Auflösung des Zytoskeletts sowie die Paxillin-Dephosphorylierung verhindert. Versuche mit anderen Calpain-Inhibitoren wie ALLN (Calpain-Inhibitor I), Calpastatin (hochspezifischer, endogener Calpain-Inhibitor) und E64d (Cysteinprotease-Inhibitor) bleiben wirkungslos. Auch die Chelatierung des für die Calpain-Funktion notwendigen Calciums mit Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA) verhindert den Forskolin-Effekt nicht. Somit muss ein anderes potentiell Zielprotein für Calpeptin existieren, das als SHP-2 identifiziert wurde. Beide Enzyme, Calpain und SHP-2, enthalten einen Cysteinrest im aktiven Zentrum, der den Angriffspunkt für Calpeptin darstellen könnte.

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Materialien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

#### 2.1.1 Substanzen und Wachstumsfaktoren

Substanz	Wirkung	Hersteller	eingesetzte Endkonzentration
Butaprost	EP <sub>2</sub> -Rezeptor-Agonist	Cayman Chemical, MI, USA	1 µM
Calpeptin	Calpain-Inhibitor	Toocris, Köln	20 µg/ml
Cicaprost	Spezifischer IP-Rezeptor-Agonist	Schering AG, Berlin	1 / 10 / 100 nM
db-cAMP	cAMP-Analogon	Sigma	1 mM
Forskolin	Adenylatcyclase-Aktivator	Sigma	10 µM
Genistein	Tyrosinkinase-Inhibitor	Sigma	100 µM
H-89	Proteinkinase A-Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt	100 nM
IBMX	Phosphodiesterase-Inhibitor	Sigma	0.5 mM
Iloprost	IP-Rezeptor-Agonist	Schering AG, Berlin	0.1 / 1 / 10 / 100 nM
LPA	RhoA-Aktivator	Sigma	10 µM
M&B 28.767	EP <sub>3</sub> -Rezeptor-Agonist	Rhône-Poulenc Rorer, Frankreich	100 nM
Ono-AE1-329	EP <sub>4</sub> -Rezeptor-Agonist	ONO Pharmaceuticals, Japan	100 nM
Natriumorthovanadat (Vanadat)	Proteintyrosinphosphatase-Inhibitor	Sigma	50 µM
Prostaglandin E <sub>2</sub>	EP-Rezeptor-Agonist	Sigma	0.1 / 1 / 10 / 100 nM
RHu PDGF-BB	Wachstumsfaktor	PromoKine, Heidelberg	10 ng/ml
SC 19220	EP <sub>1</sub> -Rezeptor-Antagonist	Toocris, Köln	10 mM
Y-27632	ROCK-Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt	10 µM

Tabelle 1

### 2.1.2 Chemikalien und Kits

Chemikalien und Kits	Hersteller
Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung 40 %	Bio-Rad, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München
<i>BioArray™ HighYield™ RNA Transcript Labeling Kit</i> („Enzo Kit“)	Enzo Life Sciences, USA
<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i>	Bio-Rad, München
100 bp <i>DNA Ladder</i>	Gibco–Invitrogen, Karlsruhe
<i>ECL Plus Western Blotting Detection Reagent</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Entellan® (Eindeckmedium)	Merck, Darmstadt
Hemacolor	Merck, Darmstadt
Hoechst 33324	Sigma
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i> (Protein-Standard)	Fermentas, St.Leon-Rot
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
QIAGEN® <i>OneStep RT-PCR Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
Milchpulver	Fluka, Ulm
Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE)	Molecular Probes, Göttingen
<i>SuperScript™ Double Stranded cDNA Synthesis Kit</i>	Gibco–Invitrogen, Karlsruhe
Thymidin, [Methyl- <sup>3</sup> H]	Perkin Elmer, USA
TRIZOL® Reagenz	Gibco–Invitrogen, Karlsruhe
<i>Vectashield® Mounting Medium</i>	Vector Laboratories, CA, USA

Tabelle 2

### 2.1.3 Immunochemikalien

Antikörper	Hersteller	Konzentration
<i>anti-mouse</i> IgG, Peroxidase-gekoppelt	Vector Laboratories, CA, USA SantaCruz, Heidelberg	1 : 5000

<i>anti-rabbit</i> IgG, Peroxidase-gekoppelt	Vector Laboratories, CA, USA SantaCruz, Heidelberg	1 : 5000
anti-Streptavidin, biotinyliert	Vector Laboratories, CA, USA	(siehe Tabelle 6)
Cyclin D1 (H-295) <i>polyclonal, rabbit</i> (Kat. sc-753)	SantaCruz, Heidelberg	1 : 1000
FAK <i>monoclonal, mouse</i> (Kat. 610087)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg	1 : 1000
IgG Cy3 <i>conjugate</i> , F(ab') <sub>2</sub> Fragment (Kat. C-2181)	Sigma	1 : 600 (ICC)
Kip 1 / p27 <i>monoclonal, mouse</i> (Kat. 610241)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg	1 : 500
Paxillin <i>monoclonal, mouse</i> (Kat. 610051)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg	1 : 5000 (WB) 1 : 200 (ICC)
p-FAK (Tyr 397) <i>polyclonal, rabbit</i> (Kat. sc-11765-R)	Santa Cruz, Heidelberg	1 : 500
Phalloidin-FITC (Kat. P-5282)	Sigma	0.2 µM
Phospho-Paxillin (Tyr 118), <i>polyclonal, rabbit</i> (Kat. #2541)	Cell Signaling Technology Inc., USA,	1 : 1000

**Tabelle 3**

#### 2.1.4 Zellkultur

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
<i>human aortic smooth muscle cells</i> (hASMC)	Cascade Biologics, USA
Amphotericin B	PAA, Linz
Fötales Rinderserum (FBS)	Bio Whittaker / Cambrex
Einfriermedium <i>Synth-a-freeze</i>	Cascade Biologics, USA
Medium M231	Cascade Biologics, USA
<i>Neutralizer</i>	Cascade Biologics, USA
Penicillin (10.000IE) / Streptomycin (10.000 µg / ml)	Gibco–Invitrogen, Karlsruhe
<i>Smooth muscle growth supplement</i> (SMGS)	Cascade Biologics, USA
Trypsin / EDTA	Biochrom AG, Berlin

**Tabelle 4**

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

<b>Materialien</b>	<b>Firma</b>
Einmalpipetten Costar®	Corning Inc., USA
„Falcon“ Röhren (Polypropylenröhren), 15 ml / 50 ml	Greiner, Solingen
<i>Gel-Blotting-Papier</i>	Schleicher & Schüll (Whatman®, GB)
<i>Hybond-P Membrane</i> , PVDF-Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Immobilon™-P, PVDF-Membran	Millipore, Eschborn
Biomax MR	Kodak, Stuttgart
<i>Lab-Tek™ CC Chamber Slides</i> (8 Kammern)	Nunc, Wiesbaden
<i>Phase Lock Gels</i>	Eppendorf, Hamburg
Polycarbonate Filter (Porengröße 10 µm)	Neuro Probe Inc., USA
Zellkulturgefäße	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 5

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

<b>Denaturierungslösung (RNA-Gel)</b> 100 µl Formamid 35 µl Formaldehyd 37 % 20 µl 10 x MOPS 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)	<b>10 x HBSS (RIA)</b> 1,35 mM NaCl 50 mM KCl 4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8 mM MgSO <sub>4</sub> 40 mM NaHCO <sub>3</sub> pH 7,0
<b>1 x HBSS (RIA)</b> 1 mM CaCl <sub>2</sub> 5,5 mM Glukose 10 mM HEPES pH 7,8 1 mg/ml BSA	<b>2 x Laemmli-Puffer (Protein-Analyse)</b> 250 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7 20 % Glycerin 4 % SDS 0,002 % Bromphenolblau 100 mM Dithiothreitol

<b>1 x Laufpuffer (Protein-Analyse)</b> 25 mM Tris 0,19 mM Glycin 0,1 % SDS	<b>10 x MOPS (RNA-Gel)</b> 20 mM MOPS 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA pH 7,0
<b>3,7 % Paraformaldehyd-Lösung (ICC)</b> 0,37 g Paraformaldehyd (PFM) 1 ml Aqua dest. 1-2 Tropfen 1 N NaOH im Wasserbad unter Rühren auf ca. 80°C erhitzen bis PFM gelöst PBS (pH 7,2) ad 10 ml	<b>1 x PBS</b> 137 mM NaCl 8,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 (für die Zellkultur: sterilfiltriert)
<b>0,2 µM Phalloidin-FITC (ICC)</b> 1 µl ethanolische 0,2 mM Phalloidin-FITC-Lösung 999 µl PBS  (wässrige Verdünnung immer frisch herstellen)	<b>RIA-Puffer (RIA)</b> 50 mM Tris 4 mM EDTA pH 7.5
<b>4 x Sammelgel-Puffer (Protein-Analyse)</b> 0,5 M Tris pH 6,8	<b>1 x TAE (DNA-Gel)</b> 40 mM Tris Base 20 mM Essigsäure 2 mM EDTA pH 8,0
<b>10 x TBS (Protein-Analyse)</b> 200 mM Tris Base 1,37 mM NaCl pH 7,6	<b>1 x TBST (Protein-Analyse)</b> 1x TBS 0,1 % Tween 20
<b>Transfer-Puffer (Protein-Analyse)</b> 25 mM Tris 0,19 mM Glycin 20 % Methanol	<b>4 x Trenngel-Puffer (Protein-Analyse)</b> 1,5 M Tris pH 8,8

Tabelle 6

## 2.2 Geräte

	Geräte	Firma
Inkubatoren:	NuAire US Autoflow Heraeus ‚Function Line‘ BB16	Zapf, Langenhagen Heraeus, Hanau
Szintillationszähler:	Beckmann LS 6000 IC	Beckmann, München

Elektrophorese (Protein) + Western Blot:	Mini-PROTEAN <sup>®</sup> 3 Electrophoresis Cell, Mini Trans-Blot <sup>®</sup> Apparatus, PowerPac 200 + 300 Power Supply	Bio-Rad, München
Filmauswertung (Scanner und Software):	GS-800 Calibrated Densitometer Quantity One <sup>®</sup> Version 4.4.1	Umax Systems GmbH, Willich Bio-Rad, München
Elektrophorese (RNA):	Sub-Cell <sup>®</sup> GT Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Gelauswertung:	GelDoc 1000 <sup>™</sup> mit Quantity One <sup>®</sup> Version 4.1-Software	Bio-Rad, München
Array-Hybridisierung:	GeneChip <sup>®</sup> Hybridization Ofen	Affymetrix UK Ltd.
Kamera + Software:	Colorview II Kamera mit <i>Soft Imaging System</i> -Software	Soft Imaging System, Münster
Migrationskammer:	AP 48 Chemotaxis Chamber	Neuro Probe Inc., USA
Mikroskope:	Olympus BX 50, Olympus CK 40	Olympus, Hamburg
Proteinbestimmung:	ELISA-Reader Modell 550	Bio-Rad, München
RNA-Messung:	Genequant II DNA/RNA Calculator (1 OD <sub>260</sub> = 40 µg RNA / ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
RT-PCR:	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Sterile Werkbank:	antair BSK	Anthos-Mikrosysteme, Köln
Zentrifugen:	Centrifuge 5415 R (kühlbar)	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 7

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Kultivierung menschlicher glatter Gefäßmuskelzellen

Humane glatte Muskelzellen der menschlichen Aorta (hASMC) wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Begasung und in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre inkubiert. Die Kultivierung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers in Vollmedium: 5 ml Supplement / 100 ml Medium M231 plus 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin. Medienwechsel erfolgten alle 2–3 Tage. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS ohne Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionen gewaschen und mit Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,02 %) versetzt. Nach Ablösen der Zellen (5-8 min, 37°C) wurde die Trypsin-Reaktion mit ‚Neutralizer‘-Lösung oder Vollmedium abgestoppt, die Zellsuspension zentrifugiert (1000 rpm, 5 min), das Zellpellet in Vollmedium resuspendiert (3 ml / 60 cm<sup>2</sup>-Schale) und die Zellzahl bestimmt (Neubauer-Kammer). Die Zelldichte der Aussaat betrug ca. 8–10 x 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>, für Experimente mindestens 10-12 x 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>.

In Passage 4 bis 7 wurden die gerade konfluenten Zellen für den späteren Bedarf teilweise eingefroren. Hierfür erfolgte nach Trypsinisierung und Zentrifugation der Zellen einer 60 cm<sup>2</sup> Schale die Resuspendierung des Zellpellets in 1 ml Einfriermedium: *Synth-a-Freeze* oder 20% FBS + 10% DMSO + 70% DMEM (plus Penicillin/Streptomycin). Die Zellen wurden bei –80°C gelagert bzw. für längere Zeiträume in flüssigen Stickstoff überführt.

### 2.3.2 Durchführung der Experimente

Für Versuche wurden Zellen der Passagen 5 bis 10 eingesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Zellen 2 x mit PBS gespült und für 48 h in Medium M-231 mit 0,1% FBS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin („Hungermedium“) synchronisiert. Für die Behandlung der Zellen wurde entweder Hungermedium mit den entsprechenden Substanzen angesetzt und die Zellen damit überschichtet oder es wurden definierte Mengen Hungermedium vorgelegt und die Substanzen direkt zu den Zellen pipettiert. Die lichtmikroskopische Beobachtung der Zellen erfolgte mehrmals während der Dauer eines Experimentes.

## 2.4 RT-PCR

### IP- und EP-Rezeptoren-Expression:

Aus PDGF-BB-stimulierten (10 ng/ml) hASMC wurde mittels TRIZOL<sup>®</sup> Reagenz die Gesamt-RNA isoliert. Die RT-PCR wurde mit 150 ng RNA und unter Verwendung des QIAGEN<sup>®</sup> *OneStep RT-PCR Kit* durchgeführt.

RT-PCR – Ansatz:	Gesamt-RNA	150 ng
	5 x RT-PCR-Puffer	2 µl
	Q-Lösung	2 µl
	dNTPs (10 mmol/L)	0,4 µl
	genspezifischer Primer <i>sense</i> (20 µmol/L)	0,3 µl
	genspezifischer Primer <i>antisense</i> (20 µmol/L)	0,3 µl
	Enzym-Mix	0,4 µl
	RNase freies Wasser	ad 10 µl

Temperaturprotokoll:	50°C	30 min	
	95°C	15 min	
	95°C	30 sec	} 40 Zyklen
	Temp <sub>Hyb</sub>	30 sec	
	72°C	90 sec	
	72°C	10 min	

Gen	Primer-Sequenz	Produkt (bp)	Hybridisierungs-Temp <sub>Hyb</sub> (°C)
IP – Rezeptor	<u>S</u> : 5'-GCGTCCTCTTCTGCGCGCTGCCCTGCTGG-3' <u>AS</u> : 5'-GGTCCCCCATCTCACTGCTGCTGGTCAGG-5'	384	56
EP <sub>1</sub> – Rezeptor	<u>S</u> : 5'-GCGCTGCCATCTTCTCC-3' <u>AS</u> : 5'-GGTACTGCAGTCATAGC-3'	441	56
EP <sub>2</sub> – Rezeptor	<u>S</u> : 5'-GCTGGACTATGGCAGTACG-3' <u>AS</u> : 5'-AACAGGAGGCCTAAGGATGG-3'	450	56
EP <sub>3</sub> – Rezeptor	<u>S</u> : 5'-TCGGGCTCTCCTCGTTGTTC-3' <u>AS</u> : 5'-AGTGAAGCCAGGCGAACAGC-3'	591	56

EP <sub>4</sub> – Rezeptor	<u>S</u> : ACTACGTGGACAAGCGATTG-3' <u>AS</u> : 5'-TCACAGAAGCAATTCGGATG-3'	575	56
-------------------------------	--	-----	----

Tabelle 8

Amphiregulin-Expression:

Nach Versuchsende wurde aus den hASMC mittels TRIZOL® Reagenz die Gesamt-RNA isoliert und mit 150 ng RNA die RT-PCR für Amphiregulin durchgeführt.

RT-PCR – Ansatz:	Gesamt-RNA.....	150 ng
	5 x RT-PCR-Puffer.....	2 µl
	Q-Lösung.....	2 µl
	dNTPs (10 mmol/L).....	0,4 µl
	genspezifischer Primer <i>sense</i> (10 µmol/L)	0,7 µl
	genspezifischer Primer <i>antisense</i> (10 µmol/L)	0,7 µl
	GAPDH Primer <i>sense</i> (5 µmol/L)	0,6 µl
	GAPDH Primer <i>antisense</i> (5 µmol/L)	0,6 µl
	Enzym-Mix.....	0,4 µl
	RNase freies Wasser.....	ad 10 µl

Temperaturprotokoll:	50°C.....	30 min	
	95°C.....	15 min	
	95°C.....	30 sec	} 32 Zyklen
	Temp <sub>Hyb</sub> .....	30 sec	
	72°C.....	90 sec	
	72°C.....	10 min	

Gen	Primer-Sequenz	Produkt (bp)	Hybridisierungs-Temp <sub>Hyb</sub> (°C)
Amphi-regulin	<u>S</u> : 5'-CTGCGAAGGACCAATGAGAG-3' <u>AS</u> : 5'-CATGTTACTGCTTCCAGGTGC-3'	522	58
GAPDH	<u>S</u> : 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA-3' <u>AS</u> : 5'-TCCTTGAGGCCATGTAGGCCAT-3'	238	

Die Analyse der RT-PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese in nativen 2%-igen Agarosegelen zusammen mit einem Größenstandard (DNA-Leiter). Nach UV-Anregung der mit Ethidiumbromid angefärbten Gele erschienen die DNA-Proben als rot-orange Banden, die densitometrisch vermessen werden konnten.

## 2.5 Immuncytochemie

Für immuncytochemische Färbungen wurden hASMC in 8-Loch-Platten auf beschichteten Objektträgern (*Lab-Teks*) in einer Dichte von 12.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und in konfluentem Zustand für Versuche verwendet. Bei Versuchsende (30 min oder 18 h) wurde das Medium abgenommen, die Zellen 1x mit PBS gespült, für 20 min fixiert (3,7%-ige Paraformaldehydlösung), 5 min permeabilisiert (0,1% Triton X-100/PBS) und für 1 h in Blockierlösung (3% BSA/PBS) inkubiert. Es folgten die Inkubationen mit einem Antikörper gegen Paxillin (1:200 in 1% BSA/PBS) sowie mit Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper (1:600 in 1% BSA/PBS, lichtgeschützt) für jeweils 1 h. Die Co-Färbung für F-Aktin mit *fluorescein isothiocyanate*- (FITC)-konjugiertem Phalloidin (0,2 µM in PBS, frisch verdünnt, lichtgeschützt) wurde für 20 min, die Markierung der Kerne durch DNA-Anfärbung mit Hoechst 33324 für 3 min (lichtgeschützt) durchgeführt. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Zwischen und nach den Antikörperinkubationen bzw. Färbeschritten schlossen sich jeweils 3x 5-minütige Waschschrte mit PBS an.

Abschließend wurden die Zellen mit *Vectashield*<sup>®</sup> *Mounting Medium* eingedeckt, um das Ausbleichen der Fluoreszenz zu verringern. Die Aufbewahrung erfolgte abgedunkelt bei 4°C. Die Aufnahmen wurden mit einem Olympus BX 50 Mikroskop mit aufgesetzter Colorview II Kamera gemacht. Es wurden die der Färbung entsprechenden Filter verwendet, die Überlagerung der Bilder erfolgte mit Hilfe der *Soft Imaging System*-Software.

## 2.6 Proteinanalyse

### 2.6.1 Probenvorbereitung und elektrophoretische Auftrennung im Polyacrylamidgel

Für die Untersuchung von Regulationen auf Proteinebene wurden die Zellen in 6- oder 12-Loch-Platten ausgesät. Nach Versuchsende wurden die Zellen in 2 x Laemmli-Puffer lysiert und abgeschabt, in 0,5 – 1,5 ml Probengefäße überführt, geschüttelt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese erfolgte zur Fokussierung 15 min bei 120 V, danach bei 160 V. (Laemmli, 1970; Neville, 1971). Die Acrylamid-Konzentration des Sammelgels betrug 4%, die des Trenngels je nach Molekülgröße der zu analysierenden Proteine 10% bis maximal 15%. Die Laufdauer richtete sich nach der Proteingröße und wurde anhand des mitwandernden gefärbten Proteinmarkers abgeschätzt.

### 2.6.2 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert. Die trockene Membran wurde zunächst für 30 sec in Methanol aktiviert, in Transfer-Puffer äquilibriert und ein ‚Sandwich‘ aus 2 x 3 in Transfer-Puffer getränkten Blot-Papieren und dem Gel zusammengesetzt (siehe Manual zu Mini Trans-Blot®Apparatus, Bio-Rad). Der Transfer erfolgte im Tank in Transfer Puffer für 60 min bei 100 V unter Eiskühlung.

### 2.6.3 Hybridisierung und Detektion von Proteinen

Zur Reduktion unspezifischer Antikörper-Protein-Bindungen wurde die Membran für 60 min in Blockierlösung geschwenkt (Tabelle 9). Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper erfolgte durch Überschichtung der Membran mit 600–900 µl Antikörperlösung und Abdeckung mit einem genau zugeschnittenen Parafilm auf dem planen, trockenen Boden einer geeigneten Schale über Nacht bei 4°C. Die geschlossenen Schalen wurden hierfür mit Folie eingeschlagen, um Verdunstung zu minimieren. Die Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 60 min unter ständiger Bewegung bei Raumtemperatur. Wenn nicht anders angegeben wurden die beschriebenen Schritte mit jeweils 10–15 ml der entsprechenden Lösung durchgeführt.

	FAK, pY118-Paxillin, Paxillin, p27 <sup>Kip</sup>	pY397-FAK, Cyclin D1
<b>Blockierung</b>	5% Milch / TBST	3% Milch / PBS
<b>Primärantikörper</b>	5% BSA / TBST (pY118-Paxillin) 5% Milch / TBST (FAK, Paxillin, p27 <sup>Kip</sup> )	0.5% Milch / PBS
<b>Waschen</b> 3 x 5 Minuten	TBST	0.5% Milch / PBST
<b>Sekundärantikörper</b>	5% Milch / TBST	0.5% Milch / PBS
<b>Waschen</b> 3 x 5 Minuten	TBST	0.5% Milch / PBST

**Tabelle 9** Hybridisierungs- und Waschschritte nach Western Blot

Für die Detektion der Peroxidase-markierten Proteine wurde die Membran mit ECL Plus Reagenz nach den Angaben des Herstellers inkubiert. Die resultierende Chemielumineszenz führt an Stellen der Hybridisierung zur Belichtung des Röntgenfilmes und wird nach Entwicklung und Fixierung als dunkle Bande sichtbar.

Die quantitative Auswertung erfolgte nach Scannen der Filme durch densitometrische Vermessung der Banden mit der *Quantity One*<sup>®</sup> Software von Bio-Rad.

## 2.7 Bestimmung von cyclo-Adenosinmonophosphat

Die Messung intrazellulär gebildeten cAMP mittels Radioimmunoassay (RIA) ermöglicht eine Aussage über die Funktionalität von G<sub>s</sub>-gekoppelten Rezeptoren. Hierfür wurden hASMIC in 24-Loch-Platten ausgesät und 48 h in Serum-armem Medium („Hungermedium“) synchronisiert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen 2 x mit 400 µl 1-fach HBSS-Puffer gewaschen und mit 200 µl einer 1 mM Lösung des Phosphodiesterase-Hemmstoffes 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) überschichtet. Nach 10 min Vorinkubation bei 37°C wurden die jeweiligen Stimuli direkt in die IBMX-Lösung pipettiert. Nach weiteren 10 min bei 37°C wurde die Lösung abgesaugt und die Reaktion mit 200 µl eiskaltem 96%-igem Ethanol abgestoppt. Nach Verdampfen des Ethanols und Überschichten der Zellen mit 300 µl RIA-Puffer bewirkt ein 24-stündiges Einfrieren bei -80°C ein Platzen der Zellen. Intrazelluläres cAMP wird frei, in RIA-Puffer gelöst und kann nach Abnahme des Überstandes und Zentrifugation (12.000 rpm, 10 min) mittels RIA bestimmt werden (Steiner

et al., 1972). Der hierfür erforderliche Antikörper gegen cAMP wurde nicht kommerziell erworben, sondern eigens in Kaninchen erzeugt. Das gewonnene Antiserum liegt lyophilisiert vor, für jede Messreihe wird die Antiserum-Stammlösung neu hergestellt.

Nach Abnahme des Überstandes aus der 24-Loch-Platte wurden die auf dem Boden haftenden Zellproteine in 200 µl einer 0,1 N NaOH-Lösung unter Schütteln bei 37°C suspendiert. Die Proteinmessung erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Hierfür wurden die Proben 20 min mit Bradfordreagenz inkubiert und die Farbreaktion anschließend in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch vermessen. Die Standardkurve wurde unter Verwendung von BSA erstellt.

Die Ergebnisse aus cAMP-Assay und Proteinbestimmung wurden in pmol cAMP / mg Protein x 10 min angegeben.

## **2.8 Migrations-Assay**

Für die Migrationsversuche wurden Polycarbonatfilter der Porengröße 10 µm mit bovinem Kollagen Typ 1 beschichtet. Im unteren Teil einer 48-Loch Mikro-Chemotaxis Kammer wurde Medium M-231 (ohne Supplement, ohne FBS) sowie Medium M-231 plus PDGF-BB (10 ng/ml) als chemotaktischem Agens vorgelegt. Nach Platzierung der beschichteten Membran konnte die Kammer zusammengesetzt und der obere Teil der Kammer befüllt werden (20.000 Zellen/Loch = 250.000 Zellen/cm<sup>2</sup>). Hierfür waren die Zellen kurz zuvor trypsiniert, gezählt und in Supplement- bzw. Serum-freiem Medium M-231 suspendiert worden. Nach einer Anheftungszeit von 30 min erfolgte die Zugabe von Iloprost und PGE<sub>2</sub> in den entsprechenden Konzentrationen. Jede Versuchsbedingung war innerhalb eines Experimentes 6 - 12-fach vertreten.

Die Migrationsdauer betrug 6 h. Die Kammer wurde demontiert, die dem oberen Kammerteil zugewandte Membranseite mehrmals mit PBS befeuchtet und vorsichtig über eine Gummilamelle gezogen, um nicht-migrierte Zellen auf der Oberseite der Membran zu entfernen. Die Fixierung der durch die Membran migrierten Zellen erfolgte durch 1-minütiges Eintauchen der kompletten Membran in Methanol. Nach Membrantrocknung wurden die Zellkerne mit Hemacolor angefärbt und die Membran unter Verwendung von Entellan<sup>®</sup> (Eindeckmedium auf Xylolbasis) auf einem Objektträger mit Deckglas eingedeckt. Die

Zählung von Ausschnitten definierter Größe erfolgte bei 200-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop. Der Mittelwert der 6 – 12-fachen Ansätze eines Versuches entsprach  $n = 1$ .

## 2.9 Messung der DNA-Synthese

Die Proliferationsrate der Zellen wurde durch Messung der DNA-Synthese ermittelt. In 24-Loch-Platten ausgesäte hASMC wurden für 48 h in Serum-armem Medium („Hungermedium“) synchronisiert und für 24 h mit den entsprechenden Substanzen in Gegenwart von [<sup>3</sup>H]-Thymidin (1  $\mu$ Ci/ml) behandelt. Der radioaktive Überstand wurde verworfen, die Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 10%-iger Trichloressigsäure zur Fällung der DNA inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit eiskalter 10%-iger Trichloressigsäure erfolgte die Lyse der DNA in 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung (0,4 ml/Loch) unter ständiger Bewegung für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Jeweils 380  $\mu$ l Lysat wurden mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und in einem Szintillationszähler die Zerfälle gemessen. Innerhalb eines Experimentes war jede Versuchsbedingung 4-fach vertreten; der Mittelwert des Vierfachansatzes entsprach  $n = 1$ .

## 2.10 Genexpressions-Analyse

Für die quantitative Untersuchung der Expression von Genen in hASMC wurde das GeneChip® System von Affymetrix (Affymetrix UK Ltd.) verwendet, speziell das Human Genome U95Av2 Array (HG\_U95Av2). Es repräsentiert ca. 12.000 Gene, deren Sequenzen in Form von Sequenzabschnitten (25mere) auf der Glasoberfläche des Array fixiert sind. Diese DNA-Oligonukleotide dienen als Sonden (*probes*), die mit komplementären cRNA-Oligonukleotiden einer aufgearbeiteten, biotinylierten cRNA (*target*) hybridisieren.

Einige der Gene auf dem Array sind *expressed sequence tags*, d.h. DNA-Sequenzen, denen noch keine Funktion bzw. kein Protein zugeordnet werden konnte.

Einige der Gene sind mehrfach auf dem Array repräsentiert.

Abbildung 4 gibt schematisch die Arbeitsschritte der Array-Analyse wieder:

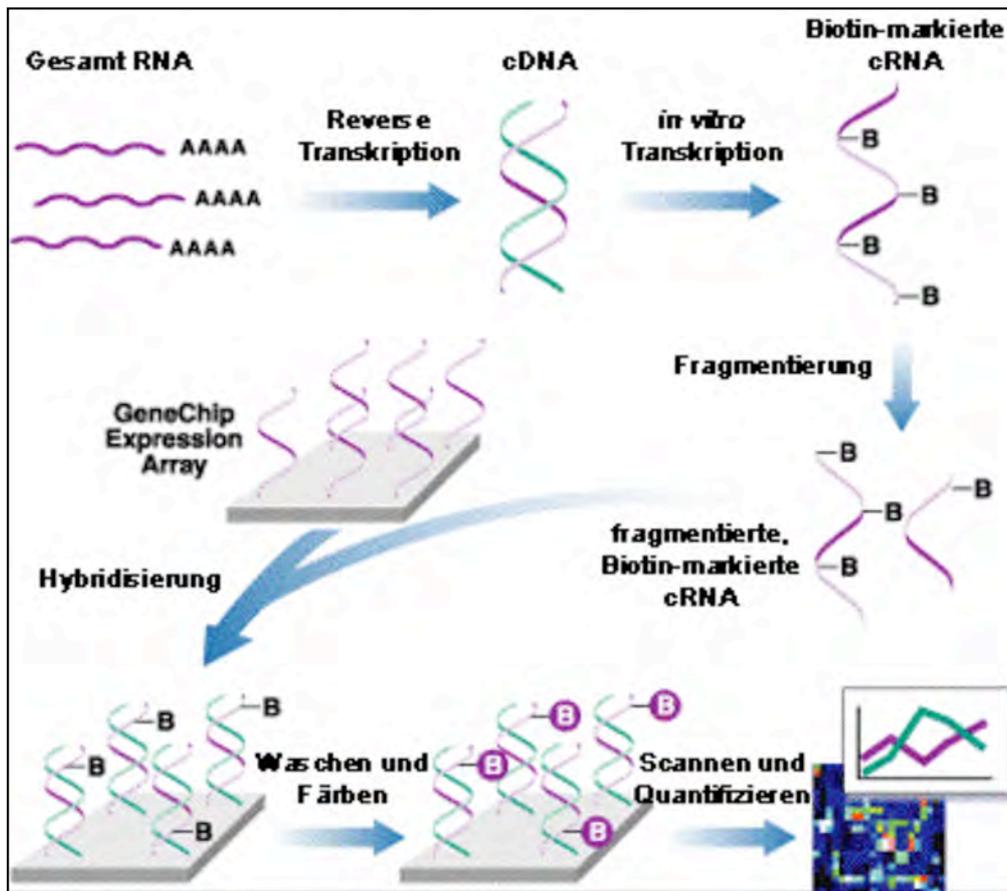


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Genexpressionsanalyse

*Reverse Transkription* – Die aus hASMC isolierte Gesamt-RNA wird in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Die verwendeten Primer enthalten an ihrem 5'-Ende die Promotorsequenz für die Bakteriophagen-RNA-Polymerase T7.

*In vitro Transkription* – Die cDNA dient als Transkriptionsmatrize für die Synthese einsträngiger antisense-cRNA mittels T7 RNA-Polymerase. Von den verwendeten Ribonukleotiden (ATP, GTP, CTP, UTP) sind UTP und CTP biotinyliert und ermöglichen so die spätere Detektion der DNA-RNA-Hybride.

*Fragmentierung* – Die langen cRNA-Ketten werden durch Hydrolyse in Nukleotide von 35–200 Basen fragmentiert, was die Sensitivität des Assay erhöht.

*Hybridisierung* – Hierbei erfolgt die Reassoziation der einzelsträngigen, komplementären Nukleinsäurestränge (DNA-Sequenzabschnitte und biotinylierte cRNA) zu Doppelsträngen, den Hybriden.

*Färbung & Detektion (Scannen)* – Die Biotin-markierten Hybride werden mit Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat gefärbt und das Fluorophor Phycoerythrin bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt. Ein Scanner detektiert das emittierte Licht bei 570 nm. Die Intensität der Fluoreszenzemission ist proportional zur Menge gebundener cRNA an den jeweiligen Sonden auf dem Array.

Im Folgenden werden die Schritte der *Target*-Präparation, Hybridisierung, Färbung, und Detektion einzeln aufgeführt und beschrieben sowie das Prinzip der Expressionsanalyse erklärt.

### 2.10.1 Puffer und Lösungen

<b>Antikörper-Lösung</b> 1 x Färbe-Puffer 2 mg/ml acetyliertes BSA 0,1 mg/ml Goat IgG 3 µg/ml Anti-Streptavidin-Antikörper deionisiertes Wasser	<b>2 x Färbe-Puffer</b> 100 mM MES 1 M NaCl 0,05 % Tween 20
<b>2 x Hybridisierungs-Puffer</b> 200 mM MES 1,77 M NaCl ( $\cong 2 \text{ M } [\text{Na}^+]$ ) 40 mM EDTA 0,02 % Tween 20 pH 6,5 – 6,7	<b>5 x RNA-Fragmentierungs-Puffer</b> 200 mM Tris-Acetat pH 8,1 500 mM K-Acetat 150 mM Mg-Acetat
<b>SAPE-Lösung</b> 1 x Färbe-Puffer 2 mg/ml acetyliertes BSA 10 µg/ml Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) deionisiertes Wasser	<b>20 x SSPE</b> 2 M NaCl 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,02 M EDTA
<b>Wasch-Puffer A (nicht-stringent)</b> 6 x SSPE 0,01 % Tween 20	<b>Wasch-Puffer B (stringent)</b> 100 mM MES 0,1 M $[\text{Na}^+]$ 0,01 % Tween 20

Tabelle 10

### 2.10.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten hASMC erfolgte unter Verwendung von TRIZOL<sup>®</sup> Reagenz. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von TRIZOL<sup>®</sup> (1 ml/cm<sup>2</sup>) in der Kulturschale lysiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Lysat homogenisiert, in sterile Probengefäße (1,5 ml oder 15 ml *Falcon*-Röhrchen) überführt, mit Chloroform (0,2 ml/ml TRIZOL<sup>®</sup>) versetzt, per Hand ausgeschüttelt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und zur vollständigen Phasentrennung zentrifugiert (4°C, 12.000 x g, 15 min). Die wässrige, obere Phase enthielt die RNA; deren Fällung in einem neuen 1,5 ml Probengefäß durch Zugabe von Isopropylalkohol (0,5 ml/ml TRIZOL), Inkubation (10 min, Raumtemperatur) und Zentrifugation (4°C, 12.000 x g, 10 min) erfolgte. Nach zweimaligem Waschen der RNA mit 75%-igem Ethanol und jeweiliger Zentrifugation (4°C, 7.500 x g, 5 min) wurde das RNA-Pellet an der Luft getrocknet und in RNase-freiem Wasser (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe) gelöst und quantifiziert.

### 2.10.3 Aufreinigung der RNA

Die Aufreinigung der RNA erfolgte über Säulen des *RNeasy Mini Kit* nach den Vorgaben des Herstellers. Die Elutionsvolumina (RNase-freies Wasser) wurden den Ergebnissen der RNA-Messung und den zu erwartenden RNA-Ausbeuten entsprechend gewählt, so dass die Endkonzentration ( $\geq 0,5 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ ) einen direkten Einsatz in der cDNA-Synthese ermöglichte.

### 2.10.4 RNA-Qualitätskontrolle

Um die Integrität der isolierten mRNA zu überprüfen, wurde eine denaturierende Gelelektrophorese in einem 1%-igen Agarose-Formaldehyd-Gel mit 1 x 3-Morpholinopropansulfonsäure- (MOPS)-Puffer durchgeführt. Die vorausgehende Denaturierung der Probe in Denaturierungslösung erfolgte für 5 Minuten bei 65°C.

### 2.10.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem SuperScript<sup>™</sup> Kit nach Anweisungen des *Technical Manual* von Affymetrix (Tabelle 11) durchgeführt, die teilweise von den Herstellerangaben des Kit (Gibco-Invitrogen) abwichen.

Die für die *Erststrang-Synthese* verwendeten Primer (MWG Biotech AG, Ebersberg)

enthielten am 5'-Ende die Promotorsequenz für die Bakteriophagen-RNA-Polymerase T7:

5- GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)<sub>24</sub>-3.

*Erststrang-Synthese:*

1. Primer-Hybridisierung: 70°C 10 min	RNA T7-(dT) <sub>24</sub> Primer	10 µl (16 µg) 1 µl
2. Temperierung: 42°C 2 min	Mastermix: 5 x Erststrang-Puffer DTT (0,1M) dNTPs (10mM)	4 µl 2 µl 1 µl
3. Erststrang-Synthese: 42°C 1 h	SuperScript™ II RT (200 U / µl)	2 µl
<i>Gesamtvolumen</i>		<i>20 µl</i>

**Tabelle 11**

Die Proben wurden auf Eis gelagert, die Komponenten der *Zweitstrang-Synthese* zugefügt (Tabelle 12) und die Ansätze 2 h bei 16°C (Heizblock) inkubiert. Mögliche überstehende Enden des entstandenen Doppelstranges, die fälschlicherweise als Startpunkte für die RNA-Polymerase agieren können, wurden durch 5-minütige Inkubation mit T4-Polymerase geglättet.

*Zweitstrang-Synthese:*

RNase-freies Wasser	91 µl
5 x Zweitstrang-Puffer	30 µl
dNTP-Mix (10 mM)	3 µl
DNA-Ligase (10 U / µl)	1 µl
DNA-Polymerase I (10 U / µl)	4 µl
RNase H (2 U / µl)	1 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>150 µl</i>

T4 DNA-Polymerase (5 U / µl)	2 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>152 µl</i>

**Tabelle 12**

### 2.10.6 Aufreinigung und Konzentrierung der cDNA

*Phase Lock Gels* (PLG) unterstützen die Ausbildung einer stabilen Interphase zwischen wässriger und organischer Phase bei Phenolextraktionen. Die in der wässrigen Phase gelöste Probe kann vollständiger abpipettiert werden, die Ausbeute erhöht sich.

Der jeweils komplette cDNA-Ansatz (152  $\mu$ l) wurde mit 152  $\mu$ l Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gemischt und in das Probengefäß mit dem PLG gegeben. Nach Zentrifugation (2 min, 14.000 rpm) konnte die gut separierte obere, wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Probengefäß überführt werden ( $\approx$  140  $\mu$ l). In Gegenwart von 0,5 x Volumen Ammoniumacetat (7,5 M) wurde die cDNA mit 2,5 x Volumen Ethanol (absolut) bei -20°C über Nacht gefällt. Die nach Zentrifugation erhaltenen cDNA-Pellets (20 min, 13.000 rpm) wurden 2 Waschschritten mit Ethanol (80 %) unterzogen und nach Trocknung in 12  $\mu$ l RNase-freiem Wasser gelöst.

### 2.10.7 *In-vitro* Transkription (IVT)

Für die Umschreibung der cDNA in cRNA und die Biotin-Markierung mit Hilfe des Enzo Kit wurde der gesamte cDNA-Ansatz (12  $\mu$ l) eingesetzt (Tabelle 12).

#### *In-vitro* Transkription

cDNA	12 $\mu$ l
RNase-freies Wasser	10 $\mu$ l
10 x HY Reaktionspuffer	4 $\mu$ l
10 x Biotin-markierte Ribonukleotide	4 $\mu$ l
10 x DTT	4 $\mu$ l
10 x RNase-Inhibitor-Mix	4 $\mu$ l
20 x T7-RNA-Polymerase	2 $\mu$ l
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>40 <math>\mu</math>l</i>

**Tabelle 13**

Die Komponenten des Kit wurden in obengenannter Reihenfolge zugegeben, vorsichtig gemischt, kurz anzentrifugiert (5 sec) und für 5 h bei 37°C (Heizblock) inkubiert. Alle 45 min wurde erneut vorsichtig gemischt und die biotinylierte cRNA bei -20°C eingefroren.

### 2.10.8 Aufreinigung und Konzentrierung der biotinylierten cRNA

Die Aufreinigung der cRNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit. Hierfür wurde jeweils die Hälfte der cRNA (20 µl) auf eine Säule gegeben, abschließend mit je 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert, die Eluate vereinigt (60 µl) und vermessen. Nach der alkoholischen Fällung in Gegenwart von Ammoniumacetat wurde die cRNA in einer Konzentration von 1–2 µg/µl gelöst, erneut quantifiziert und die synthetisierte cRNA-Menge berechnet (siehe *Technical Manual*, Affymetrix).

### 2.10.9 Fragmentierung der cRNA

Es wurden jeweils 20 µg cRNA mit 8 µl 5 x Fragmentierungspuffer versetzt und mit der entsprechenden Menge Wasser auf ein Volumen von 40 µl aufgefüllt. Die cRNA-Konzentration im Fragmentierungsmix betrug 0,5 µg/µl. Die Fragmentierung fand bei 95°C (Heizblock) für 35 min statt.

### 2.10.10 Hybridisierung

Die Arrays wurden mit 1 x Hybridisierungspuffer befüllt und für 10 min bei 45°C im GeneChip® Hybridisierungssofen temperiert.

*Hybridisierungscocktail:*

RNase-freies Wasser	94 µl
2 x Hybridisierungspuffer	150 µl

20 x Hybridisierungs-Kontroll-Kit (= Kontroll-cRNA, Kontroll-Oligo B2; Affymetrix)	15 µl
3 nM Kontroll-Oligo B2 (Affymetrix)	5 µl
Heringssperma DNA (Promega; Mannheim)	3 µl
Acetyliertes BSA (50 mg / ml; Gibco- Invitrogen, Karlsruhe)	3 µl
Fragmentierte, biotinylierte cRNA	30 µl (15 µg)
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>300 µl</i>

**Tabelle 14**

Der Hybridisierungscocktail wurde zunächst für 5 min bei 99°C und weitere 5 min bei 45°C inkubiert (Tabelle 13). Eine anschließende Zentrifugation (2 min, 14.000 rpm) diente der Entfernung von Schwebeteilchen. Aus den temperierten Arrays wurde der 1 x Hybridisierungspuffer abgesaugt und der Hybridisierungscocktail (200 µl) eingefüllt. Die Hybridisierung erfolgte über 16 h bei 45°C im Hybridisierungsofen unter Rotation (60 rpm).

### **2.10.11 Färbung und Detektion**

Der Hybridisierungscocktail wurde aus den Arrays entfernt und durch 250 µl Waschpuffer A ersetzt. Nach Platzierung der Arrays in der Fluidics Station (Affymetrix) erfolgten, computergesteuert (Programm EukGE-WS2v4), mehrere Wasch- und Färbezyklen:

1. Waschpuffer A
2. Waschpuffer B
3. Färbung mit SAPE-Lösung (Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat)
4. Waschpuffer A
5. Färbung (Antikörperverstärkung) mit biotinyliertem Anti-Streptavidin-Antikörper
6. Färbung mit SAPE-Lösung (Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat)
7. Waschpuffer A.

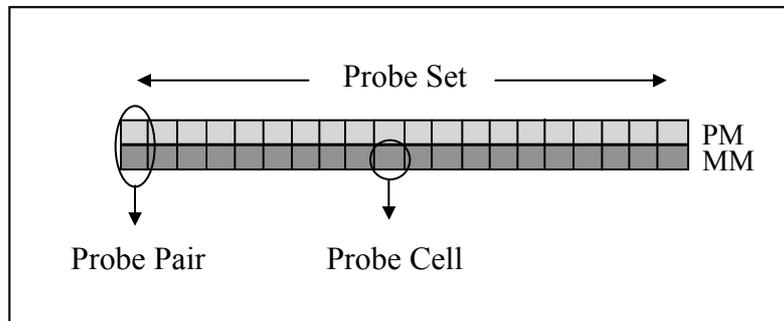
Die Arrays wurden bei 570 nM gescannt (Agilent GeneArray® Scanner).

### **2.10.12 Qualitätskontrolle und Expressionsanalyse**

Vor der eigentlichen Expressionsanalyse erfolgt die qualitative Beurteilung der vorangegangenen Schritte der cRNA-Synthese und Hybridisierung. Dazu gehört die Auswertung der B2-Oligos, die positive Hybridisierungskontrollen darstellen und Aussagen zur Effizienz der Hybridisierung treffen. Die Qualität der synthetisierten cRNA wird mittels Aktin und GAPDH, als internen Kontrollgenen, abgeschätzt.

Auf einem Array sind jedem Gen in der Regel 32 Zellen (*probe cells*) innerhalb eines *probe sets* zugeordnet; in jeder Zelle sind mehrere Millionen Kopien eines spezifischen Oligonukleotids aufgebracht (Abb. 5). In 16 der Zellen entsprechen die Sonden vollständig einem bestimmten Bereich des jeweiligen Gentranskripts. Dies ermöglicht eine optimale Hybridisierung von Sonde und cRNA (*perfect match, PM*). Die restlichen 16 Zellen enthalten Oligonukleotide, die einen homomeren Basentausch an einer zentralen Position aufweisen. Somit kommt es an dieser Position zu einer Fehlpaarung zwischen Sonde und

cRNA (*mismatch*, *MM*) und folglich zu keiner oder einer wesentlich schwächeren Bindung. Jede *perfect match*-Zelle korrespondiert mit einer *mismatch*-Zelle. Beide ergeben ein Probenpaar (*probe pair*).



**Abbildung 5** *Probe Set* (nach „Affymetrix Microarray Suite“ Handbuch)

#### *Absolute Expressionsanalyse:*

Mit Hilfe der *Affymetrix Microarray Suite Software* (MAS) werden die Rohintensitätswerte zahlreicher Pixel innerhalb einer Zelle ermittelt und, nach Hintergrund-Korrektur, zu einem Intensitätswert pro Zelle zusammengefasst. Die Differenz dieser „Zell-Intensitätswerte“ innerhalb eines Probenpaares (*perfect match* ↔ *mismatch*) ermöglicht die Beurteilung der Spezifität der Hybridisierung. Die Summe aller Probenpaar-Differenzen eines *probe sets* ergibt dasjenige quantitative Signal für ein Transkript, das als sogenannte *average difference* (durchschnittliche Differenz) für anschließende Vergleichsanalysen mehrerer Arrays miteinander verwendet wird.

Unter Berücksichtigung mehrerer Parameter liefert die MAS schließlich eine qualitative Aussage für jedes Transkript in Form des *absolut call*. Dieser besagt, ob ein Transkript detektierbar (*present*), grenzwertig (*marginal*) oder nicht detektierbar (*absent*) ist.

#### *Vergleichende Expressionsanalyse*

Bevor zwei Arrays verglichen werden können, müssen zunächst Skalierungs- und Normalisierungs-Methoden angewandt werden, um Variationen und Abweichungen der Arrays untereinander zu korrigieren. Danach berechnet die MAS, unter Anwendung

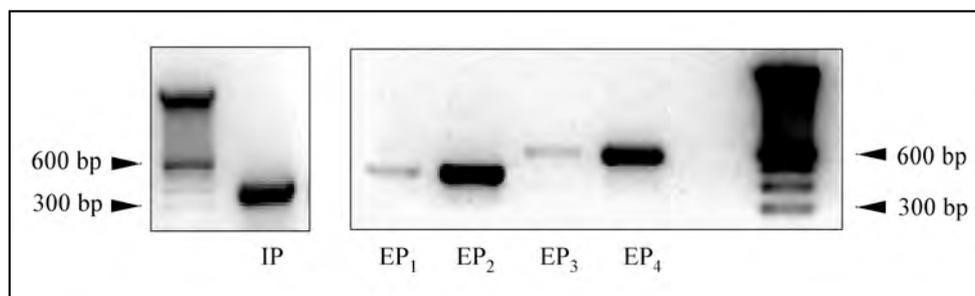
verschiedener Algorithmen, den sogenannten *difference call* sowie das Ausmaß der Expressionsänderung. Der *difference call* ist eine qualitative Aussage, ob ein Transkript auf 2 Arrays, hybridisiert mit den cRNAs der unterschiedlichen Bedingungen eines Versuchsansatzes (z.B. Kontrolle vs. Stimulation), verschieden exprimiert wurde: *increase* (erhöhte Expression), *decrease* (erniedrigte Expression), *marginal increase*, *marginal decrease* oder *no change* (unveränderte Expression). Die *signal log ratio* (SLR) gibt die Expressionsänderung als  $\log_2$  quantitativ wieder und kann in ein Vielfaches der Kontrolle (*fold change = FC*) umgerechnet werden.

### 3 ERGEBNISSE

Im ersten Teil werden zunächst die Effekte des stabilen PGI<sub>2</sub>-Analogon Iloprost und von PGE<sub>2</sub> auf die Phosphorylierung von Proteinen fokaler Adhäsionen, speziell FAK und Paxillin, sowie beteiligte Mechanismen beschrieben. Es folgen die Ergebnisse funktioneller Experimente zur Regulation der cAMP-Freisetzung, der Migration, der Proliferation und der Proteine des Zellzyklus durch Iloprost und PGE<sub>2</sub>. Im letzten Teil werden die Ergebnisse der Genexpressions-Analyse Iloprost-stimulierter hASMC angeführt.

#### 3.1 Expression von IP- und EP-Rezeptoren in hASMC

Mittels RT-PCR wurde das Expressionsmuster der IP- und EP-Rezeptoren in PDGF-BB-behandelten hASMC erstellt. Wie in Abbildung 6 dargestellt, konnten sowohl der IP-Rezeptor als auch alle Subtypen des EP-Rezeptors (EP<sub>1-4</sub>-Rezeptor) nachgewiesen werden.



**Abbildung 6** Expression von IP- und EP<sub>1-4</sub>-Rezeptoren in PDGF-behandelten hASMC.

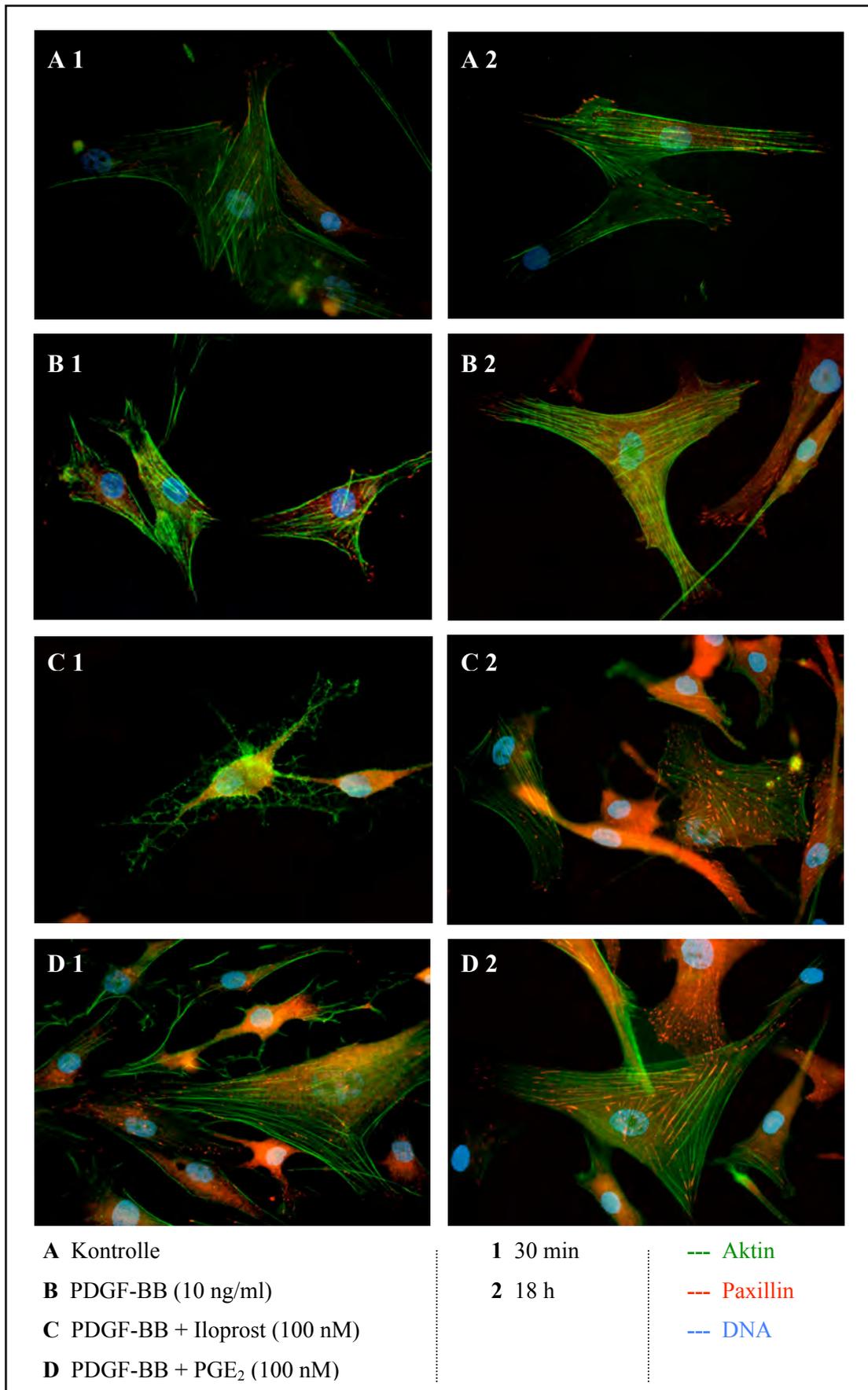
Die K<sub>i</sub>-Werte von PGE<sub>2</sub> für die jeweiligen EP-Rezeptoren betragen: 20 nM (EP<sub>1</sub>), 12 nM (EP<sub>2</sub>), 1 nM (EP<sub>3</sub>), 2 nM (EP<sub>4</sub>). Der K<sub>i</sub>-Wert von Iloprost für den IP-Rezeptor beträgt: 11 nM (Narumiya et al., 1999).

Die K<sub>i</sub>-Werte stammen aus Radioligandenbindungsstudien an kultivierten *Chinese hamster ovary*-Zellen (CHO-Zellen), in denen die stabile Expression von EP- und IP-Rezeptoren möglich ist (Kiryama et al., 1997). Nach Messung der Bindung eines radioaktiv markierten Liganden (z.B. [<sup>3</sup>H]-Iloprost) an einem Rezeptor (z.B. IP-Rezeptor) wird der K<sub>D</sub>-Wert (Dissoziationskonstante) berechnet. In einem nachfolgenden Verdrängungsexperiment

(Kompetitionsexperiment) wird die Verdrängung des Radioliganden (RL) durch steigende Konzentrationen eines nicht radioaktiv markierten Kompetitors (z.B. PGE<sub>2</sub>) als Differenz aus Gesamt-RL-Bindung und Rest-RL-Bindung nach Verdrängung (unspezifische Bindung) ermittelt. Aus den Kompletionsdaten ist die Affinität des Kompetitors zum Rezeptor quantitativ über die Berechnung des K<sub>i</sub>-Wertes zugänglich (Cheng und Prusoff, 1973). Voraussetzung für diese Studien sind konstante RL- und Rezeptorkonzentrationen.

### **3.2 Der Einfluss von Iloprost und PGE<sub>2</sub> auf Zytoskelett und fokale Adhäsionen**

HASMC wurden in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml) mit Iloprost (100 nM) oder mit PGE<sub>2</sub> (100 nM) für die Dauer von 30 min oder 18 h behandelt. Wie in Abbildung 7 angezeigt, hatte sich nach 30 min die Zellmorphologie dramatisch verändert. Es kam zu Einstülpungen der Membran, Schrumpfung des Zytosols und einer Abrundung der Zellen mit zurückbleibenden dünnen, verzweigten Fortsätzen. Die Anfärbung des Aktin-Zytoskeletts mit FITC-markiertem Phalloidin (grün) veranschaulichte die Verringerung von Aktin-Stressfasern und den Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts. Die Zahl der fokalen Kontakte nahm ab, was durch den immunologischen Nachweis des fokalen Proteins Paxillin (rot) mit einem Cy3-markierten Antikörper sichtbar wurde. Die Zellkerne wurden blau angefärbt. Die Deformationen der zellulären Struktur waren unter Iloprost (Abb. 7 C1) stärker ausgeprägt als unter PGE<sub>2</sub> (Abb. 7 D1). Innerhalb von 18 h fand eine vollständige Rekonstitution der zellulären Morphologie und eine Reorganisation des Zytoskeletts statt (Abb. 7 C2 + D2). Zahlreiche Aktin-Stressfasern durchzogen den Zellkörper; in der Peripherie traten fokale Adhäsionspunkte teilweise überschießend auf.



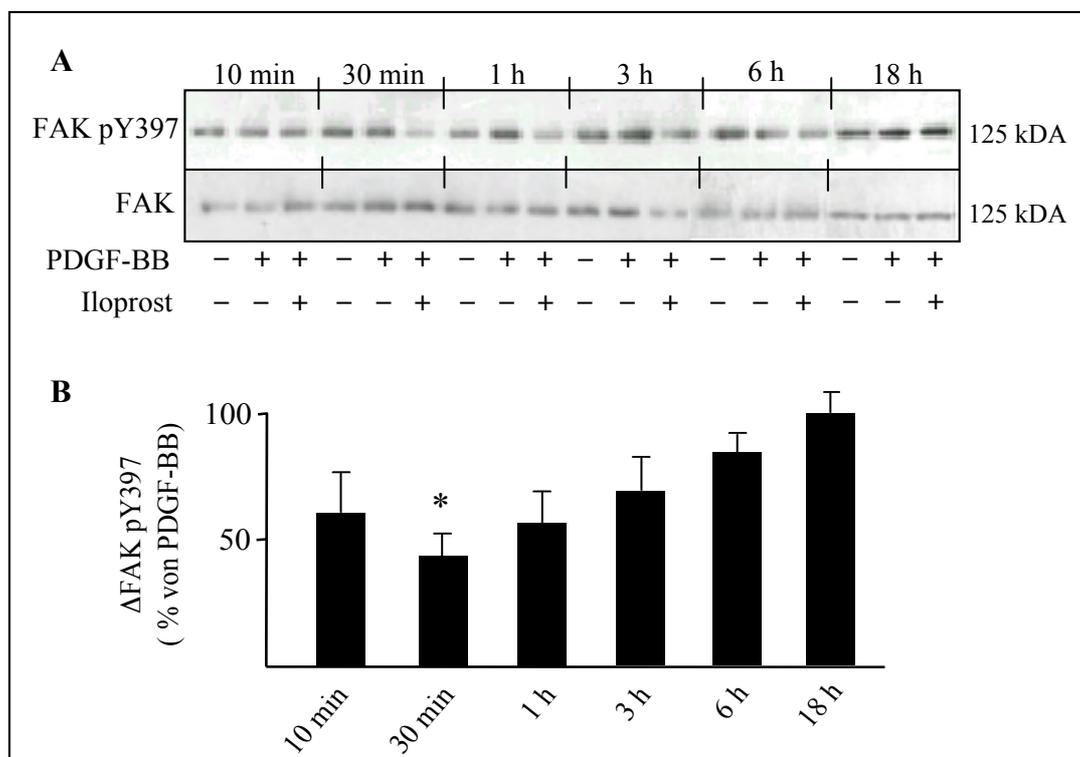
**Abbildung 7** Reversible morphologische Veränderungen von hASMC nach 30-minütiger Stimulation mit Iloprost (100 nM) und PGE<sub>2</sub> (100 nM) in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml). Rekonstitution der zellulären Strukturen nach 18 h. Fluoreszenzfärbung für Aktin und DNA, immunocytochemischer Nachweis von Paxillin.

### 3.3 Einfluss von Iloprost und PGE<sub>2</sub> auf den Phosphorylierungsgrad von Proteinen fokaler Adhäsionen

Innerhalb des komplexen Proteingefüges fokaler Adhäsionen nimmt die FAK eine zentrale Position bei der Vermittlung extrazellulärer Signale in das Zellinnere ein. Das Verschwinden der Adhäsionspunkte und der Strukturverlust des Aktin-Zytoskeletts in Gegenwart von Iloprost und PGE<sub>2</sub> führten zu der Überlegung, dass auch die FAK von Veränderungen betroffen sein könnte. Mittels Western Blot-Analyse wurde sowohl das Gesamtprotein als auch die autophosphorylierte Form der FAK (FAK-pY397) analysiert.

#### 3.3.1 Zeitabhängige Veränderung des FAK-Phosphorylierungsgrades durch Iloprost

Die Behandlung der hASMC mit Iloprost (100 nM) über einen Zeitraum von 10 min – 18 h führte in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml) zu einer Hypophosphorylierung der FAK am Tyrosinrest 397 (Abb. 8A), die nach 30 min signifikant war (Abb. 8B).



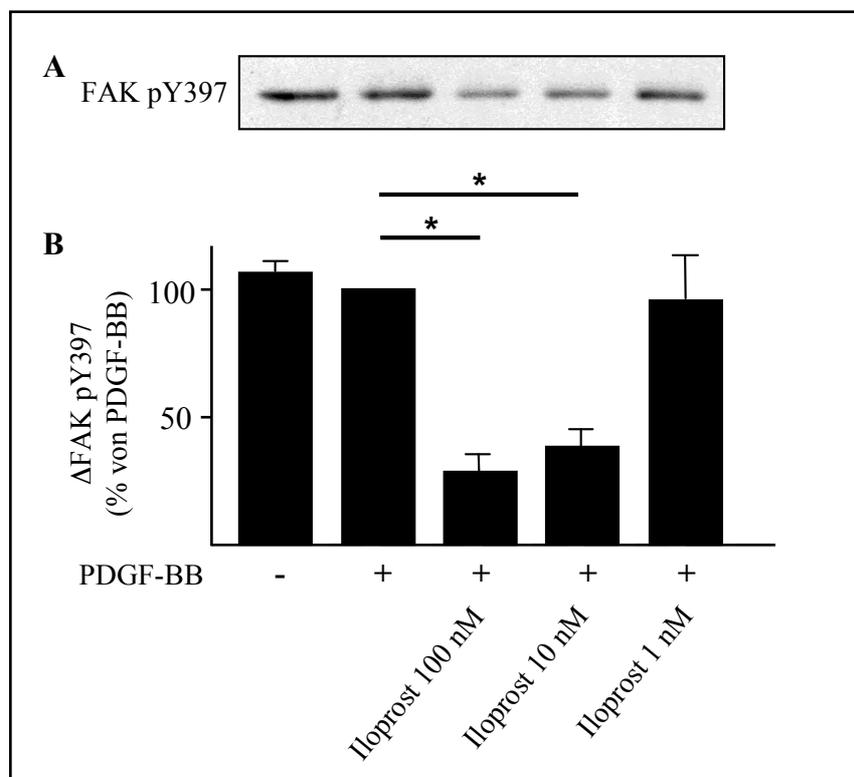
**Abbildung 8** Kinetik der Iloprost-induzierten FAK-Hypophosphorylierung. A. Repräsentative Western Blots für FAK pY397- und FAK-Protein. B. Densitometrische Auswertung der FAK-pY397 Expression von 3 unabhängigen Experimenten und Darstellung als Prozent von PDGF-BB (n = 3; Mittelwerte ± SEM; \*, p < 0,05 vs. PDGF-BB).

Nach 18 h hatte der Phosphorylierungsgrad von Iloprost-stimulierten Zellen wieder das Niveau der nur mit PDGF-BB behandelten Zellen erreicht. Das FAK-Gesamtprotein zeigte keine Veränderungen (Abb. 8A). Die Kinetik der FAK-Hypophosphorylierung korreliert mit dem Zeitverlauf der morphologischen Umgestaltungen der hASMC unter Iloprost.

Alle nachfolgenden Untersuchungen wurden für die Dauer von 30 min durchgeführt, dem Zeitpunkt zu dem die FAK nach Behandlung mit Iloprost signifikant hypophosphoryliert wurde.

### 3.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der FAK-Hypophosphorylierung durch Iloprost

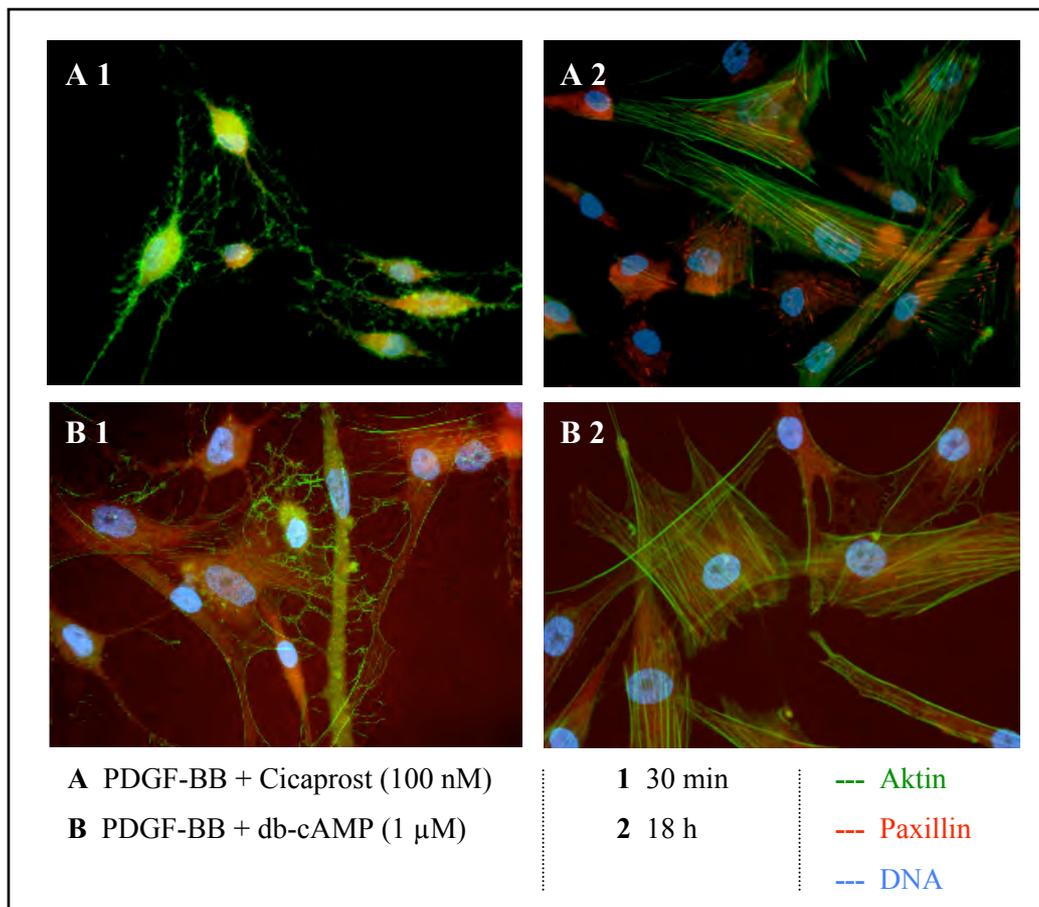
Die Zellen wurden mit 1, 10 und 100 nM Iloprost für 30 min stimuliert und die Menge autophosphorylierten FAK-Proteins im Western Blot untersucht. Die quantitative Auswertung von 3 Experimenten ergab bei einer Iloprost-Konzentration von 10 nM eine signifikante Hypophosphorylierung der FAK im Vergleich zu PDGF-BB (10 ng/ml). Keinen Effekt zeigte die Stimulation mit 1 nM Iloprost. Die stärkste FAK-Hypophosphorylierung zeigte sich nach Behandlung der hASMC mit 100 nM Iloprost (Abb. 9).



**Abbildung 9** Konzentrationsabhängigkeit der Iloprost-induzierten FAK-Hypophosphorylierung. A. Repräsentativer Western Blot für FAK-pY397-Protein nach 30-minütiger Behandlung mit verschiedenen Iloprost-Konzentrationen. B. Densitometrische Auswertung der FAK-pY397 Expression von 3 unabhängigen Experimenten und Darstellung als Prozent von PDGF-BB (n = 3; Mittelwerte ± SEM; \*, p < 0,05 vs. PDGF-BB).

### 3.3.3 cAMP-abhängige morphologische Veränderungen in hASMC

Iloprost bewirkt in SMC durch Bindung an den G<sub>s</sub>-Protein-gekoppelten IP-Rezeptor eine intrazelluläre cAMP-Freisetzung. Andere Arbeiten beschreiben Zusammenhänge zwischen der intrazellulären cAMP-Konzentration und Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts in Fibroblasten (Lamb et al., 1988). In den vorliegenden Versuchen wurden hASMC mit db-cAMP (1 mM), einem membrangängigen cAMP-Analogen, und mit Cicaprost (100 nM), einem spezifischen Agonisten am G<sub>s</sub>-gekoppelten IP-Rezeptor, stimuliert.



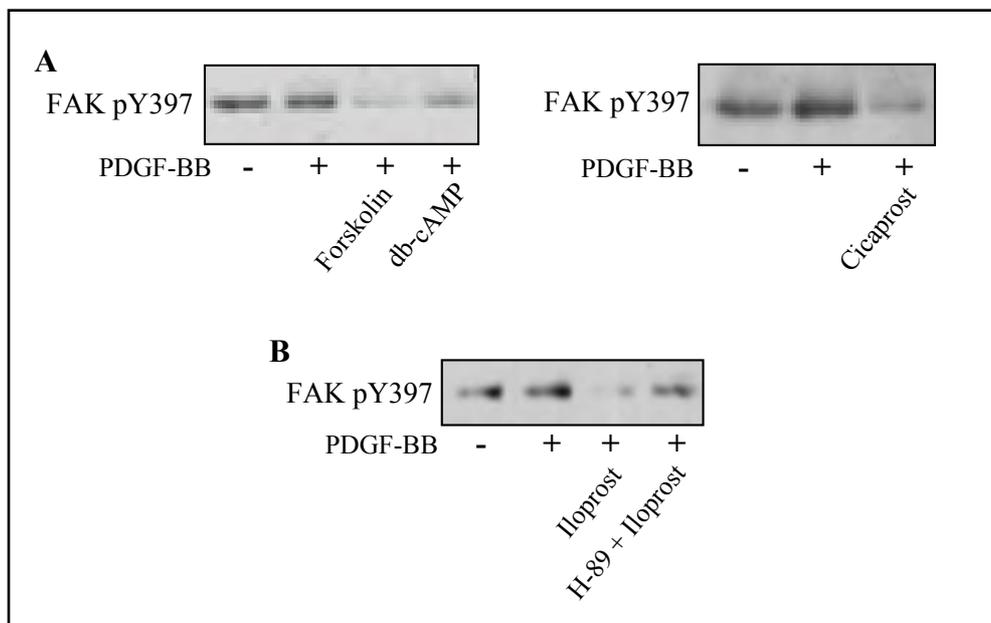
**Abbildung 10** cAMP-abhängige reversible morphologische Veränderungen von hASMC nach 30-minütiger Stimulation mit Cicaprost (100 nM) und db-cAMP (1 mM) in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml). Rekonstitution der zellulären Strukturen nach 18 h. Fluoreszenzfärbung für Aktin und DNA, immunocytochemischer Nachweis von Paxillin.

Wie Abbildung 10 zeigt, kam es nach 30-minütiger Behandlung der hASMC mit Cicaprost bzw. db-cAMP zu dramatischen Veränderungen der Zellmorphologie. Das Aktin-Zytoskelett (grün) bildete sich stark zurück, die Zahl fokaler Adhäsionspunkte (rot, Paxillin) nahm ab. Nach 18 h hatten sich die zellulären Strukturen wieder vollständig zurückgebildet. Diese Beobachtungen entsprechen den Veränderungen von hASMC nach Iloprost- bzw. PGE<sub>2</sub>-

Stimulation und stützen die Annahme einer cAMP-Abhängigkeit der Prostaglandin-Wirkungen.

### 3.3.4 cAMP-Abhängigkeit der FAK-Hypophosphorylierung durch Iloprost

In verschiedenen Zellsystemen konnten cAMP-vermittelte Veränderungen der Phosphorylierung von FAK sowie nachgeschalteten FA-Proteinen festgestellt werden (Padmanabhan et al., 1999; Han et al., 1996). Für die Untersuchung, ob es sich bei der Iloprost-induzierten FAK-Hypophosphorylierung ebenfalls um einen cAMP-vermittelten Mechanismus handelt, wurden hASMC mit Forskolin (10 µM) mit Cicaprost (100 nM) und mit db-cAMP (1 mM) stimuliert, sowie mit H-89 (100 nM), einem Inhibitor der Proteinkinase A, 30 min vor Zugabe von Iloprost inkubiert.



**Abbildung 11** cAMP-Abhängigkeit der FAK-Hypophosphorylierung. A. FAK-Hypophosphorylierung nach 30-minütiger Stimulation mit Forskolin (10 µM) und db-cAMP (1 mM) in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml). B. Aufhebung der Iloprost-induzierten FAK-Hypophosphorylierung (100 nM) durch H-89 (100 nM) in Gegenwart von PDGF-BB. Repräsentative Western Blots eines von jeweils mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

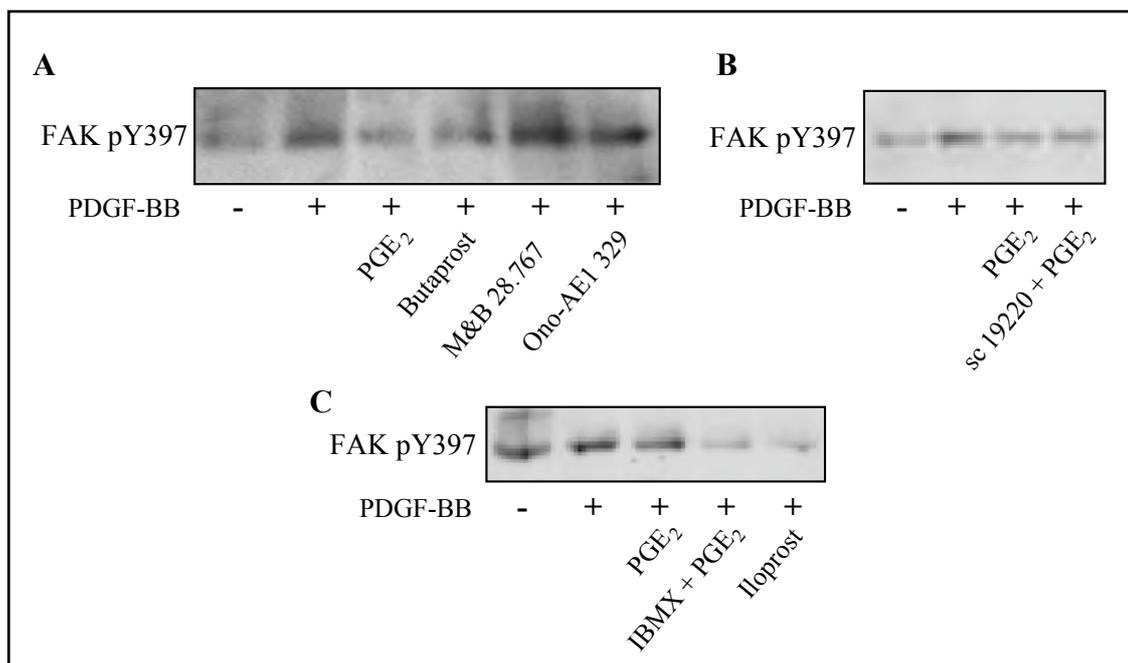
Abbildung 11 zeigt die Hypophosphorylierung der FAK nach 30-minütiger Stimulation von hASMC mit Forskolin, db-cAMP und Cicaprost in Gegenwart von PDGF-BB (Abb. 11A). Die Iloprost-induzierte FAK-Hypophosphorylierung konnte durch 30-minütige Vorinkubation mit H-89 aufgehoben werden (Abb. 11B).

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass cAMP-abhängige Signalwege an reversiblen

Veränderungen der Zellmorphologie und an der Hypophosphorylierung von FAK nach Stimulation mit Iloprost beteiligt sind.

### 3.3.5 cAMP-Abhängigkeit der FAK-Hypophosphorylierung durch PGE<sub>2</sub>

Mittels Western Blot wurde untersucht, ob auch PGE<sub>2</sub> eine Veränderung des Phosphorylierungsgrades von FAK hervorruft. PGE<sub>2</sub> gilt als Agonist an allen 4 bekannten EP-Rezeptoren, die sich hinsichtlich ihrer Signaltransduktion unterscheiden. Der EP<sub>1</sub>-Rezeptor agiert über G<sub>q</sub>-Proteine und aktiviert die Phospholipase C; die Rezeptoren EP<sub>2</sub> und EP<sub>4</sub> agieren über G<sub>s</sub>-Proteine, aktivieren Adenylatzyklase und cAMP-Freisetzung. Es handelt sich um stimulatorische Systeme. Der G<sub>i</sub>-gekoppelte EP<sub>3</sub>-Rezeptor verringert die cAMP-Freisetzung und übt eine inhibitorische Funktion aus. Zur Untersuchung des PGE<sub>2</sub>-Effektes und zur Charakterisierung beteiligter EP-Rezeptoren wurden spezifische EP<sub>1-4</sub>-Agonisten bzw. -Antagonisten eingesetzt.



**Abbildung 12** PGE<sub>2</sub>-induzierte FAK-Hypophosphorylierung. A. Analyse der Beteiligung stimulatorischer EP<sub>2,4</sub>-Rezeptoren durch 30-minütige Inkubation mit spezifischen Rezeptor-Agonisten in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml): Butaprost (1 µM, EP<sub>2</sub>), M&B 28767 (100 nM, EP<sub>3</sub>), Ono-AE1 329 (100 nM, EP<sub>4</sub>). B. Analyse der Beteiligung des inhibitorischen EP<sub>1</sub>-Rezeptores in Gegenwart von PDGF-BB: 30-minütige Vorinkubation mit dem EP<sub>1</sub>-spezifischen Inhibitor sc 19220 (10 µM) und anschließende 30-minütige PGE<sub>2</sub>-Stimulation. C. Verstärkung des PGE<sub>2</sub>-Effektes durch IBMX in Gegenwart von PDGF-BB: 30-minütige Vorinkubation mit IBMX (500 µM) und anschließende 30-minütige PGE<sub>2</sub>-Stimulation. Repräsentative Western Blots eines von jeweils mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

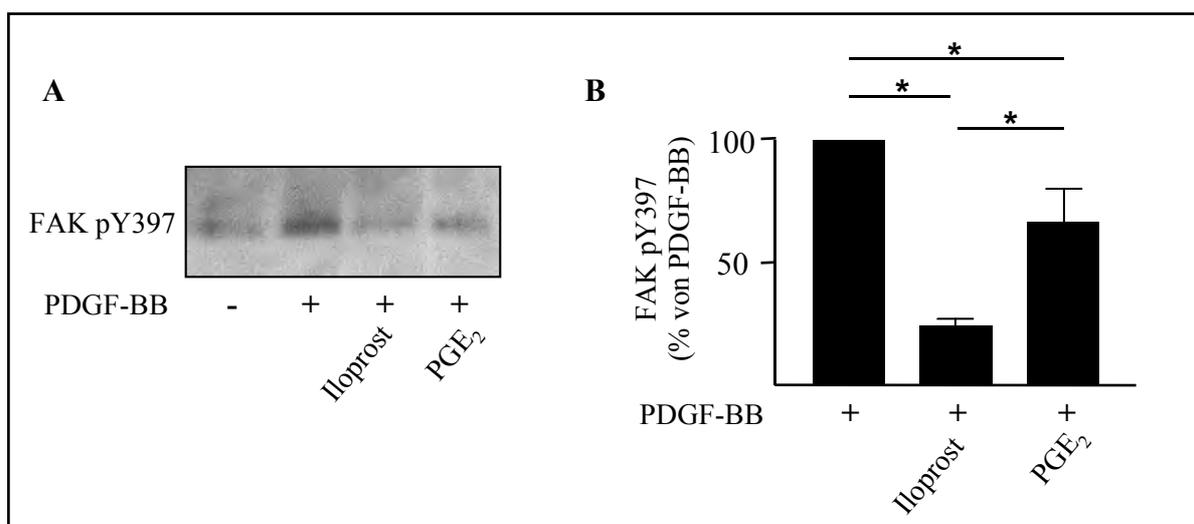
PGE<sub>2</sub> induzierte die Hypophosphorylierung der FAK (Abb. 12A). Butaprost (1 µM), ein EP<sub>2</sub>-Agonist, reduzierte die FAK-Phosphorylierung in vergleichbarem Maße wie PGE<sub>2</sub>. Keinen

Einfluss auf die FAK-Phosphorylierung zeigten der EP<sub>3</sub>-Agonist M&B 28.767 (100 nM) und der EP<sub>4</sub>-Agonist Ono-AE1 329 (100 nM). Auch die 30-minütige Vorinkubation mit sc19220 (10 µM), einem EP<sub>1</sub>-Antagonist, verhinderte den nachfolgenden PGE<sub>2</sub>-Effekt nicht (Abb. 12B). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die PGE<sub>2</sub>-induzierte FAK-Hypophosphorylierung über den G<sub>s</sub>-gekoppelten EP<sub>2</sub>-Rezeptor, cAMP-abhängig, vermittelt wird. Dies steht im Einklang mit der gezeigten G<sub>s</sub>-gekoppelten FAK-Hypophosphorylierung durch Iloprost über den IP-Rezeptor.

Die cAMP-Abhängigkeit wurde durch Verstärkung der PGE<sub>2</sub>-induzierten FAK-Hypophosphorylierung nach 30-minütiger Vorinkubation mit IBMX (500 µM) bestätigt (Abb. 12C). IBMX ist ein Phosphodiesterase-Inhibitor, der den Abbau von cAMP durch Phosphodiesterase hemmt und somit G<sub>s</sub>-gekoppelte, cAMP-abhängige Mechanismen unterstützt.

### 3.3.6 Vergleich Iloprost- und PGE<sub>2</sub>-induzierter Hypophosphorylierungen der FAK

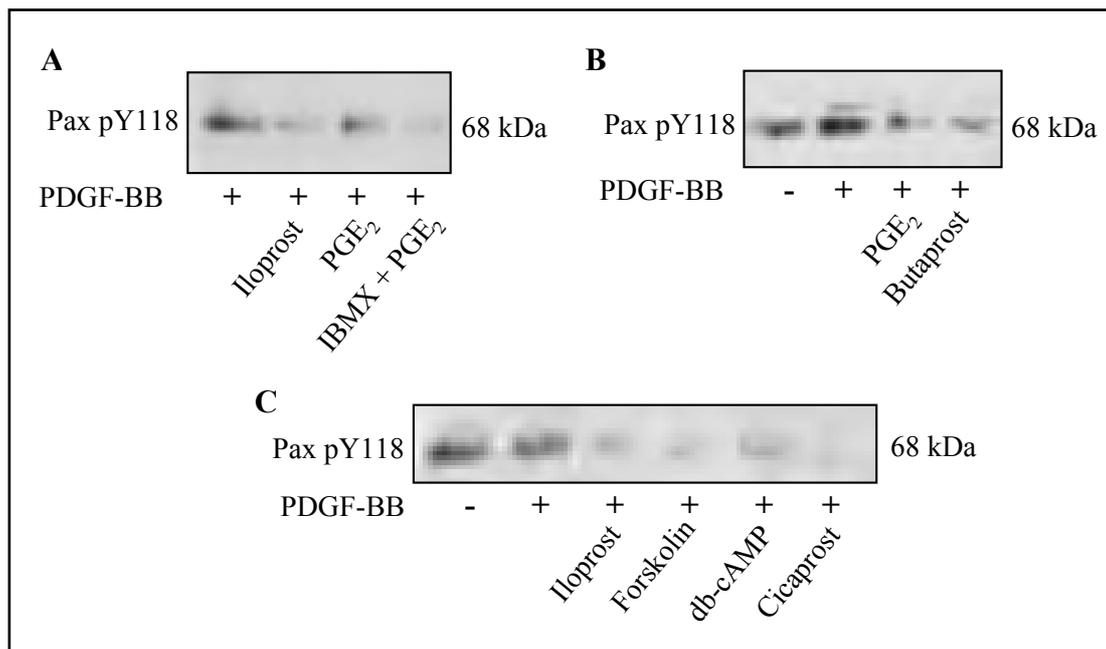
Bei den immunocytochemischen Färbungen wie auch in der Western Blot-Analyse fiel auf, dass die Effekte und Regulationen in Gegenwart von Iloprost stärker ausgeprägt waren als in Gegenwart von PGE<sub>2</sub> (Abb. 13A). Die quantitative Analyse der densitometrisch ausgewerteten Western Blots unabhängiger Experimente bestätigte diese Annahme: Iloprost und PGE<sub>2</sub> führten zu signifikanten Reduktionen der Autophosphorylierung der FAK gegenüber PDGF-BB-Behandlung. Iloprost bewirkte im Vergleich zu PGE<sub>2</sub> eine signifikant stärkere Senkung (Abb. 13B).



**Abbildung 13** Iloprost und PGE<sub>2</sub> reduzieren die FAK-Autophosphorylierung unterschiedlich. A. 30-minütige Stimulation von hASMC mit Iloprost (100 nM) oder PGE<sub>2</sub> (100 nM) in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml). Repräsentativer Western Blot. B. Densitometrische Auswertung unabhängiger Experimente (Iloprost, 100 nM, n = 7; PGE<sub>2</sub>, 100 nM, n=5; Mittelwerte ± SEM; \*, p < 0,05 vs. PDGF-BB).

### 3.3.7 Veränderung der Phosphorylierungsgrades von Paxillin durch Iloprost und PGE<sub>2</sub>

Die FAK ist ein frühes Signalprotein innerhalb des komplexen Proteinnetzwerks fokaler Adhäsionen. Veränderungen des Phosphorylierungsgrades von FAK könnten Konsequenzen für nachgeschaltete FA-Proteine haben. Ob Iloprost und PGE<sub>2</sub> nach 30-minütiger Stimulation ebenfalls einen Einfluss auf die PDGF-induzierte Phosphorylierung von Paxillin ausüben, wurde im Western Blot untersucht.



**Abbildung 14** Paxillin-Hypophosphorylierung durch Iloprost und PGE<sub>2</sub>. A. Die 30-minütige Vorinkubation mit IBMX (500 µM) in Gegenwart von PDGF-BB (10 nM) verringert die PGE<sub>2</sub>-induzierte (100 nM) Reduktion der Paxillin-Phosphorylierung auf das Niveau von Iloprost (100 nM). B. Butaprost (1 µM), ein spezifischer Agonist am EP<sub>2</sub>-Rezeptor, reduziert die Paxillin-Phosphorylierung wie PGE<sub>2</sub> in Gegenwart von PDGF-BB. C. cAMP-abhängige Paxillin-Hypophosphorylierung in Gegenwart von PDGF-BB. Repräsentative Western Blots eines von jeweils mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Iloprost (100 nM) und PGE<sub>2</sub> (100 nM) reduzierten die Phosphorylierung von Paxillin am Tyrosinrest 118 (Abb. 14A). Iloprost schien wiederum einen stärkeren Effekt als PGE<sub>2</sub> hervorzurufen, der jedoch nicht quantitativ ausgewertet wurde.

Eine Verbindung zwischen cAMP und der Phosphorylierung von Paxillin wurde bereits früher beschrieben (Padmanabhan et al., 1999; Han et al., 1996), weshalb die cAMP-Abhängigkeit der Prostaglandin-induzierten Hypophosphorylierung von Paxillin in hASMC experimentell überprüft wurde:

- Die Behandlung von hASMC mit Forskolin (10  $\mu$ M), db-cAMP (1 mM) und Cicaprost (100 nM), einem spezifischen Agonisten am  $G_s$ -gekoppelten IP-Rezeptor, reduzierte die Phosphorylierung von Paxillin in Gegenwart von PDGF-BB (Abb. 14C).
- Eine 30-minütige Vorinkubation mit IBMX (500  $\mu$ M) konnte die PGE<sub>2</sub>-induzierte Reduktion der Paxillin-Phosphorylierung auf das Niveau von Iloprost senken (Abb. 14A). Die Behandlung der hASMC mit Butaprost (1  $\mu$ M), dem Agonisten am  $G_s$ -gekoppelten EP<sub>2</sub>-Rezeptor, verringerte ebenfalls die Phosphorylierung von Paxillin (Abb. 14B).

Diese auf einen cAMP-abhängigen Mechanismus hinweisenden Ergebnisse korrelieren mit der cAMP-Abhängigkeit, die für die Regulation der FAK-Hypophosphorylierung durch Iloprost und PGE<sub>2</sub> gefunden wurde.

### 3.4 Mechanismen der FAK-Hypophosphorylierung durch Iloprost

Tyrosin-Phosphorylierungen unterliegen dynamischen Regulationen durch Protein-Tyrosin-Kinasen und Protein-Tyrosin-Phosphatasen. So beschreiben frühere Arbeiten eine Hemmung der u.a. Integrin-induzierten FAK-Phosphorylierung durch Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Genistein and Herbimycin A (Burrige et al., 1992, Liu et al., 2005). Ebenso gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Phosphatasen bei der cAMP-vermittelten FAK-Hypophosphorylierung (Han et al., 1996). Die durch PDGF-BB hervorgerufene Autophosphorylierung der FAK könnte verringert werden durch:

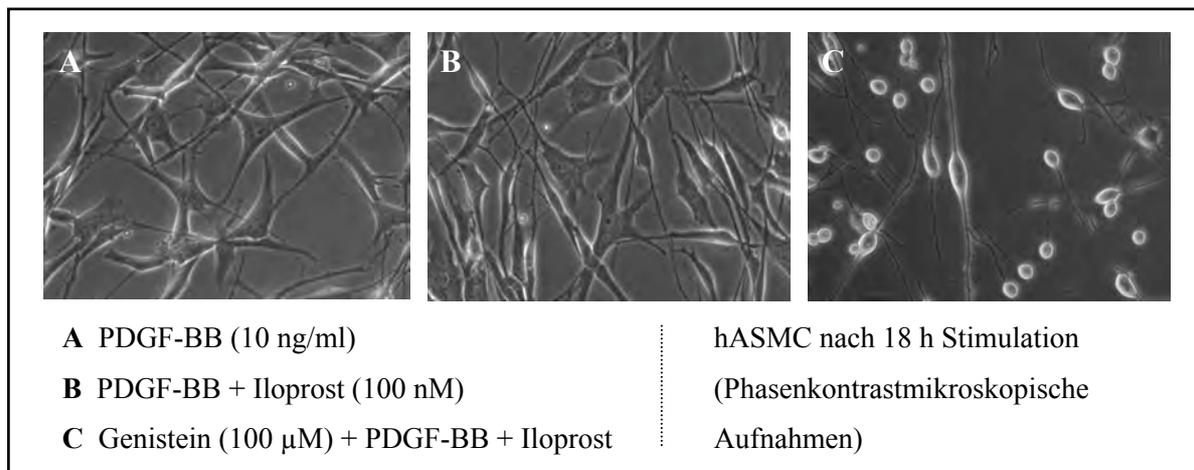
- eine Reduktion von Tyrosinkinase-Aktivitäten,
- eine Steigerung von Tyrosinphosphatase-Aktivitäten,
- eine Kombination aus beiden.

Für die Untersuchung dieser Mechanismen und ihrer Rolle bei der Iloprost-induzierten Hypophosphorylierung der FAK am Tyrosinrest 397 wurden Versuche mit Tyrosinkinase-Inhibitoren und Phosphatase-Inhibitoren durchgeführt.

#### 3.4.1 Beteiligung von Tyrosinkinasen

Genistein ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor. HASMC wurden für 30 Minuten mit Genistein (100  $\mu$ M) vorinkubiert und anschließend, weiterhin in Gegenwart von Genistein, mit PDGF-BB (10 ng/ml) bzw. PDGF-BB und Iloprost (100 nM) für weitere 30 Minuten stimuliert.

Genistein hatte keinen Einfluss auf die Morphologie PDGF-BB-behandelter Zellen. Die charakteristische Morphologie Iloprost-stimulierter Zellen wurde durch Genistein ebenfalls nicht verändert (Daten nicht gezeigt). Jedoch war zu beobachten, dass die Iloprost-induzierten morphologischen Veränderungen der Zellen in Gegenwart von Genistein erheblich länger anhielten. So zeigten die Zellen nach 18-stündiger Behandlung noch immer die typische ‚Iloprost-Morphologie‘: abgerundet, verringerte fokale Adhhesionen und charakteristische Fortsätze (Abb. 15C). Zum gleichen Zeitpunkt lagen die allein mit Iloprost stimulierten Zellen bereits wieder vollständig ausgebreitet vor (Abb. 15B).



**Abbildung 15** Genistein (100 µM) verzögert die Reorganisation der hASMC-Morphologie nach Iloprost-Stimulation (100 nM) in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml). Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen eines repräsentativen Experimentes nach 18h.

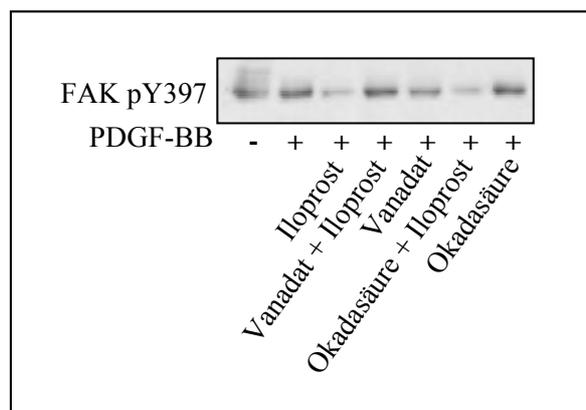
Die Proteinanalyse der FAK-Autophosphorylierung über einen Zeitraum von 18 h korrelierte mit den mikroskopischen Beobachtungen (Abb. 16). Genistein hatte keinen Einfluss auf die PDGF-BB-stimulierte FAK-Phosphorylierung oder die Iloprost-induzierte FAK-Hypophosphorylierung nach 30 min (Abb. 16A). Jedoch war nach 6 h in Gegenwart von Genistein die FAK-Autophosphorylierung durch Iloprost noch immer stark reduziert, während die FAK in allein mit Iloprost stimulierten Zellen das Phosphorylierungsniveau von PDGF-BB nahezu wieder erreicht hatte. Erst nach 18 h setzte auch in Gegenwart von Genistein eine allmähliche Rephosphorylierung von FAK ein, die sich allerdings in morphologischer Hinsicht noch nicht widerspiegelte (Abb. 15C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein die Rephosphorylierung der FAK und die Rekonstitution der zellulären Strukturen in hASMC nach Stimulation mit Iloprost verzögert.



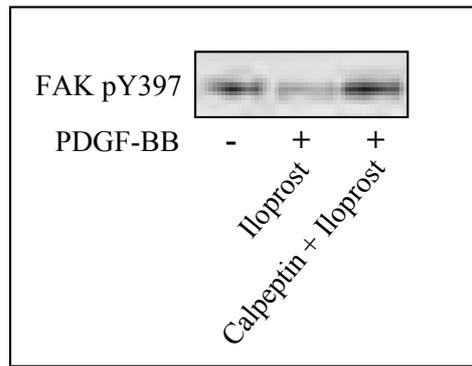
einer Vorbehandlung mit Vanadat aus. Vanadat allein hatte keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad der FAK.

Es wurden ebenfalls Versuche durchgeführt, die die Rolle von Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen (PP) bei der Hypophosphorylierung der FAK klären sollten. Ein PP-Inhibitor mit breitem Wirkungsspektrum ist Okadasäure. Die 30-minütige Vorinkubation der hASMC mit Okadasäure (100 nM) hatte keinen Einfluss auf die Iloprost-induzierten morphologischen Veränderungen (Daten nicht gezeigt). Auch in der Proteinanalyse wurde die FAK-Phosphorylierung durch Okadasäure in An- und Abwesenheit von Iloprost nicht modifiziert (Abb. 18).



**Abbildung 18** Einfluss von Phosphatase-Inhibitoren auf die FAK-Hypophosphorylierung durch Iloprost. Die 30-minütige Vorinkubation mit dem Proteinphosphatase-Inhibitor Vanadat (50  $\mu$ M) verhindert die Reduktion der FAK-Autophosphorylierung einer sich anschließenden 30-minütigen Stimulation mit Iloprost (100 nM) in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml) in hASMC. Okadasäure (100 nM) zeigte keinen Effekt. Repräsentativer Western Blot eines von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

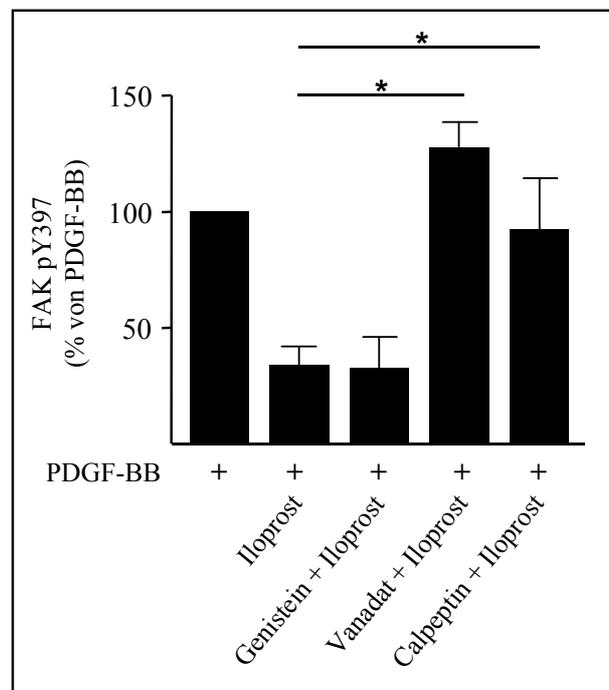
Zu den Tyrosinphosphatasen, für die ein Zusammenhang mit Proteinen der fokalen Adhäsionen bzw. der Signalübertragung in die Zelle beschrieben wurde, gehört u.a. SHP-2 (Yu et al., 1998; Inagaki et al., 2000; Vadlamudi et al., 2002; Manes et al., 1999). Calpeptin, als Hemmstoff der Protease Calpain bekannt, wurde gleichfalls als Inhibitor von SHP-2 identifiziert (Schoenwaelder et al., 2000). Zur genaueren Charakterisierung von PTP, die an der Dephosphorylierung der FAK am Tyrosinrest 397 beteiligt sein könnten, wurden Versuche mit Calpeptin (20  $\mu$ M) durchgeführt. Durch 30-minütige Vorinkubation mit Calpeptin konnte die Iloprost-induzierte FAK-Hypophosphorylierung vollständig aufgehoben werden (Abb. 19).



**Abbildung 19** Die 30-minütige Vorinkubation mit dem SHP-2-Inhibitor Calpeptin (20 μM) verhindert die Reduktion der FAK-Autophosphorylierung einer sich anschließenden 30-minütigen Stimulation mit Iloprost in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml). Repräsentativer Western Blot eines von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.4.3 Quantitative Analyse der Wirkungen von Tyrosinkinase- und Tyrosinphosphatase-Inhibitoren

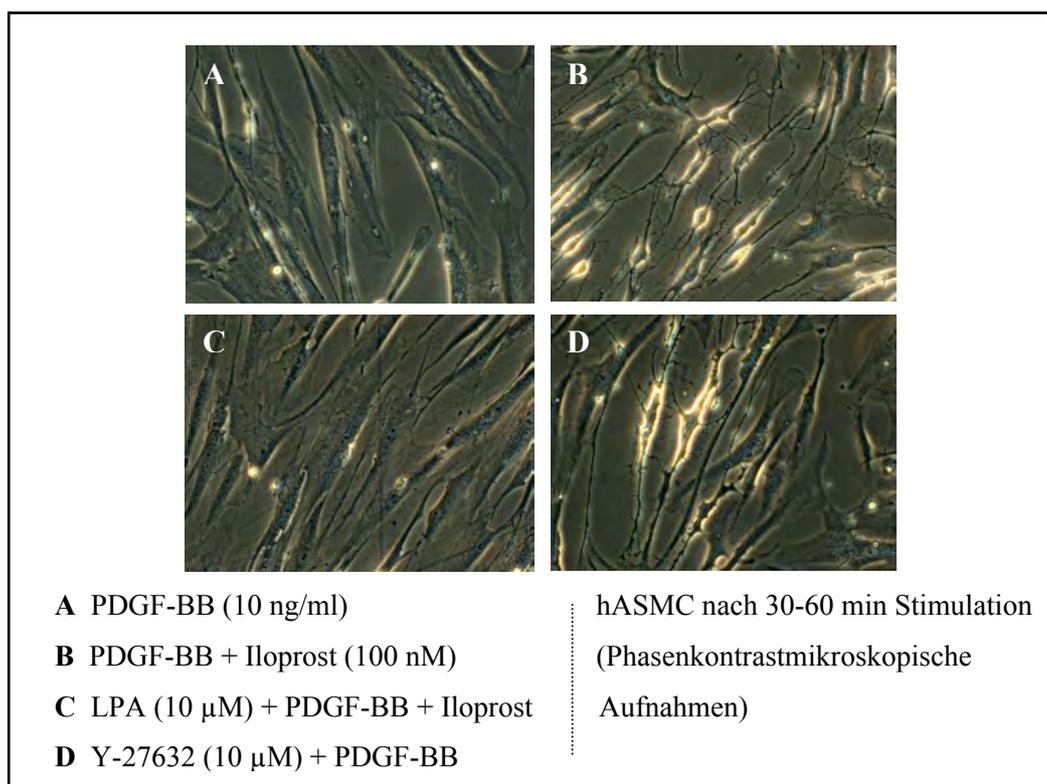
Sowohl die unspezifische PTP Vanadat als auch das SHP-2-spezifische Calpeptin führten zu einer signifikant höheren Autophosphorylierung der FAK in hASMC im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit Iloprost (Abb. 20). Die Inhibition von Protein-Tyrosinkinase durch Genistein hatte keinen Einfluss auf die FAK-Hypophosphorylierung nach 30-minütiger Iloprost-Stimulation.



**Abbildung 20** Densitometrische Auswertung der Einflüsse des PTK-Inhibitors Genistein und der PTP-Inhibitoren Vanadat und Calpeptin auf die FAK-Hypophosphorylierung nach 30-minütiger Stimulation mit Iloprost in Gegenwart von PDGF-BB in hASMC (n = 3; Mittelwerte ± SEM; \*, p < 0,05 vs. PDGF-BB + Iloprost)

### 3.4.4 Beteiligung von Rho-GTPasen an den Effekten nach Iloprost- bzw. PGE<sub>2</sub>-Stimulation

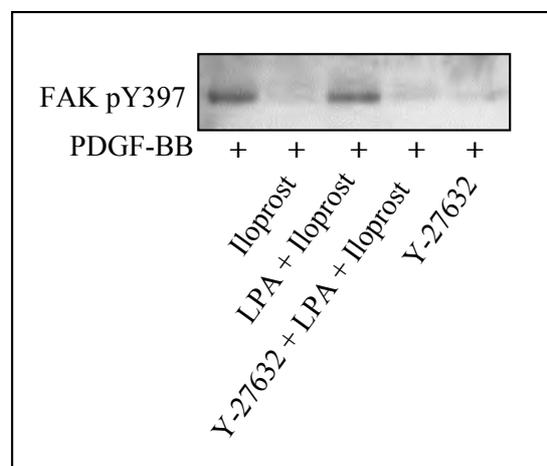
Seit den frühen 90-iger Jahren ist die zentrale Rolle der kleinen GTPasen der Rho-Familie als Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts bekannt (Ridley und Hall, 1992). Von wachsendem Interesse ist der hemmende Einfluss von cAMP auf Rho-abhängige Signalwege. Zur Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen der cAMP-abhängigen Iloprost-induzierten Hypophosphorylierung der FAK und Rho wurden Versuche mit LPA, einem Rho-Aktivator, und Y-27632, einem Inhibitor der nachgeschalteten Rho-Kinase (ROCK), durchgeführt. Die Vorinkubation mit LPA (10 µM) verhinderte die Konsequenzen einer Iloprost-Stimulation (100 nM) auf die Zellmorphologie von hASMC vollständig (Abb. 21C). Die Inhibition der Rho-Kinase in hASMC durch 30-minütige Vorinkubation mit Y-27632 (10 µM, ohne PDGF-BB) und anschließende 30-minütige Behandlung mit PDGF-BB rief in den Zellen ähnliche morphologische Veränderungen hervor wie Iloprost (Abb. 21D).



**Abbildung 21** Der Einfluss der GTPase Rho auf die Morphologie von hASMC. Die 30-minütige Vorinkubation mit dem Rho-Aktivator LPA (10 µM) verhindert die Veränderungen der Zellmorphologie (B) einer sich anschließenden 30-minütigen Stimulation mit Iloprost (100 nM) in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml) (C). Die 30-minütige Vorinkubation mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 (10 µM) und anschließende 30-minütige Behandlung der hASMC mit PDGF-BB ruft Iloprost-ähnliche Veränderungen der Zellmorphologie hervor (D).

Die morphologischen Beobachtungen standen im Einklang mit den FAK-Regulationen auf Proteinebene: die FAK-Hypophosphorylierung nach Iloprost-Stimulation wurde in Gegenwart von LPA vollständig unterbunden (Abb. 22).

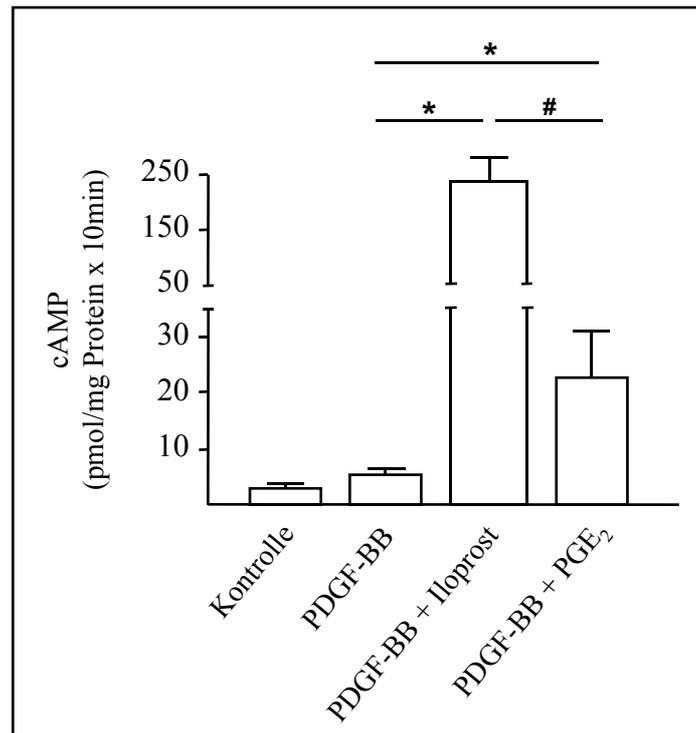
Die alleinige Inkubation von hASMC mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 in Gegenwart von PDGF-BB reduzierte die FAK-Autophosphorylierung in gleichem Maße wie Iloprost. Bemerkenswert ist die Aufhebung des LPA-Effektes (Verhinderung der Iloprost-induzierten FAK-Hypophosphorylierung) durch eine vorhergehende Inkubation mit dem ROCK-Inhibitor. Resultat war eine deutliche FAK-Hypophosphorylierung. Sie könnte ein Hinweis auf die Rho-abhängige Vermittlung des Iloprost-Effektes sein.



**Abbildung 22** Der Einfluss der GTPase Rho auf die Iloprost-induzierte Hypophosphorylierung der FAK in hASMC. Die 30-minütige Vorinkubation mit dem Rho-Aktivator LPA (10  $\mu$ M) verhinderte die FAK-Hypophosphorylierung einer sich anschließenden 30-minütigen Stimulation mit Iloprost (100 nM) in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml). Y-27632 hob den LPA-Effekt auf und imitierte bei alleiniger Inkubation den Iloprost-Effekt. Repräsentativer Western Blot eines von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.5 Unterschiedliche cAMP-Freisetzung durch Iloprost und PGE<sub>2</sub>

Die Stimulation von G<sub>s</sub>-gekoppelten Rezeptoren führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Mittels RIA sollte die durch Iloprost und PGE<sub>2</sub> freigesetzte cAMP-Menge quantifiziert und verglichen werden. Hierfür wurden hASMC für 10 min mit dem Phosphodiesterase-Hemmer IBMX (500  $\mu$ M) vorinkubiert und anschließend für 10 min mit Iloprost (100 nM) oder PGE<sub>2</sub> (100 nM) in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml) stimuliert.

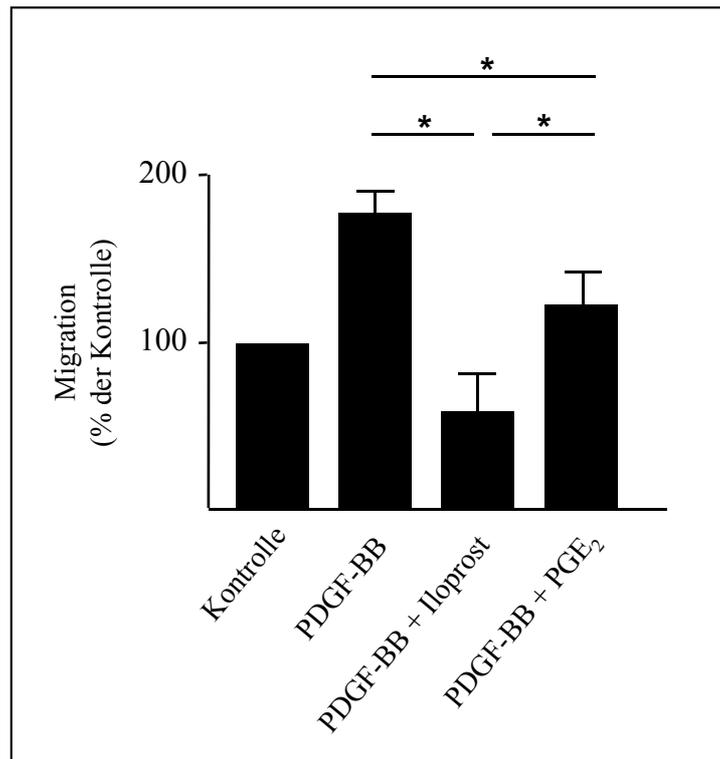


**Abbildung 23** Iloprost und PGE<sub>2</sub> induzieren signifikant unterschiedliche cAMP-Freisetzungen. Nach 10-minütiger Vorinkubation von hASMC mit IBMX (500 µM) und anschließender 10-minütiger Stimulation mit Iloprost (100 nM) und PGE<sub>2</sub> (100 nM) in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml) wurde freigesetztes cAMP isoliert, radioaktiv markiert und vermessen. Der zelluläre Rückstand diente der Proteinbestimmung (n = 6, Mittelwert ± SEM; \*, p < 0,05 vs. PDGF-BB; #, p < 0,05 vs. PGE<sub>2</sub>).

Iloprost und PGE<sub>2</sub> induzierten eine signifikante Zunahme des intrazellulären cAMP-Spiegels im Verhältnis zu der durch PDGF-BB freigesetzten cAMP-Menge (Abb. 23). Die Iloprost-induzierte cAMP-Freisetzung betrug das 10-fache der PGE<sub>2</sub>-stimulierten Freisetzung und unterschied sich signifikant von dieser. Dieser Befund korreliert mit der signifikant stärkeren FAK-Hypophosphorylierung durch Iloprost im Vergleich zu PGE<sub>2</sub>.

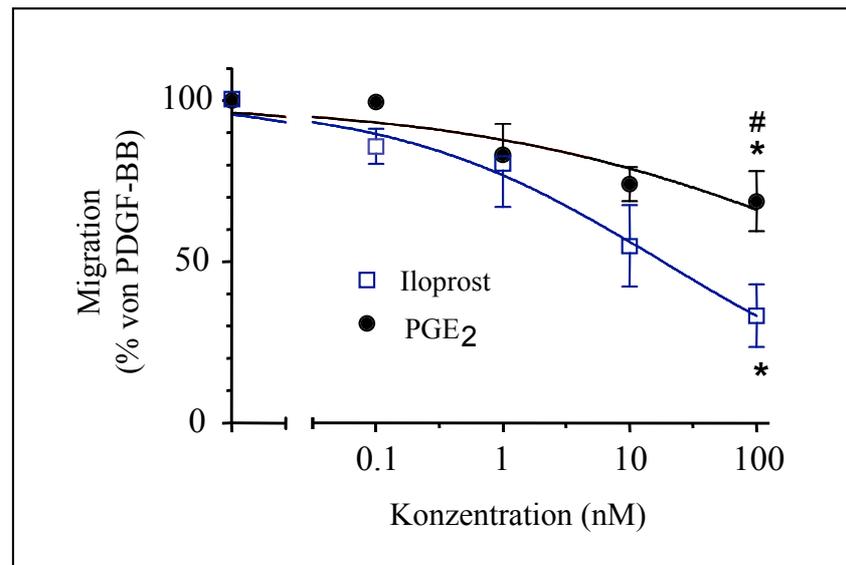
### 3.6 Unterschiedliche Migrationshemmung durch Iloprost und PGE<sub>2</sub>

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der durch Iloprost- und PGE<sub>2</sub>-vermittelten Effekte wurde ihr Einfluss auf die PDGF-BB-stimulierte Migration von hASMC über einen Zeitraum von 6 h analysiert. Sowohl Iloprost (100 nM) als auch PGE<sub>2</sub> (100 nM) führten zu einer signifikanten Hemmung der Migration (Abb. 24).



**Abbildung 24** Iloprost und PGE<sub>2</sub> hemmen die PDGF-BB-stimulierte Migration von hASMC signifikant unterschiedlich. Nach 6-stündiger PDGF-BB-stimulierter (10 ng/ml) Migration in Gegenwart von Iloprost (100nM) und PGE<sub>2</sub> (100 nM) wurden die durch eine Kollagen-beschichtete Membran migrierten Zellen fixiert und unter dem Mikroskop ausgezählt (n = 4-7, Mittelwert ± SEM; \*, p < 0,05 vs. PDGF-BB; #, p < 0,05 vs. PGE<sub>2</sub>).

Die Verringerung der PDGF-BB-induzierten Migration erfolgte konzentrationsabhängig (Abb. 25). Auffällig war, dass über den gesamten Konzentrationsbereich (1 nM, 10 nM, 100 nM) Iloprost die Migration tendenziell stärker als PGE<sub>2</sub> hemmte. Die Migrationshemmung durch Iloprost unterschied sich in der höchsten Konzentration (100 nM) schließlich signifikant von der Migrationshemmung durch PGE<sub>2</sub> (Abb. 24 + 25).



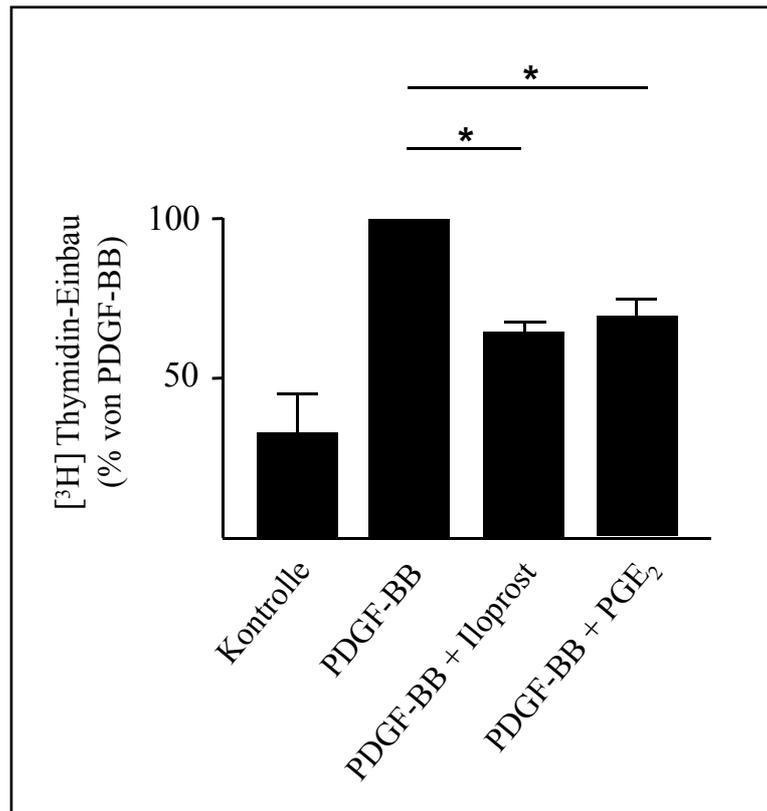
**Abbildung 25** Konzentrationsabhängige Hemmung der PDGF-BB-stimulierten Migration von hASMC durch Iloprost und PGE<sub>2</sub>. Iloprost bewirkte in der höchsten Konzentration (100 nM) eine signifikant stärkere Migrationshemmung als PGE<sub>2</sub> (100 nM) (n = 4-7, Mittelwert ± SEM; \*, p < 0,05 vs. PDGF-BB; #, p < 0,05 vs. PGE<sub>2</sub>).

### 3.7 Regulation von Proliferation und Zellzyklusproteinen

#### 3.7.1 Hemmung der DNA-Synthese

Iloprost und PGE<sub>2</sub> hemmen die Proliferation von kultivierten, glatten Gefäßmuskelzellen (Uehara et al., 1988; Yamamoto et al., 1999). Für die vergleichende Untersuchung der proliferationshemmenden Eigenschaften von Iloprost und PGE<sub>2</sub> innerhalb eines Zellsystems wurde die DNA-Synthese in hASMC mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau in Gegenwart von PDGF-BB über einen Zeitraum von 24 h bestimmt.

Iloprost (100 nM) und PGE<sub>2</sub> (100 nM) verringerten die PDGF-BB-stimulierte (10 ng/ml) DNA-Synthese signifikant. Es wurden keine Unterschiede im Ausmaß der Hemmung zwischen diesen Prostaglandinen festgestellt (Abb. 26).

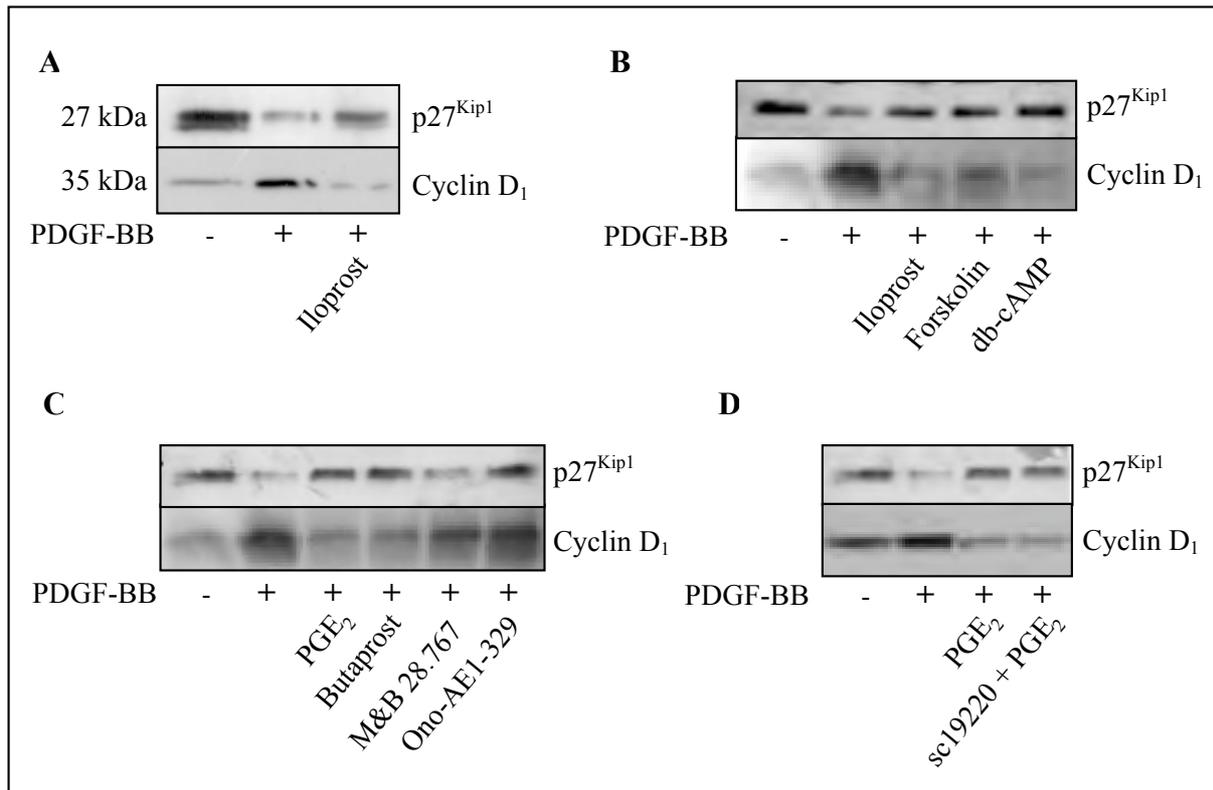


**Abbildung 26** Iloprost und PGE<sub>2</sub> hemmen die PDGF-BB-stimulierte DNA-Synthese in hASMC in gleichem Ausmaß. Der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau in die DNA von hSMC über einen Zeitraum von 24 h wurde mittels Szintillationsmessung quantifiziert (n = 6, Mittelwert ± SEM; \*, p < 0,05 vs. PDGF-BB).

### 3.7.2 Einfluss von Iloprost und PGE<sub>2</sub> auf die Expression der Zellzyklusproteine p27<sup>Kip1</sup> und Cyclin D<sub>1</sub>

Zur Charakterisierung der Phase des Zellzyklusarrests wurde die Proteinexpression von zwei relevanten Zellzyklus-Proteinen nach 18-stündiger Stimulation untersucht. Cyclin D<sub>1</sub>, ein direkter Regulator Cyclin-abhängiger Kinasen, ist für den Übergang von der G<sub>0</sub>- in die G<sub>1</sub>-Phase (Eintritt in den Zellzyklus) sowie die Progression der G<sub>1</sub>-Phase von Bedeutung; p27<sup>Kip1</sup>, ein Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen, hemmt die G<sub>1</sub>-Progression.

Iloprost (100 nM) führte in starkem Maße zu einer Induktion von p27<sup>Kip1</sup> und einer Reduktion von Cyclin D<sub>1</sub>-Protein verglichen mit der alleinigen PDGF-BB-Stimulation (10 ng/ml) (Abb. 27A). Ähnliche Regulationen wurden durch Behandlung der hASMC mit dem Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin (10 μM) und db-cAMP (1 mM) hervorgerufen, was einen zugrundeliegenden cAMP-abhängigen Mechanismus favorisiert (Abb. 27B).



**Abbildung 27** Iloprost und PGE<sub>2</sub> regulieren Zellzyklusproteine in hASMC nach 18-stündiger Stimulation in Gegenwart von PDGF-BB (10 ng/ml). **A.+ B.** Iloprost (100 nM), Forskolin (10 µM) und db-cAMP (1 mM) induzieren p27<sup>Kip1</sup>- und reduzieren Cyclin D<sub>1</sub>-Protein. **C.+ D.** PGE<sub>2</sub> (100 nM) induziert p27<sup>Kip1</sup>-Protein über die EP<sub>2</sub>/EP<sub>4</sub>-Rezeptoren und reduziert Cyclin D<sub>1</sub>-Protein über den EP<sub>2</sub>-Rezeptor. Repräsentativer Western Blot von mindestens 3 unabhängigen

Die Behandlung der Zellen mit PGE<sub>2</sub> (100 nM) rief ähnliche Proteinregulationen hervor wie Iloprost. Zur Klärung der beteiligten EP-Rezeptoren wurden Versuche mit spezifischen Agonisten an den EP<sub>1-4</sub>-Rezeptoren durchgeführt (Abb. 27 C+D):

- In Übereinstimmung mit PGE<sub>2</sub> bewirkte Butaprost (1 µM) eine starke p27<sup>Kip1</sup>-Induktion und Cyclin D<sub>1</sub>-Reduktion.
- Der EP<sub>4</sub>-Agonist Ono-AE1-329 (100 nM) rief eine Expressionssteigerung von p27<sup>Kip1</sup> hervor, hatte jedoch keinen Einfluss auf das PDGF-BB-Niveau von Cyclin D<sub>1</sub>.
- Weder die Stimulation des EP<sub>1</sub>- noch des EP<sub>3</sub>-Rezeptors hatte Einfluss auf die p27<sup>Kip1</sup>- und Cyclin D<sub>1</sub>-Proteinexpression. HASMC waren hierfür mit SC 19220 (10 mM), einem EP<sub>1</sub>-Antagonisten, für 30 min vorinkubiert und anschließend für 18 h mit PGE<sub>2</sub> stimuliert worden. Als selektiver EP<sub>3</sub>-Agonist diente M&B 28.767 (100 nM).

Somit zeichnet sich auch für die PGE<sub>2</sub>-vermittelten Effekte ein G<sub>s</sub>-gekoppelter, cAMP-abhängiger Mechanismus ab. Die Regulationen von p27<sup>Kip1</sup>- und Cyclin D<sub>1</sub> weisen darüber hinaus auf eine Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase durch PGE<sub>2</sub> hin.

### 3.8 Genexpressionsanalyse zum Einfluss von Iloprost auf hASMC

Der Einfluss von Iloprost auf die Genexpression wurde durch vergleichende Genexpressionsanalyse mit GeneArrays von Affymetrix untersucht. Der Fokus lag auf Veränderungen, die nach den Effekten auf die FA und das Zytoskelett auftreten und den Phänotyp der hASMC längerfristig beeinflussen könnten. Daher wurde eine Versuchsdauer von 18 h gewählt. Um Einflüsse durch eine mögliche Desensibilisierung des IP-Rezeptors auszuschließen, wurde Iloprost (100 nM) nur für die letzten 6 h des Versuches zugefügt. Als mitogener Stimulus diente PDGF-BB (10 ng/ml). Die Ergebnisse der Stimulation mit PDGF-BB + Iloprost wurden mit der alleinigen PDGF-BB-Stimulation (Kontrolle) verglichen. Iloprost führte bei 144 Genen zu einer Erhöhung (*increase*, positiver *fold change*, FC), bei 200 Genen zu einer Verringerung (*decrease*, negativer FC) der Gen-Expression. In Tabelle 14 sind Gene aufgeführt, deren Expression um den Faktor  $\geq 2$  (FC) reguliert wurde. Diese Regulationen wurden nach funktionellen Kriterien in Gene des Zellzyklus, des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix und Wachstumsfaktoren eingeteilt. Die entsprechenden Zugangsnummern (*accession number*, *Acc-No.*) dienen der besseren Zuordnung und Literaturrecherche.

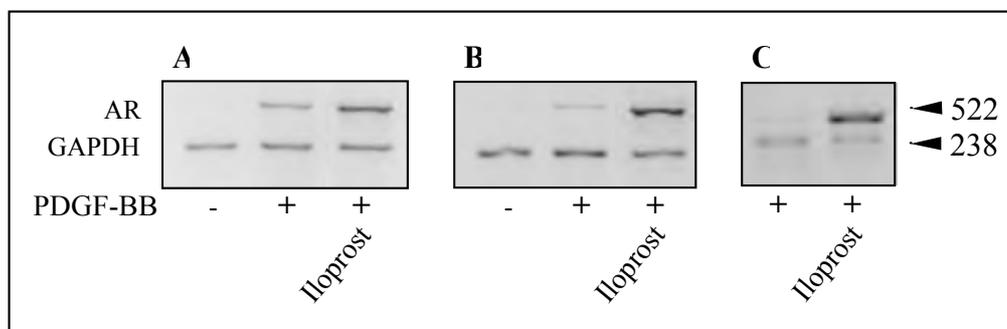
Gen ( <i>Acc-No.</i> )	Beschreibung	<i>increase</i> =I <i>decrease</i> =D	FC
<b>Zellzyklus</b>			
U61836	<i>putative cyclin G1 interacting protein</i>	I	5,3
X75346	<i>MAP kinase activated protein kinase (MAPKAPK)</i>	I	2,6
L13698	<i>growth arrest-specific 1 (Gas1)</i>	I	2,3
M60974	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible protein (Gadd 45)</i>	D	-3
U53446	<i>mitogen-responsive phosphoprotein DOC-2</i>	D	-2,6
M64349	Cyclin D1	D	-2
<b>Zytoskelett</b>			
X53416	<i>actin-binding protein (filamin)</i>	I	3
(X06956)	tubulin, alpha 1, isoform 44	I	3
U13613	Ankyrin G (ANK-3)	D	-4,6
AF051850	Supervillin	D	-2,8

<b>AF006083</b>	<i>actin-related protein Arp3 (ARP 3)</i>	D	-2,5
<b>M33308</b>	Vinculin	D	-2,3
<b>Extrazelluläre Matrix</b>			
<b>M20776</b>	alpha-1 (VI) Kollagen	I	9,8
<b>X15882</b>	<i>collagen VI alpha-2 C-terminal globular domain</i>	I	4,9
<b>U44385</b>	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)</i>	I	3
<b>U09577</b>	<i>lysosomal hyaluronidase (LUCA2/HYAL2)</i>	I	2
<b>X17033</b>	<i>integrin alpha-2 subunit</i>	D	-4
<b>AB020316</b>	<i>dermatan/chondroitin sulfate 2-sulfotransferase</i>	D	-2,5
<b>Wachstumsfaktoren</b>			
<b>34898_at</b>	<i>Amphiregulin</i>	I	6,1
<b>1830_s_at</b>	<i>Transforming growth factor-beta</i>	I	3
<b>36101_s_at</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>	I	2,6

Tabelle 15

### 3.8.1 Verifizierung von Arraydaten: Amphiregulin

Die Überprüfung von Ergebnissen der Array-Analyse erfolgte mittels RT-PCR. Als erstes Gen wurde die Regulation des als Wachstumsfaktor identifizierten Amphiregulin (AR) untersucht. Laut Expressionsanalyse wird die AR-Expression durch Iloprost um den Faktor 6,1 erhöht. In 3 den Bedingungen des Array-Experimentes entsprechenden Versuchen konnte die Zunahme der mRNA-Expression von AR bestätigt werden.



**Abbildung 28** Iloprost induziert Amphiregulin mRNA in hASMC in Gegenwart von PDGF-BB. HASMC wurden für 18 h mit PDGF-BB (10 ng/ml) und für die letzten 6 h zusätzlich mit Iloprost (100 nM) stimuliert. Nach RNA-Isolierung mit TRIZOL<sup>®</sup> Reagenz wurden 150 ng RNA mittels semiquantitativer RT-PCR amplifiziert. Als interner Standard diente GAPDH.

## 4 DISKUSSION

Im frühen Verlauf atherosklerotischer Gefäßerkrankungen unterliegen glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) einer u.a. durch Mitogene stimulierten Dedifferenzierung von einem kontraktilen, stationären zu einem sekretorischen, proliferierenden Phänotyp. Ziel einer antiatherosklerotischen Therapie ist insbesondere eine Hemmung der massiven proliferativen und migratorischen Eigenschaften aktivierter SMC. Zu den endogenen Prostaglandinen, die in diesem Sinne vasoprotektiv wirksam werden können, zählen PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub>. Zelladhäsion, Migration und Proliferation vaskulärer SMC unterliegen darüberhinaus dem Einfluss der umgebenden EZM. Als vermittelnde zelluläre Struktur dieser Interaktion gelten die FA. Im Fokus dieser Arbeit standen die Wirkungen von PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> auf FA und mögliche funktionelle Konsequenzen. In einer vergleichenden Analyse sollten PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> hinsichtlich ihrer Effekte auf den Phänotyp von SMC und beteiligte Signaltransduktionen untersucht werden.

### 4.1 Expression der IP- und EP-Rezeptoren in hASMC

Frühere Arbeiten deuten darauf hin, dass besonders die PGE<sub>1</sub>- und PGE<sub>2</sub>-induzierten Effekte in SMC eine Variabilität aufweisen, die in Zusammenhang mit der unterschiedlichen Expression der Rezeptor-Subtypen EP<sub>1-4</sub> steht. So beschreiben Burgess et al. eine gesteigerte Proliferationshemmung durch PGE<sub>2</sub> in pulmonalen SMC von Asthmatikern verglichen mit SMC gesunder Probanden, die auf eine höhere EP<sub>2</sub>-Rezeptordichte bei Asthmatikern zurückzuführen ist (Burgess et al., 2004). In Kombination mit den exprimierten EP-Rezeptoren scheint der momentane Proliferationsstatus einen Einfluss auf die Art der Proliferationsänderung auszuüben. So wurde eine proproliferative Wirkung von EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Agonisten speziell bei unter Serumentzug stehenden bovinen und Ratten-SMC sowie in SMC des Schweins beschrieben (Pasricha et al., 1992; Yau und Zahradka, 2003; Li et al., 2004). Deshalb wurde für das gewählte Versuchssystem der PDGF-BB-stimulierten, glatten Muskelzellen der menschlichen Aorta das Expressionsmuster der Prostaglandin-Rezeptoren untersucht. Sowohl der IP-Rezeptor, sowie alle EP-Rezeptoren (EP<sub>1-4</sub>) wurden in hASMC exprimiert. Dabei ließ sich eine Tendenz zur gesteigerten Expression der G<sub>S</sub>-gekoppelten Rezeptoren (IP, EP<sub>2</sub>, EP<sub>4</sub>) erkennen.

## **4.2 Der Einfluss von Iloprost und PGE<sub>2</sub> auf Fokale Adhäsionen und Aktin-Zytosklett glatter Gefäßmuskelzellen**

Im Zusammenspiel von EZM und Integrinrezeptoren, die zwischen Extra- und Intrazellulärraum vermitteln, stellen FA die intrazelluläre Schaltstelle für die Signalvermittlung dar (Schlaepfer und Hunter, 1998; Cary und Guan, 1999). Bei der Übertragung von biochemischen Signalen in das Zellinnere unterliegen die FA-Komponenten selber Regulationen. Veränderungen der FA sowie des mit ihnen verbundenen Aktin-Zytoskeletts zeigen sich nach Stimulation mit cAMP-mobilisierenden Agenzien, Rho-GTPasen, in Abhängigkeit von umgebender EZM, Scherstress und osmotischen Schwankungen (Han et al., 1996; Hall et al., 1998; Schlaepfer und Hunter, 1998; Lunn und Rozengurt, 2004). Es ist bekannt, dass FA-Signalmechanismen essentiell für die Progression des Zellzyklus und Migrationsvorgänge sind (Zhu und Assoian, 1995). Dies wird unterstrichen durch Untersuchungen zu FAK, einem zentralen Protein der FA. So hemmt die Injektion eines Konstruktes des endogenen, negativen FAK-Regulators FRNK die DNA-Synthese von Endothelzellen und Fibroblasten; eine gesteigerte FRNK-Expression verringert die SMC-Proliferation und -Migration (Gilmore und Romer, 1996; Taylor et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass vasodilatorische Prostaglandine in Gegenwart von PDGF-BB umfangreiche morphologische Veränderungen sowie Hypophosphorylierungen von FAK und Paxillin in hASMC induzieren, die einer Proliferations- und Migrationshemmung vorausgehen. Die folgende Diskussion soll insbesondere mögliche Korrelationen der FAK-Hypophosphorylierung mit phänotypischen Veränderungen der SMC beleuchten. Zur Klärung der Mechanismen der Hypophosphorylierung wird die Bedeutung zweier identifizierter Signalwege nach Iloprost-Stimulation, cAMP-Abhängigkeit und Rho-Abhängigkeit, näher betrachtet.

### **4.2.1 Die unterschiedliche FAK-Hypophosphorylierung durch Iloprost und PGE<sub>2</sub> – Auswirkungen auf Proliferation und Migration von hASMC**

Unter Iloprost und PGE<sub>2</sub> kam es zu drastischen Veränderungen der Struktur des Aktin-Zytoskeletts sowie einer Abnahme fokaler Adhäsionen in SMC. In zeitlicher Korrelation hierzu wurde eine Hypophosphorylierung der FAK am Tyrosinrest 397 festgestellt. Die FAK-Autophosphorylierung ermöglicht die Assoziation mit Src-Kinasen und PI-3-Kinase, deren nachfolgende Signaltransduktionen, z.B. über eine Aktivierung des Ras/MEK/ERK-Weges, in

Zusammenhang mit der positiven Regulation von Migration und Proliferation gesehen werden (Schlaepfer et al., 1998; Goncharova et al., 2002). Eine reduzierte FAK-Autophosphorylierung am Tyrosinrest 397 würde diese Assoziationen hemmen und könnte sich somit negativ auf die Motilität und Proliferation auswirken. Außerdem mediiert Src die Tyrosin-Phosphorylierung von p130<sup>CAS</sup>, einem ebenfalls FAK-assoziierten Protein, das migrationsfördernd wirkt (Cary et al., 1998). Eine verringerte FAK-Src-Bindung könnte über die verringerte p130<sup>CAS</sup>-Phosphorylierung die Migration hemmen. Die Effekte von Iloprost und PGE<sub>2</sub> auf FAK und FA lieferten somit einen Erklärungsansatz für die antiproliferativen und antimigratorischen Eigenschaften dieser Prostaglandine.

Sowohl die morphologischen Veränderungen als auch die FAK-Hypophosphorylierung stellten reversible Prozesse dar, die nach 18 h wieder vollständig das basale, PDGF-BB-induzierte Niveau erreicht hatten. Versuche mit Cicaprost, Butaprost, db-cAMP, Forskolin sowie dem PKA-Inhibitor H-89 belegten eine cAMP/PKA-abhängige Signalvermittlung der Iloprost und PGE<sub>2</sub>-Wirkungen über G<sub>s</sub>-gekoppelte Rezeptoren. Andere Arbeiten bestätigen diesen Signalweg. So beschreiben Han et al. morphologische Veränderungen als Reaktion auf eine cAMP-Mobilisierung in Mastzellen der Nebennierenrinde (Han et al., 1996). Padmanabhan et al. stellen eine cAMP-abhängige FAK-Hypophosphorylierung in Astrozyten fest (Padmanabhan et al., 1999). Derkinderen et al. berichten von einer erhöhten FAK-Phosphorylierung nach Inhibition von Adenylatzyklase und einer cAMP-abhängigen Proteinkinase in Nervenzellen (Derkinderen et al., 1996).

Die geringere Ausprägung aller beobachteten Effekte nach Stimulation von hASMC mit PGE<sub>2</sub> im Vergleich zu Iloprost korrelierte mit einer geringeren cAMP-Freisetzung durch PGE<sub>2</sub>. Dieser Zusammenhang konnte durch Kombination von PGE<sub>2</sub> mit dem cAMP-steigernden Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX bestätigt werden, die in einer Verstärkung der PGE<sub>2</sub>-Effekte resultierte.

Die geringere cAMP-Freisetzung durch PGE<sub>2</sub> könnte auf den inhibitorischen Einfluss des G<sub>i</sub>-gekoppelten EP<sub>3</sub>-Rezeptors zurückzuführen sein. Aber auch ein Beitrag des EP<sub>4</sub>-Rezeptors wäre für die geringeren PGE<sub>2</sub>-Wirkungen denkbar, denn nach selektiver Stimulation des EP<sub>4</sub>-Rezeptors kam es zu keinen Veränderungen der Morphologie, der Menge fokaler Adhäsionspunkte oder einer FAK-Hypophosphorylierung am Tyrosinrest 397. In diesem Zusammenhang könnte der kürzlich von Fujino et al. identifizierte alternative EP<sub>4</sub>-Signalweg einer PI-3-Kinase-Aktivierung eine Rolle spielen (Fujino et al., 2002). PI-3-Kinase-vermittelt sind proliferations- und migrationsfördernde Effekte bekannt (Goncharova et al., 2002). Über

den EP<sub>4</sub>-Rezeptor könnte somit der cAMP-abhängigen Proliferations- und Migrationshemmung von PGE<sub>2</sub> entgegengewirkt werden.

#### **4.2.2 Mechanismen der Hypophosphorylierung durch Iloprost – Beteiligung von Phosphatasen**

Iloprost induziert einen raschen und starken Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels, der zur Auflösung der fokalen Adhäsionspunkte und einem Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts führt. Damit einher geht die Hypophosphorylierung der FA-Proteine FAK und nachfolgend Paxillin. Der Phosphorylierungsstatus, besonders von FAK, scheint von entscheidender Bedeutung für die Funktion der FA und die intrazelluläre Signalvermittlung zu sein. Er beruht auf einer Balance von Proteinkinasen (PK) und Proteinphosphatasen (PP).

Versuche mit Okadasäure, einem potenten Inhibitor der Serin-/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A, zeigten weder Effekte auf die morphologischen Veränderungen durch Iloprost noch auf die FAK-Hypophosphorylierung. Dies spricht gegen eine Beteiligung von Serin-/Threonin-Phosphatasen.

Han et al. beschreiben eine cAMP/PKA-medierte Tyrosin-Dephosphorylierung von Paxillin, die durch den PTP-Inhibitor Pervanadat aufgehoben werden kann (Han et al., 1996). Analog dazu konnten mit Vanadat die Effekte von Iloprost auf die FAK-Phosphorylierung am Tyrosinrest 397 und die Zellmorphologie vollständig unterbunden werden. Die verringerte Phosphorylierung von FAK ist somit auf PTP-vermittelte Dephosphorylierungen zurückzuführen. Die Aktivierung der agierenden PTP könnte durch die Serin-/Threonin-Kinase PKA direkt in Form einer Phosphorylierung oder indirekt erfolgen.

Mehrere PTP wurden in Zusammenhang mit den Prozessen der FAK-Dephosphorylierung gebracht: PTP-PEST, PTEN, SHP-2.

PTP-PEST-Nullmutanten zeigen ähnliche phänotypische Eigenschaften wie FAK-Nullmutanten: Vergrößerung und erhöhte Zahl von fokalen Adhäsionspunkten sowie eine verringerte Migration (Ilic et al., 1995; Angers-Loustau et al., 1999). Jedoch stellen Garton et al. einen Aktivitätsverlust der Phosphatase PTP-PEST durch PKA-medierte Phosphorylierung am Serin-Rest 39 fest (Garton und Tonks, 1994). Die Ergebnisse zur cAMP-/PKA-Abhängigkeit der Iloprost-induzierten FAK-Hypophosphorylierung sprechen somit gegen eine Beteiligung von PTP-PEST an diesen Effekten.

Dennoch scheint eine noch zu klärende Korrelation der Signalwege von FAK und PTP-PEST zu existieren.

Eine Beteiligung der Phosphatase PTEN an der Iloprost-induzierten FAK-Hypophosphorylierung wäre ebenfalls denkbar. Tamura et al. stellen fest, dass die Phosphorylierung am Tyrosinrest 397 der FAK von Bedeutung für die Assoziation von PTEN mit FAK ist und sich nachfolgende FAK-Phosphorylierungen und –Funktionen dadurch verringern (Tamura et al., 1998; Tamura et al., 1999). Sie zeigen jedoch nicht explizit, dass PTEN auch die am Tyrosinrest 397 lokalisierte FAK-Autophosphorylierung rückwirkend hemmt.

Darüberhinaus kommt es ähnlich wie bei PTP-PEST auch im Falle von PTEN zu einem Verlust der Phosphatase-Aktivität durch Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten (Vazquez et al., 2001). Iloprost könnte, PKA-vermittelt, diese Inaktivierung verursachen und die Wahrscheinlichkeit einer FAK-Dephosphorylierung am Tyrosinrest 397 durch PTEN reduzieren.

#### **4.2.3 Die Protein-Tyrosinphosphatase SHP-2**

Bisher ist nichts über eine Interaktion von SHP-2 mit Prostaglandinen bekannt. Die Hypothese einer Beteiligung von SHP-2 basiert auf der Beobachtung, dass der spezifische SHP-2-Inhibitor Calpeptin die FAK-Dephosphorylierung sowie die morphologischen Veränderungen nach Iloprost-Stimulation vollständig verhinderte. Doch wie könnte es zu einer Aktivierung von SHP-2 durch Iloprost kommen?

Generell ist die SHP-2-Aktivierung sowohl von der sterischen Konformation des Proteins als auch von Phosphorylierungen abhängig. Die 2 charakteristischen SH2-Domänen liegen im N-terminalen Ende von SHP-2. Die eigentliche Phosphatase-Domäne liegt im C-Terminus. Die SH2-Domänen üben einen auto-inhibitorischen Einfluss aus. Erst ihre Assoziation mit Phosphotyrosin-enthaltenden Peptidsequenzen und resultierende Konformationsänderungen vervielfachen die Phosphatase-Aktivität. Als notwendig für die Enzym-Aktivität erweist sich weiterhin der Cystein-Rest 459 (Milarski und Saltiel, 1994).

In Gegenwart von Wachstumsfaktoren wie PDGF kommt es zu Tyrosin-Phosphorylierungen innerhalb eines kurzen C-terminalen Endstückes. Sie tragen ebenfalls zur Aktivierung von SHP-2 bei (Qi et al., 1999; Feng et al., 1993; Vogel et al., 1993) und fördern die Bindung des Adaptorproteins Grb2 an SHP-2 (Li et al., 1994; Bennett et al., 1994).

Doch auch Phosphorylierungen an Threonin- und Serin-Resten scheinen einen erheblichen Einfluss auf die katalytische Aktivität von SHP-2 zu haben. Peraldi et al. zeigen, dass p44-MAPK eine Threonin-Phosphorylierung induziert, die die Phosphatase-Aktivität der SHP-2 verringert (Peraldi et al., 1994). In Endometrium-Zellen kommt es nach Stimulation mit Forskolin zu einer erhöhten mRNA-Expression von SHP-2 (Burke et al., 1997). Eine cAMP/PKA-medierte Serin-Phosphorylierung wurde in adrenocorticalen Zellen nachgewiesen. Sie führt zu einer dramatischen Steigerung der Phosphatase-Aktivität (Rocchi et al., 2000).

Die Iloprost-induzierte FAK-Hypophosphorylierung ist cAMP-/PKA-abhängig. Sie konnte durch den PKA-Inhibitor H-89 aufgehoben werden. Der Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin und das cAMP-Analogon db-cAMP imitierten die Iloprost-Effekte.

Die Serin-/Threonin-Proteinkinase PKA könnte somit einen direkten Aktivator von SHP-2 darstellen und für die Iloprost-induzierte FAK-Hypophosphorylierung verantwortlich sein.

#### **4.2.4 Mechanismen der Hypophosphorylierung durch Iloprost - Die Rolle von Rho**

Die Organisation des Aktin-Zytoskeletts unterliegt insbesondere auch einer Regulation durch Rho (Hall et al., 1998). Die verringerte FAK-Phosphorylierung, Abnahme der FA und der Verlust der zytoskeletären Strukturen durch Iloprost könnten unter Beteiligung von Rho-GTPasen ablaufen. Diese Annahme bestätigte sich durch Vorinkubation der hASMC mit dem Rho-Aktivator LPA, der die Iloprost-Effekte vollständig aufhob. Der Einsatz des Rho-Kinase-Inhibitors Y-27632 rief Iloprost-ähnliche Reaktionen hervor. Da LPA aber auch vielfältige andere Wirkungen hat, wurde LPA mit dem Rho-Kinase-Inhibitor kombiniert. Die doppelte Vorinkubation der Zellen mit 1.) dem Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 und 2.) dem Rho-Aktivator LPA zeigte keine Aufhebung des Iloprost-Effektes auf die FAK-Phosphorylierung, sondern führte vielmehr zur Aufhebung der LPA-Wirkung. Die Aufhebung des Iloprost-Effektes beruht somit eindeutig auf der Rho-aktivierenden Wirkung von LPA.

Eine Inhibition von Rho wäre somit als Ursache für die Auflösung des Zytoskeletts und die Abnahme der FA nach Iloprost-Stimulation denkbar. Verantwortlich dafür könnte freigesetztes cAMP sein, das über PKA die Rho-Hemmung bewirkt (Lang et al., 1996; Laudanna et al., 1997; Dong et al., 1998). Ein erhöhter Phosphorylierungsgrad von Rho verringert die Rho-Translokation aus dem Zytosol zur Membran, somit die Rho-Aktivierung und die Bindung an den Effektor Rho-Kinase.

Schoenwaelder et al. fanden heraus, dass die Phosphatase SHP-2 in der Signalkaskade oberhalb von Rho agiert und inhibierend auf Rho wirkt (Schoenwaelder et al., 2000). Andere Arbeiten bestätigen diese Beobachtung (Chang et al., 2002). Bei einer Aktivierung von SHP-2 durch Iloprost wären also in doppelter Hinsicht Konsequenzen denkbar: eine Rho-Hemmung und eine direkte dephosphorylierende Wirkung auf FAK.

Aber wie könnte die Interaktion zwischen SHP-2 und Rho aussehen? Wakino et al. stellen fest, dass SHP-2 auch zur Dephosphorylierung und somit Inhibierung des RhoGEF-Proteins Vav verbunden mit der daraus resultierenden Hemmung von Rho und Rho-Kinase führt (Wakino et al., 2004). Vav wird unter anderem nach Stimulation von PDGF- und anderen Tyrosinkinase-Rezeptoren mobilisiert (Schmidt et al., 2002). Auch Iloprost könnte, SHP-2-vermittelt, zur Inhibierung von RhoGEF-Proteinen und einer ausbleibenden Rho-Aktivierung führen.

Die Aufhebung der Iloprost-Wirkungen in Gegenwart von LPA, einem Rho-Aktivator, verdeutlicht die notwendige Existenz eines alternativen und in Gegenwart von Iloprost gangbaren Weges der Rho-Aktivierung. Eine Variante wären durch LPA mobilisierte RhoGEFs, die durch SHP-2 nicht inhibiert werden. LPA agiert über G-Protein-gekoppelte LPA-Rezeptoren. Die GTP-bindende  $\alpha_{12/13}$ -Untereinheit der G-Proteine interagiert mit den RGS-Domänen von RhoGEF-Proteinen, die nun die Rho-GTPase aktivieren. Zu den RhoGEF-Proteinen mit RGS-Domäne gehören p115rhoGEF, PDZrhoGEF und *leukemia-associated rhoGEF* (LARG) (Fukuhara et al., 1999; Kozasa et al., 1998).

#### **4.2.5 Mechanismen der Rephosphorylierung nach Iloprost-Stimulation - Die Rolle von Tyrosin-Kinasen und Rho**

Bei den Iloprost und PGE<sub>2</sub>-induzierten Wirkungen auf FAK-Phosphorylierung und Zellmorphologie handelt es sich um reversible Prozesse. Bereits nach 3 Stunden wird die Abschwächung der Effekte sichtbar, nach 18 Stunden ist die Rückbildung abgeschlossen und entspricht dem Bild einer PDGF-BB-Stimulation. Als limitierend innerhalb der komplexen Signalkaskade wird die intrazelluläre cAMP-Konzentration angesehen. Durch cAMP-abbauende Phosphodiesterasen, sinkende cAMP-Freisetzung nach IP-Rezeptordesensibilisierung und andere Mechanismen könnte es zur Abnahme sämtlicher Effekte kommen.

Die Gegenwart des Tyrosinkinase-Inhibitors Genistein verzögerte diese Rückbildung nach

Iloprost-Behandlung erheblich. Die Rephosphorylierung von FAK und die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und der FA waren auch nach 18 Stunden kaum erkennbar. Tyrosinkinasen spielen also eine Rolle bei der Normalisierung der Strukturen nach Iloprost-Behandlung.

Aktiviertes Rho-Protein zeigt in Gegenwart von Genistein keine Wirkung mehr, was auf die Beeinflussung Rho-nachgeschalteter Kinasen durch Genistein hindeutet (Kranenburg et al., 1997). Die Existenz Rho-vorgeschalteter Kinasen wurde durch Hemmung der Rho-Aktivierung in Gegenwart von Genistein nachgewiesen (Kranenburg et al., 1999). Tyrosinkinasen agieren somit vor und nach der Rho-GTPase.

Chikumi et al. zeigen, dass FAK – durch Phosphorylierung der Rho-GEFs LARG und PDZ-RhoGEF – zur längerfristigen Aktivierung von Rho beiträgt, jedoch keine Rolle in der Frühphase der Rho-Mobilisierung spielt (Chikumi et al., 2002). Es wurden ebenfalls Rho-Kinase-abhängige FAK-Phosphorylierungen beschrieben (Sinnott-Smith et al., 2001). Die FAK spielt somit vor und nach der Rho-GTPase eine Rolle. Denkbar ist, dass FAK eine Rho-nachgeschaltete Kinase ist, die im Sinne einer Rückmeldung positiv auf die Rho-Aktivierung wirkt (positiver ‚feedback‘-Mechanismus). Somit könnte die Tyrosinkinase FAK durch Genistein gehemmt werden und nachfolgend bzw. rückwirkend die Rho-Aktivierung beeinträchtigen.

Die stark verzögerte Regeneration von Morphologie und FAK-Phosphorylierung in Iloprost-behandelten SMC in Gegenwart von Genistein wäre somit das Ergebnis einer synergistischen Hemmung von FAK und Kinasen innerhalb der Rho-Kaskade. Es würde sich um eine Potenzierung der Kinaseblockade handeln, die kausal mit den langanhaltenden Iloprost-Effekten zusammenhängt.

Diese Arbeit und andere Studien belegen die cAMP-Abhängigkeit von FAK-Dephosphorylierung und morphologischen Veränderungen (Padmanabhan et al., 1999). Interessant ist, dass Genistein selber einen Anstieg von intrazellulärem cAMP und die anschließende Aktivierung von PKA verursacht (Liu et al., 2005). Dies könnte zusätzlich zu den nachhaltigen morphologischen Veränderungen und der andauernden FAK-Hypophosphorylierung in Anwesenheit von Genistein beitragen.

Nach den dramatischen Effekten von Iloprost und PGE<sub>2</sub> auf FAK und fokale Adhäsionen liegt es nahe, Konsequenzen für die Proliferation und Migration von hASMC zu erwarten. Mögliche kausale Zusammenhänge werden im folgenden Kapitel diskutiert.

### 4.3 Der Einfluss von Iloprost und PGE<sub>2</sub> auf die atherogenen Prozesse Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen

#### 4.3.1 Der antiproliferative Effekt von Iloprost und PGE<sub>2</sub>

Die proliferationshemmende Wirkung von PGI<sub>2</sub> in SMC und ihr Ausbleiben nach IP-Rezeptor-Depletion in Mäusen ist belegt (Koh et al., 1993; Zucker et al., 1998; Cheng et al., 2002). Für PGE<sub>2</sub> wurden überwiegend antiproliferative, aber auch proproliferative Effekte beschrieben (Uehara et al., 1988; Belvisi et al., 1998; Pasricha et al., 1992).

Das stabile PGI<sub>2</sub>-Analogon Iloprost und PGE<sub>2</sub> riefen eine ähnliche, signifikante Reduktion der PDGF-BB-induzierten DNA-Synthese in hASMC hervor. Das bedeutet, dass die vasodilatatorischen Prostaglandine PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> innerhalb des gewählten Zell- und Versuchssystems in gleichem Maß antiproliferativ wirkten. Jedoch besteht im Rahmen der gewählten 24-stündigen Stimulationsdauer die Möglichkeit einer Agonist-abhängigen Desensibilisierung des IP-Rezeptors, so dass eine Abschwächung der Iloprost-induzierten Proliferationshemmung denkbar wäre (Zucker et al., 1998; Nilius et al., 2000). Eine Desensibilisierung von EP-Rezeptoren ist nicht bekannt.

Durch Analyse von Zellzyklus-Proteinen sollte bestimmt werden, in welcher Phase die Arretierung des Zellzyklus durch Iloprost und PGE<sub>2</sub> erfolgte. Die Untersuchungen konzentrierten auf Proteine der G1-Phase. Iloprost und PGE<sub>2</sub> führten zu einer deutlichen Reduktion von Cyclin D1-Protein und einer Hochregulation von p27<sup>Kip1</sup>. Die Zellzyklus-Inhibition beruht somit auf einer verringerten CDK-Aktivität und entspricht einer Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase.

Zahlreiche Studien belegen einen Zusammenhang zwischen Zellzyklus-Inhibition und cAMP-Freisetzung (Wong ST et al., 2001; van Oirschot et al., 2001; Stewart et al., 1999). Auch in hASMC konnte durch Stimulation mit dem cAMP-Analogon db-cAMP und durch direkte Aktivierung der Adenylatzyklase mit Forskolin eine Reduktion des Cyclin D1- und eine Erhöhung des p27<sup>Kip1</sup>-Proteinniveaus festgestellt werden.

Keine Korrelation ist jedoch zwischen der cAMP-Freisetzung und der DNA-Synthese bzw. Zellzyklusregulation durch Iloprost und PGE<sub>2</sub> zu erkennen. Trotz signifikant niedrigerer cAMP-Freisetzung reduzierte PGE<sub>2</sub> den [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau in gleichem Maße wie Iloprost. Auch die Cyclin D1- und p27<sup>Kip1</sup>-Spiegel zeigten keine Unterschiede. Möglich wäre, dass bereits niedrige cAMP-Konzentrationen für eine Regulation des Zellzyklus ausreichen

und die Proliferation senken. Sie könnten in nachgeschalteten Signalwegen eine Potenzierung ihrer Wirkung erfahren. So wird der antiproliferative Effekt von PG in SMC mit der MAPK-Kaskade in Verbindung gebracht. Nach mitogener Stimulation induziert diese Kinasekaskade über Ras/Raf1-Kinase/MEK/ERK Veränderungen der Genexpression und Proteinsynthese. PKA-abhängig kann es zu seiner Hemmung durch Blockade der Ras/Raf1-Kinase-Bindung kommen (Weber et al., 1998; Bornfeldt und Krebs, 1999).

Der antiproliferative Effekt von PGE<sub>2</sub> wurde auf Rezeptorebene genauer untersucht. Stimulationen mit dem EP<sub>2</sub>-selektiven Agonisten Butaprost bzw. dem EP<sub>4</sub>-selektiven Ono-AE1-329 induzierten jeweils eine Hochregulation des p27<sup>Kip1</sup>-Proteinspiegels. Im Gegensatz zur Reduktion von Cyclin D1-Protein durch Butaprost, blieb jedoch eine Regulation von Cyclin D1 durch Ono-AE1-329 aus. Fujino et al. postulieren für den EP<sub>4</sub>-Rezeptor, parallel zu einer im Vergleich schwächeren cAMP/PKA-vermittelten Signaltransduktion, eine deutliche PI-3-Kinase-Aktivierung (Fujino et al., 2002). Somit könnte die differentielle Regulation von Cyclin D1 nach EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Stimulation die Konsequenz der Aktivierung dieser unterschiedlichen Signalwege sein.

Eine weitere Erklärung liefert die proteosomale Degradation von Cyclin D1, die nach Phosphorylierung am Threoninrest 286 durch Glycogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) beschleunigt erfolgt (Diehl et al., 1998). Diehl et al. konnten im Umkehrschluss ebenfalls nachweisen, dass bei GSK-3 $\beta$ -Inhibition der Abbau von Cyclin D1 gehemmt wurde, wobei die GSK-3 $\beta$ -Inhibition PI-3-Kinase/Akt-abhängig erfolgt. Somit könnte der EP<sub>4</sub>-stimulierte PI-3-Kinase/Akt-Weg eine Inhibition von GSK-3 $\beta$  bewirken und den Cyclin D1-Abbau hemmen. Da PI-3-Kinase und Cyclin D1 als positive Regulatoren zellulären Wachstums gelten, die proliferationshemmende Wirkung von PGE<sub>2</sub> jedoch nachgewiesen wurde, muss der EP<sub>2</sub>-vermittelte Signalweg hinsichtlich der Proliferationshemmung überwiegen.

Die weitere Untersuchung der am PGE<sub>2</sub>-Effekt beteiligten EP-Rezeptoren in hASMC unterstrich die cAMP-Abhängigkeit. So hatten die Stimulationen mit dem EP<sub>3</sub>-selektiven M&B 28.767 sowie die PGE<sub>2</sub>-Vorinkubation mit dem EP<sub>1</sub>-spezifischen Antagonisten sc 19220 keinen Effekt auf die Cyclin D1- oder 27<sup>Kip1</sup>-Proteinexpression. Für die Inhibition des Zellzyklus durch Iloprost und PGE<sub>2</sub> wird deshalb ein IP- respektive EP<sub>2</sub>-vermittelter, cAMP-abhängiger Mechanismus postuliert. Bezüglich der Cyclin D1-Regulation scheint der EP<sub>2</sub>-Effekt den EP<sub>4</sub>-Effekt zu überlagern.

#### 4.3.2 Der differentielle antimigratorische Effekt von Iloprost und PGE<sub>2</sub>

Die Hemmung der Migration durch PGI<sub>2</sub> wurde bereits an menschlichen, arteriellen SMC sowie menschlichen Fibroblasten beschrieben (Blindt et al., 2002; Kohyama et al., 2002). Der Nachweis für PGE<sub>2</sub> erfolgte in arteriellen SMC indirekt über die Induktion der COX-2 und anschließende exzessive PGE<sub>2</sub>-Freisetzung, die mit einer verringerten Migration der Zellen korrelierte (Yamamoto et al., 1999). Die PGE<sub>2</sub>-Effekte unterlagen jedoch erneut einer Variabilität. So wurde in Tumorzellen durch PGE<sub>2</sub> eine überwiegend gesteigerte migratorische Aktivität gefunden (Sheng et al., 2001; Timoshenko et al., 2003). Ein direkter Vergleich der Wirkungen von Iloprost und PGE<sub>2</sub> auf die zelluläre Motilität innerhalb eines Zellmodells wäre von Nutzen.

Die PDGF-BB-induzierte Migration von hASMC wurde durch Iloprost und durch PGE<sub>2</sub> signifikant reduziert. Für beide Prostaglandine zeigte sich auch eine konzentrationsabhängige Motilitätsinhibition. Auffallend war die signifikant stärkere Inhibition der Migration durch Iloprost im Vergleich zu PGE<sub>2</sub> bei hohen Agonist-Konzentrationen (100 nM).

Eine Erklärung hierfür liefert die cAMP-Abhängigkeit der Migrationshemmung (Goncharova et al., 2003). Tatsächlich induzierte Iloprost einen signifikant höheren cAMP-Spiegel als PGE<sub>2</sub>. Die unterschiedlich starke Hemmung der Migration durch Iloprost und PGE<sub>2</sub> in hohen Konzentrationen korrelierte mit der höheren cAMP-Bildung nach Stimulation mit Iloprost.

Die Ursache der verringerten cAMP-Freisetzung durch PGE<sub>2</sub> ist nicht bekannt. Doch könnte sie auf der Stimulation von sowohl aktivierenden als auch inhibitorischen EP-Rezeptoren durch PGE<sub>2</sub> beruhen. So zeigen Blindt et al., dass die Migration von arteriellen SMC durch spezifische Stimulation des EP<sub>3</sub>-Rezeptors mit M&B 28.767 gefördert wurde (Blindt et al., 2002). Der EP<sub>3</sub>-Rezeptor ist G<sub>i</sub>-gekoppelt und verringert die cAMP-Freisetzung, während die G<sub>s</sub>-Kopplung der EP<sub>2+4</sub>-Rezeptoren die cAMP-Bildung erhöht. Unter der Annahme der cAMP-Abhängigkeit der Migrationshemmung könnten konkurrierende EP-Rezeptoren-Effekte in der Summe eine verringerte cAMP-Freisetzung und so die Abschwächung der PGE<sub>2</sub>-induzierten Migrationshemmung bewirken (Goncharova et al., 2003).

Denkbar wäre auch die Beteiligung des alternativen Signalweges, der für den EP<sub>4</sub>-Rezeptor beschrieben wird (Fujino et al., 2002). Die EP<sub>4</sub>-induzierte cAMP-Bildung könnte durch den konkurrierenden Signalweg der Aktivierung der PI-3-Kinase verringert sein.

Eine weitere Möglichkeit für die gefundenen Unterschiede bei der cAMP-Bildung und der Migrationshemmung nach Iloprost- und PGE<sub>2</sub>-Stimulation ist eine Induktion von COX-2 durch Iloprost, die in eine erhöhte PGI<sub>2</sub>-Synthese mündet (Debey et al., 2003). Die additiven

Effekte von Iloprost und endogenem PGI<sub>2</sub> wären somit für die stärkere Migrationshemmung durch Iloprost verantwortlich.

Eine mögliche Desensibilisierung des IP-Rezeptors wäre auch in diesem Versuchsansatz denkbar, scheint dann aber für die Migrationshemmung durch Iloprost unerheblich zu sein. Dies bedeutet, dass im Falle einer Desensibilisierung der initial hohe cAMP-Spiegel ausreichen würde, um die PDGF-BB-stimulierte Migration über einen Zeitraum von 6 h signifikant zu reduzieren.

#### **4.4 Genexpressionsanalyse – Diskussion regulierter Gene**

Im Fokus der Genexpressionsanalyse stand die Identifizierung von Genen, die zu der beschriebenen Hemmung der Proliferation und Migration von PDGF-BB-stimulierten hASMC durch Iloprost beitragen könnten. Das Stimulationsschema sah deshalb eine Behandlungsdauer von 18 h vor. Aus Gründen der möglichen Desensibilisierung des IP-Rezeptors wurde Iloprost nur für die letzten 6 h zugefügt, einem Zeitfenster, innerhalb dessen die FAK-Rephosphorylierung bereits abgeschlossen ist (s. Ergebnisse 3.3.1 und 3.4.1).

Von den 344 durch Iloprost-regulierten Genen wurden Gene des Zellzyklus, des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix und Wachstumsfaktoren präsentiert. Eine Auswahl wird im Folgenden kurz vorgestellt und ihre hypothetische Bedeutung für den proliferations- und migrationshemmenden Effekt von Iloprost formuliert. Der Faktor (*fold change*, FC) der jeweiligen Genregulation durch Iloprost im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit PDGF-BB ist in Klammern angegeben.

##### **4.4.1 Regulation von Genen des Zellzyklus**

###### *Cyclin D1 (FC: -2)*

Die Verringerung des Cyclin D1-Gens durch Iloprost in der Arrayanalyse korreliert mit der beschriebenen verringerten Expression von Cyclin D1-Protein im Western Blot (s. Ergebnisse 3.7.2). Cyclin D1 ist notwendig für die Progression des Zellzyklus durch die G1-Phase und den G1-S-Übergang und wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits genauer erläutert (Sherr, 1994). Eine Reduktion von Cyclin D1-Gen- und Proteinexpression trägt zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase bei.

*Mitogen activated protein kinase activated protein kinase-2 (MAPKAPK-2) (FC: +2,6)*

MAPKAPK-2 ist eine Serin/Threonin-Kinase und als direktes Substrat der p38 MAPK in zelluläre Entzündungs- und Stressreaktionen involviert. Ausgehend von einer Stimulation Wachstumsfaktor-regulierter Rezeptortyrosinkinasen oder G-Protein gekoppelter Rezeptoren wird MAPKAPK-2 rasch phosphoryliert und aktiviert daraufhin Transkriptionsfaktoren im Nukleus wie z.B. CREB und *activating transcription factor 2* (ATF2) (Rouse et al., 1994; Johnson et al., 2002). MAPKAPK-2 stimuliert außerdem über das *heat shock protein 27* (HSP 27) die Aktin-Polymerisation (Schafer et al., 1998).

Nach Iloprost-induzierter Zytoskelett-Deformation könnte MAPKAPK-2 an der Vermittlung der Rückbildung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sein.

*Growth arrest specific-1 (Gas 1) (FC: +2,3)*

Gas 1 ist ein membrangebundenes Protein, das an der negativen Regulation des Zellzyklus beteiligt ist. Es gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die Zelltyp-spezifisch exprimiert werden (Del Sal et al., 1998; Schneider et al., 1988).

Ein durch Iloprost induzierter Zellzyklus-Arrest der hASMC in der G1-Phase könnte über einen erhöhten Gas 1-Spiegel vermittelt werden.

*Growth arrest and DNA-damage inducible protein (Gadd 45) (FC: -3)*

Gadd 45 stimuliert DNA-Reparaturmechanismen durch Bindung an *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) (Smith et al., 1994). Diese Reparaturmechanismen werden an bestimmten Stellen des Zellzyklus aktiviert, den sogenannten G1- und G2-*checkpoints*. Sie ermöglichen Korrekturen fehlerhaft zusammengesetzter DNA vor den Übergängen in die S- bzw. M-Phasen des Zellzyklus. Hohe Gadd 45-Expressionen wurden während der G1-Phase des Zellzyklus festgestellt (Kearsey et al., 1995; Hall et al., 1995).

Die Hemmung des Übertritts aus der G1- in die S-Phase durch Iloprost bedeutet einen geringeren Bedarf an Gadd 45 und könnte die erniedrigte Genexpression erklären.

**4.4.2 Regulation von Genen des Zytoskeletts***Filamin (FC: +3)*

Filamin ist ein relativ großes (250 kDa), Aktin-bindendes Protein, das strukturelle Funktionen während Zelladhäsionen erfüllt. Es dient der Quervernetzung von Aktin-Filamenten (Stressfasern). Es kann mit weiteren strukturellen und Signalmolekülen assoziieren, zu denen  $\beta$ -Integrine, Rho, Rac und Cdc42 zählen (Stossel et al., 2001; Vadlamudi et al., 2002).

Iloprost induziert innerhalb von 30 min einen Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts in hASMC. Nach 6-18 h hatten sich die zellulären Strukturen wieder rekonstituiert. Filamin könnte an der Regeneration beteiligt sein.

#### *Ankyrin G (FC: -4,6)*

Ankyrine sind periphere Membranproteine, die eine Verbindung zwischen dem Spektrin-enthaltenden Membranskelett und der Zellmembran herstellen. Mehrere Spektrin-Moleküle assoziieren mit kurzen Aktin-Filamenten und bilden ein polygonales Netzwerk, das Membranskelett. Es erhöht die mechanische Stabilität der Lipiddoppelmembran von Zellen. Die Funktion und die Proteine des Membranskelett, darunter Spektrin und Ankyrine, wurden zunächst in Erythrozyten beschrieben. Die Kenntnisse zu Organisation und Rolle des Membranskeletts in anderen Zellsystemen sind noch begrenzt (Übersicht in: Bennett und Baines, 2001).

Ankyrine existieren in 3 Isoformen: Ankyrin-G, -R und -B. Ankyrine interagieren u.a. mit dem Membranprotein CD44, das bei Zelladhäsionen eine Rolle spielt. Die Bildung direkter Verknüpfungen zwischen Ankyrin und funktionell wichtigen Transmembranproteinen bzw. dem Membranskelett gilt als eine der frühesten Aktionen während Signaltransduktionen und Prozessen der Zellaktivierung (Bennett und Baines, 2001; Srinivasan et al., 1988). Ankyrin kann mit verschiedenen Membranproteinen gleichzeitig interagieren, was in der Formierung von Multiproteinkomplexen resultiert (Michaely und Bennett, 1995).

Ein erniedrigter Ankyrin G-Spiegel nach 6-stündiger Iloprost-Stimulation könnte ein Hinweis auf noch unvollständig rückgebildete Proteinkomplexe sein, und somit auf eine noch eingeschränkte Funktionsfähigkeit bei Signaltransduktionen hinweisen.

#### *Supervillin (FC: -2,8)*

Supervillin ist ein 205 kDa großes, Aktin-bindendes Protein. Es assoziiert sowohl mit Aktin-Filamenten, als auch mit Proteinen der Plasmamembran, was auf eine vernetzende, strukturgebende Funktion hinweist (Pope et al., 1998).

#### *Actin related protein (Arp 3) (FC: -2,5)*

Arp 3 gehört zu einer Gruppe von Aktin-bindenden Proteinen (Arp 1-11). Arp 3 bildet mit Arp 2 einen heterodimeren Komplex, der an Enden von Aktin-Filamenten bindet und die Aktin-Polymerisation reguliert (Kaksonen et al., 2000). Die Ausbildung kurzlebiger, früher fokaler Komplexe bei Vitronectin-Adhäsion ist durch phosphorylierte  $\beta$ 3-Integrin-

Untereinheiten gekennzeichnet. Parallel zur Formierung von Stressfasern kommt es zu einer Abnahme der  $\beta$ 3-Phosphorylierung und zunehmender Arp 3-Organisation. Durch Rho-Kinase-Inhibition wird die Bildung von Stressfasern gehemmt, die  $\beta$ 3-Phosphorylierung aufrechterhalten und eine Arp3-Organisation verhindert (Chandhoke et al., 2004).

Ein erniedrigter Arp3-Spiegel nach 6-stündiger Iloprost-Stimulation könnte ein Hinweis auf noch unvollständig rückgebildete Aktin-Filament-Strukturen sein, die mit einer noch andauernden Rho-Hemmung verbunden sind.

#### *Vinculin (FC: -2,3)*

Vinculin ist ein Protein fokaler Adhäsionen, das Aktin-Filamente unter Beteiligung von  $\alpha$ -Actinin, Talin u.a.m. mit der Zellmembran verankert. Es ist an der Kontrolle von Adhäsions- und Motilitätsprozessen beteiligt (Weller et al., 1990). Vinculin bindet an den Arp2/Arp3-Komplex (DeMali et al., 2002).

Ein verringerter Vinculin-Spiegel nach 6-stündiger Iloprost-Stimulation könnte auf noch unvollständig ausgebildete fokale Adhäsionen hinweisen.

### **4.4.3 Regulation von Genen der EZM**

#### *TIMP 2 (FC: +3)*

TIMP 2 reguliert Synthese- und Degradationsprozesse der extrazellulären Matrix (EZM) durch Komplexbildung und Inhibition von MMP, den Matrix-abbauenden Proteasen. TIMP 2 besitzt erhöhte Affinität zu MMP 2 und MMP 9.

Da MMP Schlüsselpositionen im Metabolismus von EZM-Proteinen einnehmen, könnte eine Erhöhung der MMP-inhibierenden TIMP 2 nach Iloprost-Stimulation auf einen andauernden EZM-Aufbau hinweisen.

#### *Hyaluronidase 2 (HYAL 2 / LUCA 2) (FC: +2)*

Das Enzym HYAL 2 übt seine Hyaluronidase-Aktivität bei einem pH-Optimum unterhalb von pH 4 aus. Es hydrolisiert hochmolekulare Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*, HA) in kleinere Polysaccharid-Moleküle (Lepperdinger et al., 1998). HYAL 2 wurde in menschlichen Brusttumorzellen im Komplex mit CD 44, dem Rezeptor für Hyaluronsäure beobachtet. Die Aktivierung eines ebenfalls CD 44-assoziierten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers schafft ein saures intra- und extrazelluläres Milieu und begünstigt so die HYAL 2-Funktion (Bourguignon et al., 2004).

Interessanterweise erfolgt die Aktivierung des Austauschers nach Interaktion von HA mit dem CD 44-Rezeptor Rho-vermittelt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Iloprost nach 30-minütiger Stimulation Rho inhibiert. Dies könnte zur Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers mit nachfolgender Blockade der Hyaluronidase-Aktivität von HYAL 2 führen. Die Induktion der HYAL 2-Genexpression ist möglicherweise eine Gegenregulation von hASMC. Eine Interferenz mit dem HA-Abbau könnte funktionell relevant sein, da HA die Proliferation und Migration von SMC fördert (Evanko et al., 1999).

Wie eine Verschiebung der Balance zwischen HA-Synthese (z.B. PDGF-BB-stimuliert) und HA-Abbau über HYAL 2 (z.B. durch Iloprost) reguliert wird, ist noch unbekannt.

Bemerkenswert ist allerdings, dass HA-Synthasen (Sussmann et al., 2004) und auch Hyaluronidase Zielgene von Iloprost zu sein scheinen.

#### *Integrin alpha-2 (FC: -4)*

Integrine sind membrangebundene Rezeptoren für Komponenten der EZM. Über ihre  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten mediiieren sie Zell-Zell- und Zell-EZM-Adhäsionen und sind an Signalvermittlungen beteiligt. Integrine binden eine Vielzahl zytoskeletärer Proteine, darunter Aktin-bindende Proteine mit Strukturfunktion ( $\alpha$ -Aktinin, Filamin, Talin), mit Kinase-Aktivität (FAK) oder mit Adapterfunktion (Paxillin). Integrine binden sich auch direkt an Aktin. (Kieffer et al., 1995). Speziell die Integrin  $\alpha$ -2-Untereinheit ist für die direkte Assoziation mit Aktin verantwortlich, während eine Assoziation mit FAK über die  $\beta$ -Untereinheit erfolgt (Schaller et al., 1995a).

Ein verringerter Integrin alpha-2-Spiegel in hASMC nach 18-stündiger Iloprost-Stimulation könnte auf eine noch nicht abgeschlossene Formation adhäsiver Strukturen und des Zytoskeletts hindeuten.

#### **4.4.4 Regulation von Wachstumsfaktoren**

##### *Amphiregulin (AR) (FC: + 6,1)*

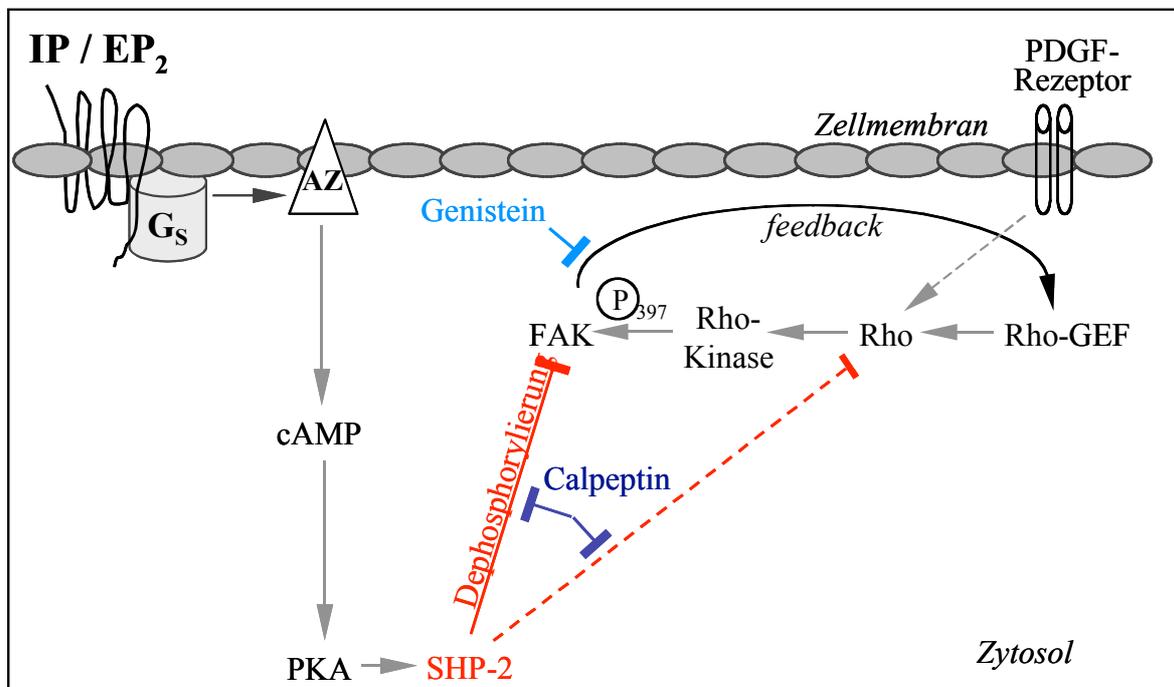
Amphiregulin ist ein autokrin agierender Wachstumsfaktor. Er besitzt *epidermal growth factor*- (EGF-) ähnliche Domänen und gehört zu den Proteinen der EGF-Familie. Derzeit sind 7 verschiedene Polypeptide als Liganden am EGF-Rezeptor bekannt: EGF,  $\text{TGF}\alpha$ , AR, *heparin binding-EGF* (HB-EGF), cripto-1, Epiregulin, Betacellulin. Für AR wurden sowohl proliferationshemmende als auch proliferationsfördernde Wirkungen beschrieben (Shoyab et al., 1988; Kato et al., 2003). Die mitogene Wirkung von AR ist dabei an das Vorhandensein

von Heparansulfat gebunden (Johnson und Wong, 1994). Die Interpretation der Expressionssteigerung von AR-mRNA in hASMC nach Stimulation mit Iloprost erfordert weitere Untersuchungen. Interessanterweise berichten auch Chang et al. von einer cAMP-abhängigen, EP<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelten AR-Induktion in Brustkrebszellen von Mäusen (Chang et al., 2005).

#### 4.5 Fazit & Schlusshypothese

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Iloprost stärker als PGE<sub>2</sub> zur Dephosphorylierung von FAK und Hemmung der Migration von hASMC führt. Die Effekte waren cAMP-vermittelt, so dass die 10-fach höhere cAMP-Bildung durch Iloprost die im Vergleich zu PGE<sub>2</sub> ausgeprägtere Wirkung erklären könnte. Verantwortlich für die schwächere cAMP-Freisetzung bei PGE<sub>2</sub>-Stimulation könnten antagonistische Einflüsse des G<sub>i</sub>-gekoppelten EP<sub>3</sub>-Rezeptors und des EP<sub>4</sub>-Rezeptors sein.

An der raschen FAK-Dephosphorylierung und den Veränderungen des Zytoskeletts durch Iloprost waren Phosphatasen und Inhibitoren des Rho-/Rho-Kinase-Weges beteiligt. Dabei könnte der Aktivierung der Tyrosinphosphatase SHP-2 eine Schlüsselrolle zukommen, indem sie direkt zur Dephosphorylierung von FAK beiträgt oder auch direkt als Rho-Inhibitor agiert. Bei den nach einer Iloprost-Stimulation später einsetzenden Reorganisations- und Rephosphorylierungsprozessen traten Tyrosinkinasen (z.B. FAK) und Aktivatoren des Rho-/Rho-Kinase-Weges in den Vordergrund. In Abbildung 28 ist abschließend eine Hypothese zur cAMP/PKA-medierte Regulation von FAK nach Iloprost- oder PGE<sub>2</sub>-Stimulation schematisch dargestellt:



**Abbildung 29** Hypothese zur cAMP/PKA-medierte Regulation von FAK nach Iloprost- oder PGE<sub>2</sub>-Stimulation. Die cAMP/PKA-abhängige SHP-2-Aktivierung induziert eine Reduktion der FAK-Autophosphorylierung.

Die Autophosphorylierung von FAK könnte durch PDGF-BB-vermittelte Rho-Aktivierung induziert werden. Innerhalb eines positiven *feedback*-Mechanismus trägt autophosphorylierte FAK ihrerseits zur Rho-Aktivierung bei.

Iloprost oder PGE<sub>2</sub> fördern, in unterschiedlichem Ausmaß, die cAMP-Freisetzung. Über cAMP und PKA käme es zu einer Aktivierung von SHP-2 und einer Dephosphorylierung von FAK. Die positive Rückkopplung von FAK auf Rho wäre blockiert, die Aktivität von Rho herabgesetzt. Eine gleichzeitige, direkte Rho-Inhibition durch SHP-2 könnte diesen Effekt noch verstärken.

Die FAK-vermittelte Rho-Aktivierung wäre gleichzeitig als Wirkort von Genistein denkbar. Eine FAK-Kinase-Hemmung würde die Rho-Aktivierung und nachfolgend die Autophosphorylierung von FAK im Sinne eines *circulus vitiosus* verhindern.

FAK-Dephosphorylierung, Zellzyklus- und Migrationshemmung durch Iloprost und PGE<sub>2</sub> erfolgten cAMP-abhängig. Ob die verringerte Autophosphorylierung der FAK eine notwendige Voraussetzung für eine nachfolgende Hemmung von Migration und Zellzyklusprogression darstellt, muss durch weitere funktionelle Experimente geklärt werden. Dabei könnte die Frage nach einem Zusammenhang zwischen SHP-2 und Rho via FAK im Vordergrund stehen.

## 4.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fokalen Adhäsionen, speziell die fokale Adhäsionskinase (FAK), als Angriffspunkte vasodilatatorischer Prostaglandine in hASMC identifiziert. Ein Vergleich der Wirkungen von Iloprost und PGE<sub>2</sub> offenbarte signifikante Unterschiede bei der Regulation von FAK-Autophosphorylierung und Migration.

Vor dem aktuellen Hintergrund der in die Schlagzeilen geratenen selektiven COX-2-Inhibitoren wird der fortwährende Bedarf für Studien zur Wirkung von Prostaglandinen bestätigt. Sie sind essentiell, um wirkungsvollere Strategien für die Therapie arterieller Gefäßerkrankungen entwickeln zu können und gleichzeitig das Risiko von Nebenwirkungen kalkulierbarer zu gestalten.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Atherosklerose ist gekennzeichnet durch massive Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (SMC) und eine ausgeprägte Akkumulation von Extrazellulärmatrix durch die SMC. Diese Prozesse unterliegen dem Einfluss von lokal generierten Prostaglandinen (PG) wie Prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ ) und Prostaglandin ( $\text{PGE}_2$ ). An der PG-Synthese sind die Cyclooxygenasen-1 und -2 (COX-1, -2) beteiligt. Bedingt durch die entzündlichen Gefäßveränderungen kommt es zu einer verstärkten COX-2-Induktion. Über sich daraus ergebende Konsequenzen für die Bildung bzw. das Verhältnis von  $\text{PGI}_2$  und  $\text{PGE}_2$  und ihrer Wirkungen ist wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Effekte dieser vasoaktiven Prostaglandine auf Morphologie, fokale Adhäsionen (FA), Migration und Proliferation PDGF-BB-stimulierter SMC der Aorta (hASMC) vergleichend untersucht.

Die Expression der G-Protein-gekoppelten  $\text{PGI}_2$ - (IP) und  $\text{PGE}_2$ -Rezeptoren ( $\text{EP}_{1-4}$ ) in hASMC wurde mittels RT-PCR bestätigt. Nach 30-minütiger Stimulation der Zellen mit dem stabilen  $\text{PGI}_2$ -Analogon Iloprost und  $\text{PGE}_2$  kam es zur Auflösung des Aktin-Zytoskeletts und Reduktion von FA. Verbunden damit waren Dephosphorylierungen von fokaler Adhäsionskinase (FAK) und Paxillin, wobei Iloprost eine signifikant stärkere Reduktion der FAK-Autophosphorylierung am Tyrosinrest 397 induzierte als  $\text{PGE}_2$ . Alle diese reversiblen Effekte wurden durch Phosphatase-Inhibition mit Vanadat und dem SHP-2-selektiven Calpeptin vollständig aufgehoben. Die Reorganisation des Zytoskeletts und die Rephosphorylierung erfolgten in Gegenwart des Kinase-Inhibitors Genistein verzögert. Es konnte gezeigt werden, dass Iloprost und  $\text{PGE}_2$  über die  $G_s$ -gekoppelten IP- und  $\text{EP}_2$ -Rezeptoren und somit cAMP/PKA-abhängig agierten. Dabei induzierte Iloprost eine signifikant höhere cAMP-Freisetzung als  $\text{PGE}_2$ . Sie korrelierte mit einer signifikant stärkeren Migrationshemmung unter Iloprost im Vergleich zu  $\text{PGE}_2$ . Dagegen wies die Regulation von Proliferation und Zellzyklus durch Iloprost und  $\text{PGE}_2$  keine Unterschiede auf. Beide hemmten die DNA-Synthese in gleichem Maße und bewirkten,  $G_s$ -gekoppelt und cAMP-abhängig, eine Reduktion von Cyclin D1- und eine Erhöhung von  $\text{p27}^{\text{Kip}}$ -Protein. Die Reduktion von Cyclin D1-Protein nach selektiver  $\text{EP}_4$ -Stimulation blieb aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde die unterschiedliche Regulation des Phänotyps von hASMC durch Iloprost und  $\text{PGE}_2$  nachgewiesen. Das Verhältnis der lokal generierten, endogenen Prostaglandine  $\text{PGI}_2$  und  $\text{PGE}_2$  könnte somit Konsequenzen für den Verlauf atherosklerotischer Prozesse *in vivo* und für die Auswirkungen nach Einnahme von COX-Inhibitoren haben.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Abedi, H., Dawes, K. E., Zachary, I. (1995). Differential effects of platelet-derived growth factor BB on p125 focal adhesion kinase and paxillin tyrosine phosphorylation and on cell migration in rabbit aortic vascular smooth muscle cells and Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*; 270; 11367-76.

Adachi, M., Sekiya, M., Miyachi, T., Matsuno, K., Hinoda, Y., Imai, K., Yachi, A. (1992). Molecular cloning of a novel protein-tyrosine phosphatase SH-PTP3 with sequence similarity to the src-homology region 2. *FEBS Lett*; 314; 335-9.

Aikawa, R., Nagai, T., Kudoh, S., Zou, Y., Tanaka, M., Tamura, M., Akazawa, H., Takano, H., Nagai, R., Komuro, I. (2002). Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. *Hypertension*; 39; 233-8.

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*; 271; 20246-9.

Angers-Loustau, A., Cote, J. F., Charest, A., Dowbenko, D., Spencer, S., Lasky, L. A., Tremblay, M. L. (1999). Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *J Cell Biol*; 144; 1019-31.

Bellis, S. L., Miller, J. T., Turner, C. E. (1995). Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J Biol Chem*; 270; 17437-41.

Belton, O., Byrne, D., Kearney, D., Leahy, A., Fitzgerald, D. J. (2000). Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation*; 102; 840-5.

Belvisi, M. G., Saunders, M., Yacoub, M., Mitchell, J. A. (1998). Expression of cyclooxygenase-2 in human airway smooth muscle is associated with profound reductions in cell growth. *Br J Pharmacol*; 125; 1102-8.

Bennett, A. M., Tang, T. L., Sugimoto, S., Walsh, C. T., Neel, B. G. (1994). Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91; 7335-9.

Bennett, A. M., Hausdorff, S. F., O'Reilly, A. M., Freeman, R. M., Neel, B. G. (1996). Multiple requirements for SHPTP2 in epidermal growth factor-mediated cell cycle progression. *Mol Cell Biol*; 16; 1189-202.

Bennett, V., Baines, A. J. (2001). Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev*; 81; 1353-92.

Blindt, R., Bosserhoff, A. K., vom Dahl, J., Hanrath, P., Schrör, K., Hohlfeld, T., Meyer-Kirchrath, J. (2002). Activation of IP and EP(3) receptors alters cAMP-dependent cell migration. *Eur J Pharmacol*; 444; 31-7.

Bombardier, C., Laine, L., Reicin, A., Shapiro, D., Burgos-Vargas, R., Davis, B., Day, R., Ferraz, M. B., Hawkey, C. J., Hochberg, M. C., Kvien, T. K., Schnitzer, T. J. (2000). Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med*; 343; 1520-8, 2 p following 1528.

Bornfeldt, K. E., Krebs, E. G. (1999). Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal*; 11; 465-77.

Bornfeldt, K. E. (2003). The cyclin-dependent kinase pathway moves forward. *Circ Res*; 92; 345-7.

Bourguignon, L. Y., Singleton, P. A., Diedrich, F., Stern, R., Gilad, E. (2004). CD44 interaction with Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem*; 279; 26991-7007.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72; 248-54.

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

Breyer, M. D., Jacobson, H. R., Breyer, R. M. (1996). Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. *J Am Soc Nephrol*; 7; 8-17.

Burgess, J. K., Ge, Q., Boustany, S., Black, J. L., Johnson, P. R. (2004). Increased sensitivity of asthmatic airway smooth muscle cells to prostaglandin E2 might be mediated by increased numbers of E-prostanoid receptors. *J Allergy Clin Immunol*; 113; 876-81.

Burke, J. J., 2nd, Talavera, F., Menon, K. M. (1997). Regulation of PTP1D mRNA by peptide growth factors in the human endometrial cell line HEC-1-A. *J Soc Gynecol Investig*; 4; 310-5.

Burleigh, M. E., Babaev, V. R., Oates, J. A., Harris, R. C., Gautam, S., Riendeau, D., Marnett, L. J., Morrow, J. D., Fazio, S., Linton, M. F. (2002). Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation*; 105; 1816-23.

Burridge, K., Turner, C. E., Romer, L. H. (1992). Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol*; 119; 893-903.

Calalb, M. B., Polte, T. R., Hanks, S. K. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*; 15; 954-63.

Cary, L. A., Chang, J. F., Guan, J. L. (1996). Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Sci*; 109 ( Pt 7); 1787-94.

Cary, L. A., Han, D. C., Polte, T. R., Hanks, S. K., Guan, J. L. (1998). Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Cell Biol*; 140; 211-21.

Cary, L. A., Guan, J. L. (1999). Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Front Biosci*; 4; D102-13.

Catella-Lawson, F. (2001). Vascular biology of thrombosis: platelet-vessel wall interactions and aspirin effects. *Neurology*; 57; S5-7.

Chandhoke, S. K., Williams, M., Schaefer, E., Zorn, L., Blystone, S. D. (2004). Beta 3 integrin phosphorylation is essential for Arp3 organization into leukocyte alpha V beta 3-vitronectin adhesion contacts. *J Cell Sci*; 117; 1431-41.

Chang, S. H., Ai, Y., Breyer, R. M., Lane, T. F., Hla, T. (2005). The Prostaglandin E2 Receptor EP2 Is Required for Cyclooxygenase 2-Mediated Mammary Hyperplasia. *Cancer Res*; 65; 4496-9.

Chang, Y., Ceacareanu, B., Dixit, M., Sreejayan, N., Hassid, A. (2002). Nitric oxide-induced motility in aortic smooth muscle cells: role of protein tyrosine phosphatase SHP-2 and GTP-binding protein Rho. *Circ Res*; 91; 390-7.

Chen, H. C., Appeddu, P. A., Parsons, J. T., Hildebrand, J. D., Schaller, M. D., Guan, J. L. (1995). Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem*; 270; 16995-9.

Chen, H. C., Chan, P. C., Tang, M. J., Cheng, C. H., Chang, T. J. (1998). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase stimulated by hepatocyte growth factor leads to mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*; 273; 25777-82.

Cheng, Y., Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*; 22; 3099-108.

Cheng, Y., Austin, S. C., Rocca, B., Koller, B. H., Coffman, T. M., Grosser, T., Lawson, J. A., FitzGerald, G. A. (2002). Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A<sub>2</sub>. *Science*; 296; 539-41.

Chikumi, H., Fukuhara, S., Gutkind, J. S. (2002). Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation: evidence of a role for focal adhesion kinase. *J Biol Chem*; 277; 12463-73.

Cipollone, F., Prontera, C., Pini, B., Marini, M., Fazia, M., De Cesare, D., Iezzi, A., Uchino, S., Boccoli, G., Saba, V., Chiarelli, F., Cuccurullo, F., Mezzetti, A. (2001). Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation*; 104; 921-7.

Clapp, L. H., Finney, P., Turcato, S., Tran, S., Rubin, L. J., Tinker, A. (2002). Differential effects of stable prostacyclin analogs on smooth muscle proliferation and cyclic AMP generation in human pulmonary artery. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 26; 194-201.

Cunnick, J. M., Meng, S., Ren, Y., Despons, C., Wang, H. G., Djeu, J. Y., Wu, J. (2002). Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2. *J Biol Chem*; 277; 9498-504.

Debey, S., Meyer-Kirchrath, J., Schrör, K. (2003). Regulation of cyclooxygenase-2 expression by iloprost in human vascular smooth muscle cells. Role of transcription factors CREB and ICER. *Biochem Pharmacol*; 65; 979-88.

Del Sal, G., Ruaro, M. E., Philipson, L., Schneider, C. (1992). The growth arrest-specific gene, *gas1*, is involved in growth suppression. *Cell*; 70; 595-607.

DeMali, K. A., Barlow, C. A., Burridge, K. (2002). Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol*; 159; 881-91.

Dembinska-Kiec, A., Gryglewska, T., Zmuda, A., Gryglewski, R. J. (1977). The generation of prostacyclin by arteries and by the coronary vascular bed is reduced in experimental atherosclerosis in rabbits. *Prostaglandins*; 14; 1025-34.

Derkinderen, P., Toutant, M., Burgaya, F., Le Bert, M., Siciliano, J. C., de Franciscis, V., Gelman, M., Girault, J. A. (1996). Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science*; 273; 1719-22.

de Silva, K. I., Daud, A. N., Deng, J., Jones, S. B., Gamelli, R. L., Shankar, R. (2003). Prostaglandin E2 mediates growth arrest in NFS-60 cells by down-regulating interleukin-6 receptor expression. *Biochem J*; 370; 315-21.

Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*; 12; 3499-511.

Dong, J. M., Leung, T., Manser, E., Lim, L. (1998). cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROKalpha. *J Biol Chem*; 273; 22554-62.

Dubreuil, R. R. (1991). Structure and evolution of the actin crosslinking proteins. *Bioessays*; 13; 219-26.

Evanko, S. P., Angello, J. C., Wight, T. N. (1999). Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 19; 1004-13.

Feng, G. S., Hui, C. C., Pawson, T. (1993). SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science*; 259; 1607-11.

Fischer, R. S., Fowler, V. M. (2003). Tropomodulins: life at the slow end. *Trends Cell Biol*; 13; 593-601.

Fujino, H., West, K. A., Regan, J. W. (2002). Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and stimulation of T-cell factor signaling following activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *J Biol Chem*; 277; 2614-9.

Fujioka, Y., Matozaki, T., Noguchi, T., Iwamatsu, A., Yamao, T., Takahashi, N., Tsuda, M., Takada, T., Kasuga, M. (1996). A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the

SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion. *Mol Cell Biol*; 16; 6887-99.

Fukuhara, S., Murga, C., Zohar, M., Igishi, T., Gutkind, J. S. (1999). A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem*; 274; 5868-79.

Garton, A. J., Tonks, N. K. (1994). PTP-PEST: a protein tyrosine phosphatase regulated by serine phosphorylation. *Embo J*; 13; 3763-71.

Gilmore, A. P., Romer, L. H. (1996). Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation. *Mol Biol Cell*; 7; 1209-24.

Goncharova, E. A., Ammit, A. J., Irani, C., Carroll, R. G., Eszterhas, A. J., Panettieri, R. A., Krymskaya, V. P. (2002). PI3K is required for proliferation and migration of human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 283; L354-63.

Goncharova, E. A., Billington, C. K., Irani, C., Vorotnikov, A. V., Tkachuk, V. A., Penn, R. B., Krymskaya, V. P., Panettieri, R. A., Jr. (2003). Cyclic AMP-mobilizing agents and glucocorticoids modulate human smooth muscle cell migration. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 29; 19-27.

Gonzalez, G. A., Montminy, M. R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*; 59; 675-80.

Haier, J., Nicolson, G. L. (2002). PTEN regulates tumor cell adhesion of colon carcinoma cells under dynamic conditions of fluid flow. *Oncogene*; 21; 1450-60.

Hajjar, D. P., Fabricant, C. G., Minick, C. R., Fabricant, J. (1986). Virus-induced atherosclerosis. Herpesvirus infection alters aortic cholesterol metabolism and accumulation. *Am J Pathol*; 122; 62-70.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*; 279; 509-14.

- Hall, P. A., Kearsley, J. M., Coates, P. J., Norman, D. G., Warbrick, E., Cox, L. S. (1995). Characterisation of the interaction between PCNA and Gadd45. *Oncogene*; 10; 2427-33.
- Han, J. D., Rubin, C. S. (1996). Regulation of cytoskeleton organization and paxillin dephosphorylation by cAMP. Studies on murine Y1 adrenal cells. *J Biol Chem*; 271; 29211-5.
- Hanks, S. K., Calalb, M. B., Harper, M. C., Patel, S. K. (1992). Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 89; 8487-91.
- Hedin, U., Bottger, B. A., Forsberg, E., Johansson, S., Thyberg, J. (1988). Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol*; 107; 307-19.
- Higgs, H. N., Pollard, T. D. (2001). Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem*; 70; 649-76.
- Hildebrand, J. D., Schaller, M. D., Parsons, J. T. (1995). Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Biol Cell*; 6; 637-47.
- Hirshman, C. A., Zhu, D., Panettieri, R. A., Emala, C. W. (2001). Actin depolymerization via the beta-adrenoceptor in airway smooth muscle cells: a novel PKA-independent pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*; 281; C1468-76.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*; 69; 11-25.
- Hynes, R. O., Lander, A. D. (1992). Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell*; 68; 303-22.
- Ii, M., Hoshiga, M., Fukui, R., Negoro, N., Nakakoji, T., Nishiguchi, F., Kohbayashi, E., Ishihara, T., Hanafusa, T. (2001). Beraprost sodium regulates cell cycle in vascular smooth

muscle cells through cAMP signaling by preventing down-regulation of p27(Kip1). *Cardiovasc Res*; 52; 500-8.

Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*; 377; 539-44.

Inagaki, K., Noguchi, T., Matozaki, T., Horikawa, T., Fukunaga, K., Tsuda, M., Ichihashi, M., Kasuga, M. (2000). Roles for the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in cytoskeletal organization, cell adhesion and cell migration revealed by overexpression of a dominant negative mutant. *Oncogene*; 19; 75-84.

Johnson, G. L., Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*; 298; 1911-2.

Johnson, G. R., Wong, L. (1994). Heparan sulfate is essential to amphiregulin-induced mitogenic signaling by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*; 269; 27149-54.

Kaksonen, M., Peng, H. B., Rauvala, H. (2000). Association of cortactin with dynamic actin in lamellipodia and on endosomal vesicles. *J Cell Sci*; 113 Pt 24; 4421-6.

Kato, M., Inazu, T., Kawai, Y., Masamura, K., Yoshida, M., Tanaka, N., Miyamoto, K., Miyamori, I. (2003). Amphiregulin is a potent mitogen for the vascular smooth muscle cell line, A7r5. *Biochem Biophys Res Commun*; 301; 1109-15.

Kearsey, J. M., Coates, P. J., Prescott, A. R., Warbrick, E., Hall, P. A. (1995). Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21Cip1. *Oncogene*; 11; 1675-83.

Kieffer, J. D., Plopper, G., Ingber, D. E., Hartwig, J. H., Kupper, T. S. (1995). Direct binding of F actin to the cytoplasmic domain of the alpha 2 integrin chain in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*; 217; 466-74.

Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*; 273; 245-8.

Kiriyama, M., Ushikubi, F., Kobayashi, T., Hirata, M., Sugimoto, Y., Narumiya, S. (1997). Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol*; 122; 217-24.

Koh, E., Morimoto, S., Jiang, B., Inoue, T., Nabata, T., Kitano, S., Yasuda, O., Fukuo, K., Ogihara, T. (1993). Effects of beraprost sodium, a stable analogue of prostacyclin, on hyperplasia, hypertrophy and glycosaminoglycan synthesis of rat aortic smooth muscle cells. *Artery*; 20; 242-52.

Kohyama, T., Liu, X., Kim, H. J., Kobayashi, T., Ertl, R. F., Wen, F. Q., Takizawa, H., Rennard, S. I. (2002). Prostacyclin analogs inhibit fibroblast migration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 283; L428-32.

Kothapalli, D., Stewart, S. A., Smyth, E. M., Azonobi, I., Pure, E., Assoian, R. K. (2003). Prostacyclin receptor activation inhibits proliferation of aortic smooth muscle cells by regulating cAMP response element-binding protein- and pocket protein-dependent cyclin a gene expression. *Mol Pharmacol*; 64; 249-58.

Koyama, Y., Yoshioka, Y., Hashimoto, H., Matsuda, T., Baba, A. (2000). Endothelins increase tyrosine phosphorylation of astrocytic focal adhesion kinase and paxillin accompanied by their association with cytoskeletal components. *Neuroscience*; 101; 219-27.

Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M. J., Sternweis, P. M., Singer, W. D., Gilman, A. G., Bollag, G., Sternweis, P. C. (1998). p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for G $\alpha$ 12 and G $\alpha$ 13. *Science*; 280; 2109-11.

Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*; 15; 1942-52.

Kranenburg, O., Poland, M., Gebbink, M., Oomen, L., Moolenaar, W. H. (1997). Dissociation of LPA-induced cytoskeletal contraction from stress fiber formation by differential localization of RhoA. *J Cell Sci*; 110 ( Pt 19); 2417-27.

Kranenburg, O., Poland, M., van Horck, F. P., Drechsel, D., Hall, A., Moolenaar, W. H. (1999). Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol Biol Cell*; 10; 1851-7.

Kuo, C. C., Gown, A. M., Benditt, E. P., Grayston, J. T. (1993). Detection of Chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb*; 13; 1501-4.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227; 680-5.

Lamb, N. J., Fernandez, A., Conti, M. A., Adelstein, R., Glass, D. B., Welch, W. J., Feramisco, J. R. (1988). Regulation of actin microfilament integrity in living nonmuscle cells by the cAMP-dependent protein kinase and the myosin light chain kinase. *J Cell Biol*; 106; 1955-71.

Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M., Bertoglio, J. (1996). Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *Embo J*; 15; 510-9.

Laudanna, C., Campbell, J. J., Butcher, E. C. (1997). Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants. *J Biol Chem*; 272; 24141-4.

Lepperdinger, G., Strobl, B., Kreil, G. (1998). HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J Biol Chem*; 273; 22466-70.

Li, R. C., Cindrova-Davies, T., Skepper, J. N., Sellers, L. A. (2004). Prostacyclin induces apoptosis of vascular smooth muscle cells by a cAMP-mediated inhibition of extracellular

signal-regulated kinase activity and can counteract the mitogenic activity of endothelin-1 or basic fibroblast growth factor. *Circ Res*; 94; 759-67.

Li, S., Kim, M., Hu, Y. L., Jalali, S., Schlaepfer, D. D., Hunter, T., Chien, S., Shyy, J. Y. (1997). Fluid shear stress activation of focal adhesion kinase. Linking to mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*; 272; 30455-62.

Li, W., Nishimura, R., Kashishian, A., Batzer, A. G., Kim, W. J., Cooper, J. A., Schlessinger, J. (1994). A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*; 14; 509-17.

Libby, P., Warner, S. J., Friedman, G. B. (1988). Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. *J Clin Invest*; 81; 487-98.

Liliental, J., Moon, S. Y., Lesche, R., Mamillapalli, R., Li, D., Zheng, Y., Sun, H., Wu, H. (2000). Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Curr Biol*; 10; 401-4.

Liu, D., Jiang, H., Grange, R. W. (2005). Genistein activates the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate signaling pathway in vascular endothelial cells and protects endothelial barrier func. *Endocrinology*; 146; 1312-20.

Lunn, J. A., Rozengurt, E. (2004). Hyperosmotic stress induces rapid focal adhesion kinase phosphorylation at tyrosines 397 and 577. Role of Src family kinases and Rho family GTPases. *J Biol Chem*; 279; 45266-78.

Lyons, P. D., Dunty, J. M., Schaefer, E. M., Schaller, M. D. (2001). Inhibition of the catalytic activity of cell adhesion kinase beta by protein-tyrosine phosphatase-PEST-mediated dephosphorylation. *J Biol Chem*; 276; 24422-31.

Maehama, T., Dixon, J. E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*; 273; 13375-8.

Manes, S., Mira, E., Gomez-Mouton, C., Zhao, Z.J., Lacalle, R.A., Martinez, A. C. (1999). Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility. *Mol Cell Biol*; 19; 3125-35.

Matsudaira, P. (1994). Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Semin Cell Biol*; 5; 165-74.

Mayr, B. M., Canettieri, G., Montminy, M. R. (2001). Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98; 10936-41.

McAdam, B. F., Catella-Lawson, F., Mardini, I. A., Kapoor, S., Lawson, J. A., FitzGerald, G. A. (1999). Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96; 272-7.

Meyer-Kirchrath, J., Debey, S., Glandorff, C., Kirchrath, L., Schrör, K. (2004). Gene expression profile of the Gs-coupled prostacyclin receptor in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol*; 67; 757-65.

Michaely, P., Bennett, V. (1995). Mechanism for binding site diversity on ankyrin. Comparison of binding sites on ankyrin for neurofascin and the Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anion exchanger. *J Biol Chem*; 270; 31298-302.

Milarski, K. L., Saltiel, A. R. (1994). Expression of catalytically inactive Syp phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin. *J Biol Chem*; 269; 21239-43.

Mitchell, J. A., Evans, T. W. (1998). Cyclooxygenase-2 as a therapeutic target. *Inflamm Res*; 47 Suppl 2; S88-92.

Nakamoto, T., Sakai, R., Honda, H., Ogawa, S., Ueno, H., Suzuki, T., Aizawa, S., Yazaki, Y., Hirai, H. (1997). Requirements for localization of p130cas to focal adhesions. *Mol Cell Biol*; 17; 3884-97.

Namba, T., Oida, H., Sugimoto, Y., Kakizuka, A., Negishi, M., Ichikawa, A., Narumiya, S. (1994). cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. *J Biol Chem*; 269; 9986-92.

Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*; 79; 1193-226.

Needham, L. K., Rozengurt, E. (1998). Galpha12 and Galpha13 stimulate Rho-dependent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130 Crk-associated substrate. *J Biol Chem*; 273; 14626-32.

Neville, D. M., Jr. (1971). Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J Biol Chem*; 246; 6328-34.

Nilius, S. M., Hasse, A., Kuger, P., Schrör, K., Meyer-Kirchrath, J. (2000). Agonist-induced long-term desensitization of the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett*; 484; 211-6.

Nishida, K., Yoshida, Y., Itoh, M., Fukada, T., Ohtani, T., Shirogane, T., Atsumi, T., Takahashi-Tezuka, M., Ishihara, K., Hibi, M., Hirano, T. (1999). Gab-family adapter proteins act downstream of cytokine and growth factor receptors and T- and B-cell antigen receptors. *Blood*; 93; 1809-16.

Numaguchi, Y., Naruse, K., Harada, M., Osanai, H., Mokuno, S., Murase, K., Matsui, H., Toki, Y., Ito, T., Okumura, K., Hayakawa, T. (1999). Prostacyclin synthase gene transfer accelerates reendothelialization and inhibits neointimal formation in rat carotid arteries after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 19; 727-33.

Norel, X., Walch, L., Gascard, J. P., deMontpreville, V., Brink, C. (2004). Prostacyclin release and receptor activation: differential control of human pulmonary venous and arterial tone. *Br J Pharmacol*; 142; 788-96.

Oka, M., Negishi, M., Nishigaki, N., Ichikawa, A. (1993). Two types of prostacyclin receptor coupling to stimulation of adenylate cyclase and phosphatidylinositol hydrolysis in a cultured mast cell line, BNu-2cl3 cells. *Cell Signal*; 5; 643-50.

Padmanabhan, J., Clayton, D., Shelanski, M. L. (1999). Dibutyryl cyclic AMP-induced process formation in astrocytes is associated with a decrease in tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin. *J Neurobiol*; 39; 407-22.

Pasricha, P. J., Hassoun, P. M., Teufel, E., Landman, M. J., Fanburg, B. L. (1992). Prostaglandins E1 and E2 stimulate the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *Prostaglandins*; 43; 5-19.

Peraldi, P., Zhao, Z., Filloux, C., Fischer, E. H., Van Obberghen, E. (1994). Protein-tyrosine-phosphatase 2C is phosphorylated and inhibited by 44-kDa mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91; 5002-6.

Polte, T. R., Naftilan, A. J., Hanks, S. K. (1994). Focal adhesion kinase is abundant in developing blood vessels and elevation of its phosphotyrosine content in vascular smooth muscle cells is a rapid response to angiotensin II. *J Cell Biochem*; 55; 106-19.

Polte, T. R., Hanks, S. K. (1995). Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 92; 10678-82.

Polte, T. R., Hanks, S. K. (1997). Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs. *J Biol Chem*; 272; 5501-9.

Pope, R. K., Pestonjamasp, K. N., Smith, K. P., Wulfkuhle, J. D., Strassel, C. P., Lawrence, J. B., Luna, E. J. (1998). Cloning, characterization, and chromosomal localization of human superillin (SVIL). *Genomics*; 52; 342-51.

Pratico, D., Tillmann, C., Zhang, Z. B., Li, H., FitzGerald, G. A. (2001). Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98; 3358-63.

Proudfoot, D., Fitzsimmons, C., Torzewski, J., Bowyer, D. E. (1999). Inhibition of human arterial smooth muscle cell growth by human monocyte/macrophages: a co-culture study. *Atherosclerosis*; 145; 157-65.

Qi, J. H., Ito, N., Claesson-Welsh, L. (1999). Tyrosine phosphatase SHP-2 is involved in regulation of platelet-derived growth factor-induced migration. *J Biol Chem*; 274; 14455-63.

Rainger, G. E., Nash, G. B. (2001). Cellular pathology of atherosclerosis: smooth muscle cells prime cocultured endothelial cells for enhanced leukocyte adhesion. *Circ Res*; 88; 615-22.

Richardson, A., Parsons, T. (1996). A mechanism for regulation of the adhesion-associated proteintyrosine kinase pp125FAK. *Nature*; 380; 538-40.

Ridley, A. J., Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*; 70; 389-99.

Rimarachin, J. A., Jacobson, J. A., Szabo, P., Maclouf, J., Creminon, C., Weksler, B. B. (1994). Regulation of cyclooxygenase-2 expression in aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*; 14; 1021-31.

Rocchi, S., Gaillard, I., van Obberghen, E., Chambaz, E. M., Vilgrain, I. (2000). Adrenocorticotrophic hormone stimulates phosphotyrosine phosphatase SHP2 in bovine adrenocortical cells: phosphorylation and activation by cAMP-dependent protein kinase; *Biochem J*; 352 Pt 2; 483-90.

Rodriguez-Fernandez, J. L., Rozengurt, E. (1998). Bombesin, vasopressin, lysophosphatidic acid, and sphingosylphosphorylcholine induce focal adhesion kinase activation in intact Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*; 273; 19321-8.

Ross, R., Fuster, V. (1996). The pathogenesis of atherosclerosis. In: Fuster, V., Ross, R., Topol, E.J. (ed.). *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; Chapter 25.

Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., Nebreda, A. R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*; 78; 1027-37.

Rupp, J., Berger, M., Reiling, N., Gieffers, J., Lindschau, C., Haller, H., Dalhoff, K., Maass, M. (2004). Cox-2 inhibition abrogates *Chlamydia pneumoniae*-induced PGE2 and MMP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*; 320; 738-44.

Schafer, C., Ross, S. E., Bragado, M. J., Groblewski, G. E., Ernst, S. A., Williams, J. A. (1998). A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini. *J Biol Chem*; 273; 24173-80.

Schaller, M. D., Parsons, J. T. (1994a). Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*; 6; 705-10.

Schaller, M. D., Hildebrand, J. D., Shannon, J. D., Fox, J. W., Vines, R. R., Parsons, J. T. (1994b). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol*; 14; 1680-8.

Schaller, M. D., Otey, C. A., Hildebrand, J. D., Parsons, J. T. (1995a). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol*; 130; 1181-7.

Schaller, M. D., Parsons, J. T. (1995b). pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol Cell Biol*; 15; 2635-45.

Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T., van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*; 372; 786-91.

Schlaepfer, D. D., Hunter, T. (1996). Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*; 16; 5623-33.

Schlaepfer, D. D., Hunter, T. (1998). Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs?. *Trends Cell Biol*; 8; 151-7.

Schlaepfer, D. D., Jones, K. C., Hunter, T. (1998). Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol Cell Biol*; 18; 2571-85.

Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R., Sieg, D. J. (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol*; 71; 435-78.

Schmidt, A., Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*; 16; 1587-609.

Schneider, C., King, R. M., Philipson, L. (1988). Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*; 54; 787-93.

Schoenwaelder, S. M., Burridge, K. (1999). Evidence for a calpeptin-sensitive protein-tyrosine phosphatase upstream of the small GTPase Rho. A novel role for the calpain inhibitor calpeptin in the inhibition of protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem*; 274; 14359-67.

Schoenwaelder, S. M., Petch, L. A., Williamson, D., Shen, R., Feng, G. S., Burridge, K. (2000) The protein tyrosine phosphatase Shp-2 regulates RhoA activity. *Curr Biol*; 10; 1523-6.

Schonbeck, U., Sukhova, G. K., Graber, P., Coulter, S., Libby, P. (1999). Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*; 155; 1281-91.

Schwaner, I., Seifert, R., Schultz, G. (1992). The prostacyclin analogues, cicaprost and iloprost, increase cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in the human erythroleukemia cell line, HEL, via pertussis toxin-insensitive G-proteins. *Eicosanoids*; 5 Suppl; S10-2.

Seufferlein, T., Rozengurt, E. (1994). Lysophosphatidic acid stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130. Signaling pathways and cross-talk with platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*; 269; 9345-51.

Shen, Y., Schneider, G., Cloutier, J. F., Veillette, A., Schaller, M. D. (1998). Direct association of protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST with paxillin. *J Biol Chem*; 273; 6474-81.

Sheng, H., Shao, J., Washington, M. K., DuBois, R. N. (2001). Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem*; 276; 18075-81.

Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*; 79; 551-5.

Sherr, C. J., Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*; 13; 1501-12.

Shoyab, M., McDonald, V. L., Bradley, J. G., Todaro, G. J. (1988). Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 85; 6528-32.

Sinnett-Smith, J., Lunn, J. A., Leopoldt, D., Rozengurt, E. (2001). Y-27632, an inhibitor of Rho-associated kinases, prevents tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin induced by bombesin: dissociation from tyrosine phosphorylation of p130(CAS). *Exp Cell Res*; 266; 292-302.

Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C. Y., Gilmer, T. M., Kastan, M. B., O'Connor, P. M., Fornace, A. J., Jr. (1994). Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science*; 266; 1376-80.

Srinivasan, Y., Elmer, L., Davis, J., Bennett, V., Angelides, K. (1988). Ankyrin and spectrin associate with voltage-dependent sodium channels in brain. *Nature*; 333; 177-80.

Steiner, A. L., Parker, C. W., Kipnis, D. M. (1972). Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. *J Biol Chem*; 247; 1106-13.

Stewart, A. G., Harris, T., Fernandes, D. J., Schachte, L. C., Koutsoubos, V., Guida, E., Ravenhall, C. E., Vadiveloo, P., Wilson, J. W. (1999). Beta2-adrenergic receptor agonists and cAMP arrest human cultured airway smooth muscle cells in the G(1) phase of the cell cycle: role of proteasome degradation of cyclin D1. *Mol Pharmacol*; 56; 1079-86.

Stossel, T. P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J. H., Noegel, A., Schleicher, M., Shapiro, S. S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2; 138-45.

Sun, H. Q., Yamamoto, M., Mejillano, M., Yin, H. L. (1999). Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem*; 274; 33179-82.

Sussmann, M., Sarbia, M., Meyer-Kirchrath, J., Nusing, R. M., Schror, K., Fischer, J. W. (2004). Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. *Circ Res*; 94; 592-600.

Tachibana, K., Sato, T., D'Avirro, N., Morimoto, C. (1995). Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. *J Exp Med*; 182; 1089-99.

Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parsons, R., Yamada, K. M. (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*; 280; 1614-7.

Tamura, M., Gu, J., Danen, E. H., Takino, T., Miyamoto, S., Yamada, K. M. (1999). PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*; 274; 20693-703.

Tanaka, Y., Yamaki, F., Koike, K., Toro, L. (2004). New insights into the intracellular mechanisms by which PGI<sub>2</sub> analogues elicit vascular relaxation: cyclic AMP-independent, Gs-protein mediated-activation of MaxiK channel. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*; 2; 257-65.

Taylor, J. M., Mack, C. P., Nolan, K., Regan, C. P., Owens, G. K., Parsons, J. T. (2001). Selective expression of an endogenous inhibitor of FAK regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biol*; 21; 1565-72.

Timoshenko, A. V., Xu, G., Chakrabarti, S., Lala, P. K., Chakraborty, C. (2003). Role of prostaglandin E<sub>2</sub> receptors in migration of murine and human breast cancer cells. *Exp Cell Res*; 289; 265-74.

Tsuda, M., Matozaki, T., Fukunaga, K., Fujioka, Y., Imamoto, A., Noguchi, T., Takada, T., Yamao, T., Takeda, H., Ochi, F., Yamamoto, T., Kasuga, M. (1998). Integrin-mediated tyrosine phosphorylation of SHPS-1 and its association with SHP-2. Roles of Fak and Src family kinases. *J Biol Chem*; 273; 13223-9.

Uehara, Y., Ishimitsu, T., Kimura, K., Ishii, M., Ikeda, T., Sugimoto, T. (1988). Regulatory effects of eicosanoids on thymidine uptake by vascular smooth muscle cells of rats. *Prostaglandins*; 36; 847-57.

Vadlamudi, R. K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T. P., Kumar, R. (2002). Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol*; 4; 681-90.

van Oirschot, B. A., Stahl, M., Lens, S. M., Medema, R. H. (2001). Protein kinase A regulates expression of p27(kip1) and cyclin D3 to suppress proliferation of leukemic T cell lines. *J Biol Chem*; 276; 33854-60.

Vane, J. R., Botting, R. M. (1995). New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*; 44; 1-10.

Vargaftig, B. B., Chignard, M. (1975). Substances that increase the cyclic AMP content prevent platelet aggregation and the concurrent release of pharmacologically active substances evoked by arachidonic acid. *Agents Actions*; 5; 137-44.

Vazquez, F., Grossman, S. R., Takahashi, Y., Rokas, M. V., Nakamura, N., Sellers, W. R. (2001). Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem*; 276; 48627-30.

Vogel, W., Lammers, R., Huang, J., Ullrich, A. (1993). Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science*; 259; 1611-4.

Wakino, S., Hayashi, K., Kanda, T., Tatematsu, S., Homma, K., Yoshioka, K.

Takamatsu, I., Saruta, T. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit Rho/Rho kinase pathway by inducing protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Circ Res*; 95; e45-55.

Wary, K. K., Mainiero, F., Isakoff, S. J., Marcantonio, E. E., Giancotti, F. G. (1996). The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell*; 87; 733-43.

Weber, A. A., Zucker, T. P., Hasse, A., Bonisch, D., Wittpoth, M., Schrör, K. (1998). Antimitogenic effects of vasodilatory prostaglandins in coronary artery smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*; 93 Suppl 3; 54-7.

Weller, P. A., Ogryzko, E. P., Corben, E. B., Zhidkova, N. I., Patel, B., Price, G. J., Spurr, N. K., Koteliansky, V. E., Critchley, D. R. (1990). Complete sequence of human vinculin and assignment of the gene to chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 87; 5667-71.

Whitney, G. S., Chan, P. Y., Blake, J., Cosand, W. L., Neubauer, M. G., Aruffo, A., Kanner, S. B. (1993). Human T and B lymphocytes express a structurally conserved focal adhesion kinase, pp125FAK. *DNA Cell Biol*; 12; 823-30.

Williams, S. P., Dorn, G. W., 2nd, Rapoport, R. M. (1994). Prostaglandin I<sub>2</sub> mediates contraction and relaxation of vascular smooth muscle. *Am J Physiol*; 267; H796-803.

Wohlfeil, E. R., Campbell, W. B. (1999). 25-hydroxycholesterol increases eicosanoids and alters morphology in cultured pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 19; 2901-8.

Wong, E., Huang, J. Q., Tagari, P., Riendeau, D. (2001). Effects of COX-2 inhibitors on aortic prostacyclin production in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*; 157; 393-402.

Wong, S. T., Baker, L. P., Trinh, K., Hetman, M., Suzuki, L. A., Storm, D. R., Bornfeldt, K. E. (2001). Adenylyl cyclase 3 mediates prostaglandin E<sub>2</sub>-induced growth inhibition in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*; 276; 34206-12.

Yamada, K. M., Araki, M. (2001). Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci*; 114; 2375-82.

Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M. J., Sturgill, T. W. (1993). Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science*; 262; 1065-9.

Yamamoto, M., Aoyagi, M., Fukai, N., Matsushima, Y., Yamamoto, K. (1999). Increase in prostaglandin E<sub>2</sub> production by interleukin-1 $\beta$  in arterial smooth muscle cells derived from patients with moyamoya disease. *Circ Res*; 85; 912-8.

Yasumura, Y., Buonassisi, V., Sato, G. (1966). Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. *Cancer Res*; 26; 529-35.

Yau, L., Zahradka, P. (2003). PGE<sub>2</sub> stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via the EP2 receptor. *Mol Cell Endocrinol*; 203; 77-90.

Yin, H. L., Stull, J. T. (1999). Proteins that regulate dynamic actin remodeling in response to membrane signaling minireview series. *J Biol Chem*; 274; 32529-30.

You, M., Yu, D. H., Feng, G. S. (1999). Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol Cell Biol*; 19; 2416-24.

Yu, D. H., Qu, C. K., Henegariu, O., Lu, X., Feng, G. S. (1998). Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. *J Biol Chem*; 273; 21125-31.

Zamir, E., Geiger, B. (2001). Components of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*; 114; 3577-9.

Zhao, Z. J., Zhao, R. (1998). Purification and cloning of PZR, a binding protein and putative physiological substrate of tyrosine phosphatase SHP-2. *J Biol Chem*; 273; 29367-72.

Zhu, X., Assoian, R. K. (1995). Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell*; 6; 273-82.

Zhu, S., Han, G., White, R. E. (2002). PGE<sub>2</sub> action in human coronary artery smooth muscle: role of potassium channels and signaling cross-talk. *J Vasc Res*; 39; 477-88.

Zhu, X., Ohtsubo, M., Bohmer, R. M., Roberts, J. M., Assoian, R. K. (1996). Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol*; 133; 391-403.

Zucker, T. P., Bonisch, D., Hasse, A., Grosser, T., Weber, A. A., Schrör, K. (1998). Tolerance development to antimitogenic actions of prostacyclin but not of prostaglandin E1 in coronary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*; 345; 213-20.

## 7 VERÖFFENTLICHUNGEN

### Tagungen und Kongresse

Bulin, C., Levkau, B., Fischer, J.W. (2004).

Dephosphorylation of focal adhesion kinase in response to iloprost precedes cell cycle arrest in human smooth muscle cells.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharm.; 369; R34 (136).

Bulin, C., Levkau, B., Weber, A.-A., Schrör, K., Fischer, J.W. (2005).

Iloprost decreases focal adhesion kinase autophosphorylation by regulating tyrosine phosphatases and Rho signaling in human aortic smooth muscle cells.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharm.; 371; R87 (367).

Bulin, C., Levkau, B., Weber, A.-A., Schrör, K., Fischer, J.W. (2004).

Differential effects of vasodilatory prostaglandins on focal adhesions, cytoskeletal architecture and migration in human smooth muscle cells.

Deutsch. Med. Wochenschr. 129: S141-S172; Supplement 3.

- Young Investigator Award -

### Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Bulin, C., Albrecht, U., Bode, J. G., Weber, A. A., Schror, K., Levkau, B., Fischer, J. W. (2005).

Differential Effects of Vasodilatory Prostaglandins on Focal Adhesions, Cytoskeletal Architecture, and Migration in Human Aortic Smooth Muscle Cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol; 25; 84-9.

## **8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf, den 6. Juni 2005

Claudia Bulin

## 9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. J.W. Fischer für die Überlassung der Fragestellungen, die konsequente Unterstützung bei der Realisierung der Dissertation und das jederzeit gewährte, hilfreiche Gespräch. Der Umzug des Labors vom Institut für Pharmakologie, Kiel, an das Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Düsseldorf, erforderte Enthusiasmus und ließ eine produktive und stimulierende Laborzeit folgen.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich für die freundliche Aufnahme am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie in Düsseldorf unter Leitung von Professor Dr. med. K. Schrör und die Möglichkeit der Fortführung der Arbeit bedanken.

Professor Dr. rer. nat. P. Proksch danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Ein aufrichtiger Dank geht an Frau Peggy Mann, Düsseldorf, und Frau Elke Schröder, Kiel, für die praktische Unterstützung im Labor und vor allem ihren herzlichen und erquickenden Anteil am Laboralltag.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Durchführung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein herzlicher Dank gilt Herrn emer. Professor Dr. rer. nat. A. Ziegler für die Vermittlung des Kontaktes zu Herrn Professor Fischer und die inspirierende und angenehme Atmosphäre in der Sektion Pharmakologie für Naturwissenschaftler am Institut für Pharmakologie, Kiel.

## 10 LEBENS LAUF

### **Claudia Bulin**

Geburtsdatum : 04.04.1973  
 Geburtsort : Suhl / Thüringen  
 Nationalität : deutsch

### **Schulische Ausbildung + beruflicher Werdegang**

1979 – 1989 Polytechnische Oberschule Schleusingen  
 1989 – 1990 Beginn einer Ausbildung zur Pharmazeutischen Assistentin in der ehemaligen DDR  
 1990 – 1992 Hennebergisches Gymnasium, Schleusingen  
 (Wiedereinschulung nach Veränderung der politischen Verhältnisse)

### **Studium + Promotion**

1992 – 1993 Studium generale am Leibniz Kolleg, Tübingen  
 1993 – 1998 Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen und an der Christian Albrechts-Universität, Kiel  
 1998 – 1999 Praktisches Jahr  
 12.1998 – 07.1999 Sophienhof-Apotheke Kiel  
 08.1999 – 12.1999 AstraZeneca, Lund, Schweden  
 01.2000 Erteilung der Approbation als Apothekerin  
 01.2000 – 06.2000 Forschungsassistent Bereich „Biopharmazie & Forschung“, AstraZeneca, Lund, Schweden  
 09.2000 – 04.2002 Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie des Universitätsklinikums Kiel, Sektion für Naturwissenschaftler (Dr. rer. nat. J.W. Fischer, Prof. Dr. rer. nat. A. Ziegler)  
 05.2002 – heute Fortführung der Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (Prof. Dr. rer. nat. J.W. Fischer)

Düsseldorf, den 6. Juni 2005