Untersuchungen zur gefäßprotektiven

Wirkung von lloprost an humanen Gefäßmuskelzellen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christian Glandorff

aus Oberhausen

Düsseldorf 2007

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

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Fischer Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Proksch Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

| 1.1 | Zielsetzung der Arbeit | 11 |
|---------|---|----|
| 1.2 | Kalzifizierung | 11 |
| 1.2.1 | Kalzifizierung bei terminaler Niereninsuffizienz | 12 |
| 1.3 | Mechanismen der vaskulären Kalzifizierung | 13 |
| 1.3.1 | Induktoren | 14 |
| 1.3.1.1 | core binding factor α 1 (Cbfa-1) | 14 |
| 1.3.1.2 | Gewebsunspezifische alkalische Phosphatase (TNAP) | 15 |
| 1.3.1.3 | Bone sialo Protein 2 (BSP-2) | 16 |
| 1.3.1.4 | Kollagen 1α1 (Col1α1) | 16 |
| 1.3.1.5 | Decorin | 17 |
| 1.3.2 | Inhibitoren | 18 |
| 1.3.2.1 | Matrix GLA Protein (MGP) | 19 |
| 1.3.2.2 | Osteoprotegerin (OPG) | 20 |
| 1.3.3 | Freisetzung von Nukleationskomplexen | 21 |
| 1.3.4 | Zelltod | 22 |
| 1.4 | Prostazyklin (PGI ₂) | 22 |
| 1.5.1 | Stanniocalcin 1 (Stc-1) | 24 |
| 1.5.2 | Stanniocalcin 2 (Stc-2) | 25 |

2 Material und Methoden

| 2.1.1 | Substanzen | 26 |
|-------|-----------------------|----|
| 2.1.2 | Chemikalien und Kits | 27 |
| 2.1.3 | Immunochemikalien | 28 |
| 2.1.4 | Zellkultur | 28 |
| 2.1.5 | Verbrauchsmaterialien | 28 |

Inhaltsverzeichnis

| 2.1.6 | Puffer und Lösungen | 29 |
|---------|---|----|
| 2.2 | Geräte | 30 |
| 2.3 | Zellkultur | 31 |
| 2.3.1 | Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen | 31 |
| 2.3.2 | Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen | 31 |
| 2.3.2.1 | Histologischer Nachweis der Kalzifizierung | 32 |
| 2.3.2.2 | Biochemische Kalziumbestimmung | 32 |
| 2.4 | Biochemische Bestimmung der alkalischen Phosphatase | 32 |
| 2.5 | RT-PCR | 32 |
| 2.6 | Proteinanalyse | 34 |
| 2.6.1 | Western Blot | 34 |
| 2.6.2 | SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) | 34 |
| 2.6.3 | Proteintransfer | 34 |
| 2.6.4 | Antikörper-Hybridisierung und Detektion | 34 |
| 2.6.5 | Prüfung auf gleichmäßige Proteinbeladung | 35 |
| 2.6.6 | Bestimmung von Proteinkonzentrationen | 35 |
| 2.7 | Migrationsassay | 35 |
| 2.8 | Messung der DNA-Synthese | 36 |
| 2.9 | Statistische Analyse | 36 |
| 2.10 | Genexpressions-Analyse | 37 |
| 2.10.1 | Puffer und Lösungen | 38 |
| 2.10.2 | RNA-Isolierung | 39 |
| 2.10.3 | Aufreinigung der RNA | 39 |
| 2.10.4 | RNA-Qualitätskontrolle | 40 |
| 2.10.5 | cDNA-Synthese | 40 |
| 2.10.6 | Aufreinigung und Konzentrierung der cDNA | 40 |
| 2.10.7 | In-vitro Transkription (IVT) | 41 |
| 2.10.8 | Aufreinigung und Konzentrierung der biotinylierten cRNA | 41 |
| 2.10.9 | Fragmentierung der cDNA | 41 |
| 2.10.10 | Hybridisierung | 41 |
| 2.10.11 | Färbung und Detektion | 42 |
| 2.10.12 | Qualitätskontrolle und Expressionsanalyse | 42 |

Inhaltsverzeichnis

| 2.11 | Adenovirale Überexpression | 43 |
|---------|--|----|
| 2.11.1 | Methodik | 43 |
| 2.11.2 | Umklonierung von Stc-1 in pDNR-CMV | 45 |
| 2.11.3 | Cre/Lox Rekombination von pDNR-CMV mit pLP-Adeno-X-CMV | 45 |
| 2.11.4 | Transformation in E. coli | 46 |
| 2.11.5 | Ausplattieren | 46 |
| 2.11.6 | Mini-Präparation und PCR Kolonienscreening | 47 |
| 2.11.7 | Aufreinigung der rekombinanten adenoviralen DNA (MIDI-Präparation) | 48 |
| 2.11.8 | Restriktionsanalysen | 48 |
| 2.11.9 | Gewinnung rekombinanter Adenoviren in HEK 293 Zellen | 48 |
| 2.11.10 | Virusaufreinigung | 49 |
| 2.11.11 | Titerbestimmung | 49 |
| 2.11.12 | Multiplicity of infection (MOI) | 50 |
| 2.11.13 | Test auf rekombinante Adenoviren (RCA-Test) | 51 |

3 Ergebnisse

| 3.1 | Untersuchungen zur Kalzifizierung | 52 |
|---------|--|----|
| 3.1.1 | Biochemische Kalziumbestimmung | 52 |
| 3.1.2 | Histologischer Nachweis der Kalzifizierung | 53 |
| 3.1.3 | Analyse von Kalzifizierungsmarkern | 54 |
| 3.1.3.1 | core binding factor α 1 (cbfa-1) | 54 |
| 3.1.3.2 | Gewebsunspezifische alkalische Phosphatase (TNAP) | 55 |
| 3.1.3.3 | bone sialo protein 2 (BSP-2) | 56 |
| 3.1.3.4 | Kollagen 1α1 (Col1α1) | 57 |
| 3.1.3.5 | Decorin | 58 |
| 3.1.4.1 | Matrix GLA Protein (MGP) | 61 |
| 3.1.4.2 | Osteoprotegerin | 62 |
| 3.1.5 | Untersuchungen zu Stanniocalcin 1 | 63 |
| 3.1.5.1 | Zeitabhängigkeit der Regulation von Stc-1 durch lloprost | 63 |

<u>Inhaltsverzeichnis</u>

| Konzentrationsabhängigkeit der Stc-1 Induktion durch lloprost | 64 |
|---|--|
| Untersuchungen zu Stanniocalcin 2 | 64 |
| Zeitabhängigkeit der Regulation von Stc-2 durch lloprost | 64 |
| Konzentrationsabhängigkeit der Stc-2 Expression durch lloprost | 65 |
| Regulation von Stc-1 durch PGE ₂ | 66 |
| Untersuchung des Einflusses von Stc-1 auf die Kalzifizierung | 67 |
| Stc-1 Induktion nach 14-tägiger Kalzifizierung | 67 |
| Stc-1 Einfluss auf eine 14-tägige Kalzifizierung | 68 |
| Stanniocalcin 1 Einfluss auf die Proliferation glatter Gefässmuskelzellen | 69 |
| Stanniocalcin 1 Einfluss auf die Migration glatter Gefässmuskelzellen | 69 |
| | Konzentrationsabhängigkeit der Stc-1 Induktion durch Iloprost Untersuchungen zu Stanniocalcin 2 Zeitabhängigkeit der Regulation von Stc-2 durch Iloprost Konzentrationsabhängigkeit der Stc-2 Expression durch Iloprost Regulation von Stc-1 durch PGE ₂ Untersuchung des Einflusses von Stc-1 auf die Kalzifizierung Stc-1 Induktion nach 14-tägiger Kalzifizierung Stc-1 Einfluss auf eine 14-tägige Kalzifizierung Stanniocalcin 1 Einfluss auf die Proliferation glatter Gefässmuskelzellen |

4 Diskussion

| 4.1 | Untersuchungen zur Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen | 72 |
|--------|---|----|
| 4.1.1 | Der Einfluss von lloprost auf die Kalzifizierung | 72 |
| 4.1.2 | Der Einfluss von PGE ₂ auf die Kalzifizierung | 73 |
| 4.1.3 | Cbfa1 Expression und Bedeutung für die Kalzifizierung | 73 |
| 4.1.4 | Induktion der gewebsunspezifischen Phosphatase (TNAP) | 75 |
| 4.1.5 | bone sialo protein 2 (BSP-2) | 75 |
| 4.1.6 | Kollagen 1 α 1 (Col1 α 1) | 75 |
| 4.1.7 | Decorin und vaskuläre Kalzifizierung | 76 |
| 4.1.8 | Matrix GLA Protein (MGP) | 78 |
| 4.1.9 | Osteoprotegerin (OPG) | 78 |
| 4.1.10 | Regression der Kalzifizierung | 79 |
| 4.2 | Untersuchungen zu Stanniocalcin 1 | 80 |
| 4.2.1 | Der differentiell induktive Effekt von lloprost und PGE2 | 80 |
| 4.2.2 | Der Einfluss von Stc-1 auf die Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen | 80 |
| 4.2.3 | Stanniocalcin 1 Untersuchungen zur Proliferation | 80 |
| 4.2.4 | Der Einfluss von Stc-1 auf die Migration glatter Gefäßmuskelzellen | 81 |

| 5 | Ausblick | 79 |
|----|---------------------------|----|
| 6 | Zusammenfassung | 80 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 81 |
| 8 | Veröffentlichungen | 93 |
| 9 | Eidesstattliche Erklärung | 94 |
| 10 | Danksagung | 95 |
| 11 | Lebenslauf | 96 |

Abkürzungsverzeichnis

| Abb. | Abbildung |
|----------|---|
| ALP | alkalische Phosphatase |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| BSP-2 | bone sialo protein 2 |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| cbfa1 | core binding factor α 1 |
| col-1α 1 | Kollagen 1 α 1 |
| сох | Cyclooxygenase |
| CVC | calcifying vascular cells |
| DAB | 3,3´-Diaminobenzidin |
| DAG | Diacylglycerol |
| DEPC | Diethyl-pyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ECM | extrazelluläre Matrix |
| FBS | fetale bovine serum, fötales Rinderserum |
| GAPDH | Glycerol Aldehyd Phosphat Dehydrogenase |
| h | <i>hours</i> , Stunden |
| hCaSMC | humane glatte Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien |
| HEK | human embryonal kidney cells |
| HRP | horse raddish peroxidase |
| IP-R | Prostazyklinrezeptor |
| kb | 1 kb = 1000 Basen |
| MGP | Matrix GLA Protein |
| min | Minuten |
| MOI | multiplicity of infection |
| mRNA | messenger-RNA |
| NFkB | NF-kappaB |
| nm | Nanometer |
| OD | optische Dichte |
| OPG | Osteoprotegerin |
| OPG-L | Osteoprotegerin-Ligand |
| PBS | phosphate buffered sodium, phosphat-gepufferte Salzlösung |
| | |

Abkürzungsverzeichnis

| PBST | PBS mit Tween 20 | |
|------------------|---|--|
| PDGF-BB | pateled derived growth factor, Homodimer der B-Ketten | |
| PFU | plaque forming units | |
| PGE ₂ | Prostaglandin E 2 | |
| PGI ₂ | Prostaglandin I ₂ , Prostazyklin | |
| РКА | Proteinkinase A | |
| PLC | Phospholipase C | |
| PMA | Phorbol-12-myristat-13-acetat | |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid | |
| RANK | receptor activator of NF-kappaB | |
| RANKL | receptor activator of NF-kappaB ligand | |
| RGD | Arginin (R), Glycin (G), Asparaginsäure (D) Aminosäuresequenz | |
| RNA | Ribonukleinsäure | |
| RT | Raumtemperatur | |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion | |
| SAPE | Streptavidin-Phycoerythrin | |
| SMC | smooth muscle cell: glatte Gefäßmuskelzellen | |
| Stc-1 | Stanniocalcin 1 | |
| Stc-2 | Stanniocalcin 2 | |
| TBE | Tris / Borsäure / EDTA | |
| TBS | Trisgepufferte Salzlösung | |
| TBST | TBS mit Tween 20 | |
| TE | Tris / EDTA | |
| Temed | N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin | |
| TNAP | tissue non-specific alkaline phosphatase | |
| TINFα | Tumornekrosefaktor alpha | |
| TNI | terminale Niereninsuffizienz | |
| Tris | Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan | |
| Tween 20 | Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat | |
| UV | Ultraviolett | |
| VSMC | vascular smooth muscle cells, glatte Gefäßmuskelzellen | |
| v/v | Volumenprozent | |

Abbildungsverzeichnis

| <u>Abbildu</u> | ing <u>Titel</u> | <u>Seite</u> |
|----------------|--|--------------|
| 1 | Auslösende Mechanismen einer Kalzifizierung | 13 |
| 2 | Aufbau Decorin | 17 |
| 3 | Mechanismus der Kalziumhydroxylapatitbildung | 19 |
| 4 | Strukturformel lloprost | 24 |
| 5 | Aufbau eines Adenovirus | 43 |
| 6 | Aufbau loxP-Seite | 44 |
| 7 | pDNR-CMV Donorvektorkarte | 44 |
| 8 | Cre/Lox Rekombination | 45 |
| 9 | 14-tägige Kalzifizierung unter lloprost | 52 |
| 10 | histologischer Nachweis der Kalzifizierung | 53 |
| 11 | Kalzifizierung unter dem Einfluss von Forskolin und PGE ₂ | 53 |
| 12 | cbfa1 Induktion nach 14-tägiger Kalzifizierung | 54 |
| 13 | TNAP mRNA Expression nach 14-tägiger Kalzifizierung | 55 |
| 14 | TNAP Aktivität | 56 |
| 15 | BSP-2 mRNA Expression | 57 |
| 16 | MGP mRNA Expression | 58 |
| 17 | OPG mRNA Expression | 59 |
| 18 | Kollagen 1α1 mRNA Expression | 60 |
| 19 | Decorin mRNA Expression | 60 |
| 20 | Decorin Proteinexpression | 61 |
| 21 | Kalzifizierung unter Decorin | 62 |
| 22 | Zeitabhängigkeit der Stc-1 Expression | 63 |
| 23 | Konzentrationsabhängigkeit der Stc-1 Expression | 64 |
| 24 | Zeitabhängigkeit der Stc-2 Expression | 65 |
| 25 | Konzentrationsabhängigkeit der Stc-2 Expression | 66 |
| 26 | Stc-1 Induktion durch PGE ₂ | 67 |
| 27 | Stc-1 Induktion nach 14-tägiger Kalzifizierung | 68 |
| 28 | Kalzifizierung unter Stc-1 | 68 |
| 29 | Stc-1 Einfluss auf die Proliferation | 69 |
| 30 | Stc-1 Einfluss auf die Migration | 70 |
| 31 | Decorin und vaskuläre Kalzifizierung | 77 |

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Im Fokus der Arbeit stand einerseits die Wirkung von Prostazyklin auf die Kalzifizierung glatter Gefässmuskelzellen sowie die Identifizierung vermittelnder Gene und Mechanismen. Andererseits wurde der Einfluss von Stanniocalcin 1 auf die atherogenen Prozesse Kalzifizierung, Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen untersucht.

1.2 Kalzifizierung

Die pathologische Kalzifizierung vaskulärer Strukturen, auch vasukläre Kalzifizierung, ist verbunden mit einer Vielzahl vaskulärer Erkrankungen, wie auch der terminalen Niereninsuffizienz (TNI). Kalziumphosphatablagerungen in Form des Kalziumapatits sind Kennzeichen der Kalzifizierung und können an verschiedenen Orten auftreten.

Im Gefäßsystem treten Kalziumphosphatablagerungen in verschiedenen Strukturen auf und lassen sich bestimmten pathologischen Erscheinungen zuordnen. Eine Kalzifizierung der Intima tritt in atherosklerotischen Läsionen auf (Burke, Taylor et al. 2000; Hunt, Fairman et al. 2002) und ist assoziiert mit dem Auftreten von Entzündungsfaktoren (Jeziorska, McCollum et al. 1998).

Eine Kalzifizierung der Media tritt in der Matrix zwischen glatten Gefäßmuskelzellen ohne das frühe Auftreten von Atherosklerose und Entzündungsfaktoren auf (Ibels, Alfrey et al. 1979; Shanahan, Cary et al. 1999), sie geht meist mit einer Versteifung des Gefäßes einher und wird vorwiegend bei einer im höheren Alter entsprechenden Atherosklerose, bei Diabetes, sowie TNI beobachtet (Edmonds, Morrison et al. 1982). Man geht davon aus, dass sie meist eine Folge des überschrittenen Löslichkeitsproduktes von Kalzium- und Phosphationen darstellt, was jedoch nicht zwingend notwendig ist (Everhart, Pettitt et al. 1988). Eine Kalzifizierung der Intima kann unabhängig von der der Media erfolgen. Bei Patienten mit TNI treten beide Formen in betroffenen Gefäßen auf. (Ibels, Alfrey et al. 1979; Schwarz, Buzello et al. 2000).

Je nach Ausmaß der vaskulären Kalzifizierung kann es bei dem betroffenen Organ bis zur völligen Fehlfunktion kommen. Im Herzen wird eine Kalzifizierung sowohl natürlicher als auch künstlicher Klappen als Hauptursache für eine Fehlfunktion betrachtet. (O'Keefe, Lavie et al. 1991; Schoen and Levy 1999) Bei dialysepflichtigen Patienten ist die Kalzifizierung die Hauptursache für die systemische Kalziphylaxie, eine nekrotisierende Gefäßerkrankung, die mit hohen Mortalitätsraten einhergeht (Coates, Kirkland et al. 1998).

<u>Einleitung</u>

Eine genetische Erkrankung, die idiopathische, infantile, arterielle Kalzifizierung, ist durch geringe Pyrophosphatspiegel gekennzeichnet. Sie führt bei Neugeborenen rasch zur Sklerose und Kalzifizierung von Herzklappen (meist Mitralklappe). Funktionell resultiert daraus eine Klappenstenose und Insuffizienz (Rutsch, Ruf et al. 2003).

Durch die Einführung neuer, nicht-invasiver Methoden wie der Elektronenstrahl-Computertomographie ergaben sich neue Erkenntnisse über den Prozess der vaskulären Kalzifizierung. In Koronarien besteht ein enger Zusammenhang zwischen Kalzifizierung und atherosklerotischer Plaqueausbreitung (Rumberger, Simons et al. 1995; Sangiorgi, Rumberger et al. 1998), einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkte (Beadenkopf, Daoud et al. 1964) sowie Plaqueinstabilität (Burke, Taylor et al. 2000). Obgleich einige dieser Tatsachen dafür sprechen, dass die koronare Kalzifizierung mit diesen pathologischen Befunden einhergeht, ist es ebenfalls möglich, dass sie selbst die Ursache für diese ist und zum Fortschreiten der kardiovaskulären Erkrankung führt. Diese Möglichkeit erscheint teilweise plausibel für die koronare Kalzifizierung bei der terminalen Niereninsuffizienz. Letztlich führt die vaskuläre Kalzifizierung der Media zur Gefäßversteifung und ist assoziiert mit Komplikationen bei Diabetes Typ I (Lehto, Niskanen et al. 1996; Olson, Edmundowicz et al. 2000)

1.2.1 Kalzifizierung bei terminaler Niereninsuffizienz

Mehr als die Hälfte aller Todesfälle bei der terminalen Niereninsuffizienz sind kardiovaskulärer Natur. Das Risiko eines Erwachsenen mit TNI an einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben ist 20-30mal höher als das der Normalbevölkerung (Foley and Parfrey 1998). Studienbefunde deuten zunehmend darauf hin, dass die vaskuläre Kalzifizierung eine Hauptursache für die erhöhte Sterblichkeit dieser Bevölkerungsschicht darstellt. Hyperphosphatämie und ein erhöhtes Kalziumphosphationenprodukt fördern die vaskuläre Kalzifizierung und sind verknüpft mit allen Ursachen der erhöhten kardiovaskulären Sterblichkeit bei Erwachsenen mit TNI (Block 2000). Goodman et al (Goodman, Goldin et al. 2000) konnten zeigen, dass eine koronare Kalzifizierung bei jungen Erwachsenen mit TNI bereits früher als bei der Normalbevölkerung auftrat. Desweiteren bestand ein enger Zusammenhang zwischen Progression der Erkrankung und den Serumphosphatwerten, dem Kalziumphosphationenprodukt sowie der Kalziumaufnahme (Goodman, Goldin et al. 2000). Ähnliche Befunde fanden Eifinger et al (Eifinger, Wahn et al. 2000) bei der juvenilen TNI. Gleichzeitig fanden Raggi et al., dass eine arterielle Kalzifizierung sehr typisch für ältere dialysepflichtige Patienten war und signifikant mit dem Auftreten ischämischer Ereignisse korrelierte.

<u>Einleitung</u>

Kalzifizierung geht also einher mit einem erhöhten Kalziumphosphationenprodukt und einer erhöhten Kalziumaufnahme (Guerin, London et al. 2000; London, Guerin et al. 2003). Eine Störung des Kalzium- und Phosphathaushaltes stellt einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse bei TNI dar.

1.3 Mechanismen der vaskulären Kalzifizierung

Vaskuläre Kalzifizierung wird gegenwärtig als aktiv regulierter Prozess betrachtet, der durch verschiedene unabhängige Mechanismen entsteht (Speer and Giachelli 2004). Es werden dabei 4 auslösende Mechanismen für eine Kalzifizierung diskutiert:



Abbildung 1 Übersicht auslösender Mechanismen einer vaskulären Kalzifizierung

- 1. Induktoren: Expression mineralisationsfördernder Proteine und dadurch bedingte phänotypische Änderungen im Zellverhalten
- 2. Inhibitorenmangel
- 3. die Freisetzung von Nukleationskomplexen
- 4. Zelltod

1.3.1 Induktoren

Das Vorhandensein mineralisationsregulierender Proteine wie Osteopontin (Giachelli, Bae et al. 1993), Osteocalcin (Levy, Schoen et al. 1983), BMP2 (Bostrom, Watson et al. 1993), sowie Matrixvesikel (Tanimura, McGregor et al. 1983) in kalzifizierten vaskulären Läsionen (Mohler, Gannon et al. 2001; Hunt, Fairman et al. 2002) legte nahe, dass osteogene Mechanismen bei der Kalzifizierung ebenfalls eine Rolle spielen. Tatsächlich durchlaufen Zellen, die ursprünglich der Media entstammen knochen- und knorpelgleiche phänotypische Veränderungen (Jono, Nishizawa et al. 1998; Tintut, Parhami et al. 1998; Jono, McKee et al. 2000; Tintut, Patel et al. 2000; Parhami, Basseri et al. 2002). Im Folgenden wird nun auf einige Faktoren eingegangen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden und bei der Induktion einer Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen eine Rolle spielen.

1.3.1.1 core binding factor alpha 1 (Cbfa-1)

Der *core binding factor alpha 1* (Cbfa-1) spielt als osteoblastärer Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle bei der Osteoblastendifferenzierung und Expression osteoblastenspezifischer Gene.

Cbfa-1 gehört zur runt-domain Genfamilie, welcher u.a. die Bildung von Osteokalzin reguliert (Schinke and Karsenty 1999). Bisher wurden drei *runt-domain* Gene identifiziert (Bae, Yamaguchi-Iwai et al. 1993; Ogawa, Inuzuka et al. 1993). Sie besitzen die DNA-Bindungsdomäne *runt*, welche homolog zu dem Drosophila pair-rule Gen *runt* ist (Kania, Bonner et al. 1990); sie bilden Heterodimere mit dem Kotranskriptionsfaktor Cbfb und führen zu erhöhter DNA-Bindungskapazität in vitro (Ogawa, Inuzuka et al. 1993).

1.3.1.2 gewebsunspezifische alkalische Phosphatase (TNAP)

Phosphatasen sind Enzyme, die die Hydrolyse von Phosphorsäure-Estern katalysieren. Die alkalische Phosphatase (ALP) wird so genannt, weil ihr Aktivitätsoptimum im alkalischen pH-Bereich liegt und bezeichnet genauer genommen mehrere Phosphatasen. An Proteinen können sie Phosphatreste von phosphoryliertem Serin, Threonin oder Tyrosin abspalten. Im Körper existieren mindestens drei verschiedene Isoformen. Bekannt sind bis heute die gewebsspezifische ALP des Intestinums und der Plazenta sowie eine unspezifische Form, die u.a. in Leber, Knochen und Niere nachweisbar ist (Weiss, Ray et al. 1989). Diese in Osteoblasten vorkommende 'tissue non-specific' ALP (TNAP) leitet den Verkalkungsprozess des Osteoids ein (Cowles et al 1998) und wird daher fortlaufend im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Als Homotetramer ist TNAP in der Plasmamembran u.a. von Osteoblasten verankert, wo sie bei einem hohen pH-Optimum verschiedene Monophosphatester hydrolysieren kann. Mutationen innerhalb des ALP-Gens bewirken beim Menschen das Erkrankungsbild einer Hypophosphatämie, bei dem es zu Verkalkungsstörungen des Knochens in unterschiedlichen Schweregraden kommt. Ursächlich dafür scheint eine Akkumulation von organischem Pyrophosphat zu sein, wodurch die Bildung von Hydroxylapatitkristallen und somit eine Verkalkung des Knochens verhindert wird (Whyte, Walkenhorst et al. 1996). Bei in vitro-Versuchen waren TNAP-defiziente Osteoblasten der Maus zwar in der Lage nodules, d.h. Zellhaufen zu bilden, allerdings kam es nicht zu einer Kalzifizierung im Sinne einer 'bonenodule -Bildung (Johnson, Hessle et al. 2000; Wennberg, Hessle et al. 2000).

Die Serum-Konzentration von Phosphat ist von der Nahrung, der intestinalen Absorption, der renalen Filtration und Reabsorption sowie von der Verteilung zwischen Intrazellulärraum und Knochenspeicher abhängig. Unter physiologischen Bedingungen wird die Phosphat-Konzentration im Normalbereich (zwischen 2,5 und 4,5 mg/dl) gehalten. Die wichtigsten bekannten Hormone, die die Phosphathomöostase aufrechterhalten, sind das Parathormon (PTH) aus den Nebenschilddrüsen und Kalzitriol. Sie regulieren den Phosphathaushalt über Steuerung von intestinaler Absorption und renaler Reabsorption bzw. Exkretion (Murer, Hernando et al. 2001). PTH hemmt direkt die Reabsorption von Phosphat in der Niere und fördert indirekt die intestinale Phosphat-Absorption über die Stimulierung der Kalzitriol-Synthese. Kalzitriol wiederum steigert die intestinale Absorption und renale Reabsorption von Phosphat. Die Niere stellt das wichtigste Regulationsorgan der Phosphathomöostase dar, wobei die Serum-Phosphatkonzentration über glomeruläre Filtration und vermehrte bzw. verminderte Reabsorption gesteuert wird (Stoff 1982).

1.3.1.3 Bone sialo Protein 2 (BSP-2)

Das *bone sialo protein* ist ein 70 kDa großes Sialinsäure-reiches Glykoprotein der extrazellulären Matrix, welches sowohl von Osteoblasten als auch Osteoklasten gebildet wird (Fisher, Whitson et al. 1983; Bianco, Fisher et al. 1991). Es trägt eine RGD Sequenz nahe des carboxyterminalen Endes (Oldberg, Franzen et al. 1988) und wird von Integrin $\alpha v\beta$ 3 (Oldberg, Franzen et al. 1988; Ross, Chappel et al. 1993) erkannt und scheint so in die Prozesse Zelladhäsion und Migration mit einzuwirken. BSP stellt 15% des nicht-kollagenen Anteils der mineralisierten Matrix (Fisher, Whitson et al. 1983). BSP bindet Kollagen (Fujisawa, Nodasaka et al. 1995) und ist somit in die frühe Phase der Knochenbildung involviert als spezifischer Nukleator für Hydroxylapatit (Bianco, Riminucci et al. 1993; Hunter and Goldberg 1993). Es produzieren nur diejenigen Osteoblasten BSP, die ebenfalls eine Kollagen Typ 1 Matrix sezernieren. BSP kann in glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells* (VSMC)) von Faktoren induziert werden, die eine osteoblastäre Differenzierung einleiten (Mori, Shioi et al. 1999); unter Normalbedingungen wird nur wenig oder kein BSP gebildet (Shanahan, Cary et al. 1999).

1.3.1.4 Kollagen 1 α 1 (Col1 α 1)

Kollagen ist das Hauptstrukturprotein der extrazellulären Matrix des Bindegewebes. Alle helikalen Domänen der Polypeptidketten der Kollagene besitzen ein Gly-X-Y Wiederholungsmotiv. Jeweils drei α-helikale, linkshändige Polypeptidketten falten sich zu einer rechtshändigen Tripelhelix. Die Kollagengenfamilie umfaßt derzeit 19 Kollagentypen mit 36 bekannten Genen, die über das gesamte Genom verteilt sind (Vuorio and de Crombrugghe 1990). Es handelt sich hierbei um eine Multigenfamilie, die durch ihre ausgeprägte Sequenzhomologie definiert ist.

Das Gen *COL1A1* für die α1-Kette des Kollagen Typ I ist 18 kb lang und liegt in der Chromosomenregion 17q21-q22. Die Länge der mRNA beträgt 6728 bp für *COL1A1*. Es gibt Nund C-terminale globuläre Abschnitte, die durch die Metalloproteasen Prokollagen-N-Proteinase und Prokollagen-C-Proteinase (die Schnittstellen befinden sich jeweils in Exon 6 bzw. 49) während des Reifungsprozesses extrazellulär abgetrennt werden (Prockop, Colige et al. 1993). Die globulären Propeptide sind für eine erhöhte Löslichkeit des Proteins unter physiologischen Bedingungen verantwortlich. Durch das Aminosäurenmotiv KGEAGPQGPRGSE (Positionen 174 bis 186 der Tripel-helix in *COL1A1*) wird die Decorin-Bindungsstelle vermittelt (Weber, Harrison et al. 1996). In Exon 27 gibt es ein Element, kodiert von den Aminosäuren DGEA, an welchem Integrin anbinden kann, das zwischen Aktin und *COL1A1* vermittelt (Nishiyama, McDonough et al. 1994). Diese funktionellen Abschnitte spielen wahrscheinlich bei bisher ungeklärten Kollagenopathien eine Rolle, bei denen der extrazelluläre Matrixzusammenhalt gestört ist.

1.3.1.5 Decorin

Decorin ist ein Proteoglykan mit Chondroitin- und Dermatansulfat-Glykosaminoglykanen und ist am Aufbau des Kollagennetzwerkes in menschlichen Arterien beteiligt (Stern, Shankar et al. 1991). Es gehört zu einer Proteinfamilie, die leucinreiche *repeats* trägt. Das *core* Protein hat ein Grösse von 36,5 kDa mit einer Glycosaminoglykankette am N-terminalen Ende. Es trägt zehn leucinreiche *repeats*, welche über Disulfidbindungen auf beiden Seiten stablilisiert werden. Es trägt zusätzliche über N- verknüpfte Glykosilierungsseiten innerhalb der leucinreichen *repeats* (Krusius and Ruoslahti 1986).





Einleitung

Die Glykosaminoglykankette als "Rückrad" setzt sich sich wiederholenden aus Disaccharideinheiten zusammen, bestehend aus N-Acetylgalactosamin und Glucuronsäure, welche häufig zur Iduronsäure durch Epimerisation am C5-Atom umgewandelt wird. Durch Seitenkettenverlängerung kommt es zur Sulfatierung, woraus Chondroitin- und Dermatansulfat Der Epimerisations- und Sulfatierungsgrad variiert je nach Gewebe (Cheng, entsteht. Heinegard et al. 1994). Decorin existiert ebenfalls auch ohne Glykosaminoglykansubstitution (Sampaio Lde, Bayliss et al. 1988; Fleischmajer, Fisher et al. 1991) oder mit mehreren Glykosaminoglykansubstituenten (Scott, Nakano et al. 1989). Es konnte gezeigt werden, dass Decorin über sein core-Protein mit Kollagen interagiert und die Kollagenogenese beeinflusst. Hierbei "dekoriert" es die 'd' und 'e' Banden der Kollagenoberfläche (Scott, Orford et al. 1981; Scott, Nakano et al. 1989). So entstand der Name Decorin (Krusius and Ruoslahti 1986). Als Folge der Interaktion mit fibrillärem Kollagen beeinflusst es den Fibrillendurchmesser und es resultieren dünnere Fibrillen. Hauptverantwortlich für diese Interaktion sind die leucinreichen repeats 4-5 des core Proteins (Svensson, Heinegard et al. 1995). Decorin interagiert sowohl mit Kollagen I, II, III und V (Bidanset, Guidry et al. 1992; Hedbom and Heinegard 1993; Whinna, Choi et al. 1993), mit Kollagen VI, XII und XIV (Bidanset, Guidry et al. 1992; Font, Aubert-Foucher et al. 1993; Font, Eichenberger et al. 1996) als auch mit Fibronectin, Thrombospondin, epidermal growth factor receptor (EGFR) und transforming growth factor-ß (TGF-ß) (Schmidt, Robenek et al. 1987; Winnemoller, Schon et al. 1992; Hildebrand, Romaris et al. 1994; lozzo, Moscatello et al. 1999). Daher vermutet man auch eine Funktion im Zellzyklus.

1.3.2 Inhibitoren

Gefäße produzieren normalerweise Mineralisationsinhibitoren wie z.B. Pyrophosphat (O'Neill 2006) und Matrix-GLA-Protein. Ein Mangel an diesen Inhibitoren führt zu spontaner vaskulärer Kalzifizierung und letztlich einer erhöhten Mortalität (Luo, Ducy et al. 1997; Rutsch, Ruf et al. 2003). Ein weiterer Inhibitor der Apatitbildung stellt Fetuin dar. Eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität wurde bei Hämodialysepatienten mit erniedrigtem Fetuinserumspiegel beobachtet (Ketteler, Bongartz et al. 2003).

<u>Einleitung</u>



PPi: anorganisches Pyrophosphat

Abbildung 3 Mechanismus der Kalziumhydroxylapatitbildung aus Adenosinmonophosphat (AMP) und anorganischem Pyrophosphat (PPi) durch die gewebsunspezifische alkalische Phosphatase (*tissue non-specific alkaline phosphatase* (TNAP))

1.3.2.1 Matrix GLA Protein (MGP)

Das Matrix GLA Protein (MGP) besitzt eine Größe von 14 kDa und kommt im Knorpel (Loeser, Carlson et al. 1992), in der Knochenmatrix (Hauschka, Lian et al. 1989) sowie der Arterienwand (Shanahan, Cary et al. 1994; Wallin, Cain et al. 1999) vor. In der Media wird MGP hauptsächlich von VSMC und in der Intima von Makrophagen, VSMC, sowie Endothelzellen exprimiert (Shanahan, Cary et al. 1994). MGP trägt 5 gamma-Carboxyglutaminsäurereste (Price, Fraser et al. 1987), welche Vitamin K als Kofaktor für dieses Enzym benutzt (Shearer 1995). MGP besitzt eine einzigartige Struktur unter den Vitamin K abhängigen Proteinen. Es trägt die Propeptidsequenz im ausgereiften Protein (Furie and Furie 1992). MGP knockout Mäuse weisen eine ausgeprägte Kalzifizierung auf (Luo, Ducy et al. 1997), was zeigt, dass MGP als Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung fungiert. Obgleich der genaue Mechanismus dieser Funktion noch nicht geklärt wurde, konnte gezeigt werden, dass MGP BMP-2 bindet (Wallin, Cain et al. 2000) und die osteoinduktiven Eigenschaften von BMP-2 blockiert (Bostrom, Tsao et al. 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass MGP in der Media von Diabetespatienten mit Mönckebergscher Sklerose viel niedriger exprimiert wird als im normalen Gefäß (Shanahan, Cary et al. 1999). Es existieren noch andere mögliche Mechanismen, wie MGP die Kalzifizierung hemmen könnte. Mit Antikörpern gegen MGP konnte gezeigt werden, dass MGP eine Ablagerung einer kalzifizierten Matrix an Perizyten in Kultur inhibierte. Diese Beobachtung unterstützte die These, dass MGP eine Differenzierung von Perizyten zu Zellen reguliert, die die

Fähigkeit zur Kalzifizierung aufweisen. (Canfield, Doherty et al. 2000). Es sind bisher zwei MGP Polymorphismen, A-7 und Ala 83, bei Patienten mit arterieller Kalzifizierung bekannt (Herrmann, Whatling et al. 2000). Ebenfalls wurden bisher zwei menschliche Syndrome von MGP Veränderungen postuliert: 1. das Singleton-Merten-Syndrom ist charakterisiert durch arterielle Kalzifizerung, eine kleine Statur, Osteopänie, eine geringe Muskelmasse sowie Tod innerhalb des ersten Lebensjahres (Gay and Kuhn 1976). 2. Das Keutelsyndrom ist charakterisiert durch eine abnorme Kalzifizierung des Knorpels, welche die Ohren, die Nase, den Kehlkopf, die Speiseröhre, sowie die Rippen einschliesst. Eine arterielle Kalzifizierung wurde hierbei jedoch noch nicht beobachtet (Cormode, Dawson et al. 1986). Auch hier wurden Mutationen im Matrix GLA Protein gefunden (Munroe, Olgunturk et al. 1999).

1.3.2.2 Osteoprotegerin (OPG)

Osteoprotegerin OPG ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Genfamilie, welcher als natürlicher Inhibitor der Aktivität des Osteoprotegerinliganden (OPG-L) fungiert (Hofbauer, Khosla et al. 2000). OPG-L, auch als osteoclast differentiation factor (ODF) bekannt, besitzt Homologie zu Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie. OPG-L kommt in zwei biologisch aktiven Formen vor: einer zellulären transmembranären Form, sowie einer löslichen Form, welche durch Proteolyse durch eine spezielle Metalloproteinase freigesetzt werden kann. Die Interaktion zwischen OPG-L und seinem Rezeptor RANK (receptor activator of NF-kB) reguliert eine Differenzierung, Aktivierung und Apoptose von Osteoklasten. Der Promotor des murinen OPG-L Gens trägt ein response element für Cbfa1, einem für die osteoblastäre Differenzierung essentiellem Transkriptionsfaktor. So konnte auch an Mäusen die Funktion von OPG, OPG-L sowie RANK näher aufgeklärt werden. Mäuse ohne OPG-L Gen haben keine Osteoklasten und entwickeln Osteosklerose (Kong, Yoshida et al. 1999). Transgene Mäuse, die OPG überexprimieren und RANK nicht besitzen, haben ebenfalls eine defekte Osteoklastogenese und zeigen einen osteosklerotischen Phänotyp. (Simonet, Lacey et al. 1997; Li, Sarosi et al. 2000). Im Gegensatz dazu trat bei Mäusen mit fehlendem OGP Gen eine stark ausgeprägte Osteoporose auf, was ein hohes Auftreten von Frakturen bewirkte. (Bucay, Sarosi et al. 1998).

1.3.3 Freisetzung von Nukleationskomplexen

Lebende Knochen werden laufend durch An- und Abbau kleiner Knochenpakete erneuert. Dieser Umbauprozess wird nach mechanischen Prinzipien über Regelkreise kontrolliert. Dadurch besitzen Knochen die Fähigkeit sich ändernden mechanischen Anforderungen anzupassen. Eine wachsende Anzahl von Untersuchungen weisst darauf hin, dass ein enger Zusammenhang zwischen Knochenumbauprozessen und vaskulärer Kalzifizierung besteht. Zunächst zeigten Mäuse, die kein Osteoprotegerin (OPG) besaßen, eine ausgeprägte Osteoporose sowie vaskuläre Kalzifizierung, was ein Hinweis darauf war, dass OPG und seine Regulatoren bei beiden Phänomenen eine Rolle spielen (Bucay, Sarosi et al. 1998). Es ist bekannt, dass OPG ein Inhibitor der Osteoklastogenese ist und receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) binden kann, und so den receptor activator of NFkB (RANK) blockiert (Aubin and Bonnelye 2000). Obgleich wenig über die Funktion von OPG in vaskulären Zellen bekannt ist, fanden Banks et al. (Banks, Lees et al. 1994) dass OPG und die Bisphosphonate Alendronat und Ibandronat eine arterielle Kalzifizierung bei Warfarin und Vitamin D behandelten Ratten inhibierten (Price, Faus et al. 2001; Price, June et al. 2001). Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass ein enger Zusammenhang zwischen vaskulärer Kalzifizierung und osteoklastärer Resorption besteht. Price et al. (Price, June et al. 2002) stellten die Theorie auf, dass eine Gefäßkalzifizierung durch das Vorhandensein von Kristallisationskeimen begünstigt wird, welche aus Gebieten mit Knochenresorption stammten. Diese würden dann über die Blutbahn einwandern und in die Gefäße gelangen und dort eine Gewebskalzifizierung auslösen. Tatsächlich konnten diese Autoren unter bestimmten Bedingungen nachweisen, dass ein Komplex bestehend aus Kalziumphosphat mit Fetuin und MGP aus Knochen freigesetzt wurde und im Blut nachgewiesen wurde. Weiterhin gelang es ihnen zu zeigen, dass die Freisetzung dieses Komplexes durch osteoklastäre Inhibitoren unterbunden werden kann (Price, Caputo et al. 2002). Diese Hypothese scheint auch bei der postmenopausalen Osteoporose mit vaskulärer Kalzifizierung eine Bedeutung zu spielen (Banks, Lees et al. 1994). Wie solche Nukleationskomplexe die Endothelbarriere durchdringen können ist jedoch bisher unbekannt. Interessant ist, dass Bisphosphonate bei postmenopausalen Frauen eine kardiovaskuläre Erkrankung unterbinden; gleichzeitig zeigten Studien, dass eine Hormonersatztherapie sich negativ auf das kardiovaskuläre Risiko auswirkt (Byington, Furberg et al. 2002).

1.3.4 Zelltod

Zelltod wird bereits seit langer Zeit als ein möglicher Nukleationsmechanismus für vaskuläre Kalzifizierung angesehen. Es ist bekannt, dass sterbende Zellen permeabel für Kalzium- und Phosphationen werden und diese jenseits des üblichen Löslichkeitsproduktes einlagern, so dass sich Nukleationskristalle bilden können. Gleichzeitig tragen Phospholipidmembranen Stellen für heterogene Nukleationen und ermöglichen so ein epitaktisches Wachstum von Kalziumphosphatkristallen (Schoen, Tsao et al. 1986). Matrixvesikel lassen sich, wie sie sowohl im Knochen als auch im Knorpel beobachtet werden, als Nukleationskeime in kalzifizierten, vaskulären Läsionen nachweisen und es konnte gezeigt werden, dass sie von sterbenden SMC stammten (Tanimura, McGregor et al. 1983). *Apoptotic bodies* aus SMC Kulturen akkumulieren Kalzium und, ähnlich Matrixvesikeln, liegt die innere Kalziummenge in gebundener kristalliner Form vor (Proudfoot, Skepper et al. 2000). Dies scheint zu bestätigen, dass *apoptotic bodies* aus Gefäßmuskelzellen als Initiations- und Nukleationskeime für Kalziumphosphatablagerungen fungieren.

1.4 Prostazyklin (PGI₂)

Prostazyklin (PGI₂) gehört zur Gruppe der Eikosanoide (Moncada, Gryglewski et al. 1976). Die Prostaglandinsynthese aus Arachidonsäure erfolgt sequentiell durch verschiedene Enzyme. Die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der Prostaglandinsynthese sind die Cyclooxygenasen, die in zwei Isoformen vorkommen (COX1 und COX2). COX1 ist konstitutiv exprimiert und reguliert in den meisten Geweben die Prostaglandinsynthese unter physiologischen Bedingungen. Die von COX1 synthetisierten Prostaglandine fördern u. a. die Bildung des Magenschleims und die Magendurchblutung und wirken magenprotektiv. PGI₂ und PGE₂ wirken vasodilatierend. PGI₂ ist ein starker Hemmstoff der Thrombozytenaggregation und –adhäsion. Aufgrund der voranstehend beschriebenen Wirkungen wird besonders PGI₂ als gefäßprotektiver und anti-atherosklerotischer Faktor angesehen. COX2 ist die induzierbare COX-Isoform und wird während der Atherosklerose durch zahlreiche Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren in Endothelzellen, VSMC und Makrophagen atherosklerotischer Läsionen induziert (Schönbeck et al., 1999). Die Aktivität von COX1 und COX2 wird durch nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs) wie z.B. Aspirin gehemmt. Ebenfalls wurden auch COX2-spezifische Inhibitoren, Etoricoxib, Roficoxib, Valdecoxib,Lumiracoxib entwickelt. PGI₂ wird überwiegend im Endothel und in VSMC von Blutgefäßen (Smith et al 1986) mittels der membranständigen Prostazyklin-Synthase (PGIS) (Pereira, Wu et al. 1994) aus Prostaglandin H₂ (PGH₂) synthetisiert. Die Wirkungen von PGI₂ umfassen die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation (Weiss and Turitto 1979), die Dilatierung glatter Gefäße (Moncada et al., 1976), sowie die Inhibierung der Proliferation und Migration von VSMC (Weber et al., 1998; Bulin et al., 2004). Die physiologischen Wirkungen von PGI₂ werden über den PGI₂-Rezeptor (IP-Rezeptor) vermittelt (Coleman et al., 1994), der auf Thrombozyten und VSMCs (Town et al., 1982) nachgewiesen werden konnte. Bei niedrigen, physiologischen PGI₂-Konzentrationen koppelt der IP-Rezeptor an stimulatorische G-Proteine (Gs), wodurch die Adenylatzyklase aktiviert und verstärkt intrazelluläres zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) generiert wird. Auf diese Weise kommt es zur Proteinkinase A (PKA) Aktivierung. Hohe PGI₂-Konzentrationen hingegen (Schrör and Verheggen, 1988) können über Gq-gekoppelte Proteine eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) vermitteln (Schwaner et al., 1992). PLC katalysiert durch Spaltung die Produktion von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). Anschließend aktiviert DAG die Proteinkinase C (PKC) und IP3 bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Ca2+-Konzentration.

PGE₂ vermittelt seine Effekte über vier, an verschiedene G-Proteine gekoppelte Rezeptoren (EP1, EP2, EP3, EP4).

PGE₂ besitzt wie PGI₂ vasodilatierende, anti-migratorische und –proliferative Eigenschaften (Wong et al., 2001) in VSMC. Zusätzlich ist PGE₂ in inflammatorische Prozesse involviert und fungiert als Schmerzmediator. Die Prostaglandin E-Synthase (PGES), die sowohl membranassoziiert als auch im Cytosol vorkommt (Ogorochi et al., 1987), katalysiert die Synthese von Prostaglandin H₂ zu PGE₂.

Das stabile PGI₂ Analogon Iloprost wird auf Grund seiner vasodilatatorischen Wirkung zur Therapie okklusiver Gefäßerkrankungen wie der Thrombangitis obliterans, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, bei der pulmonalen Hypertension sowie beim Raynaud-Syndrom eingesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte einerseits geklärt werden, welchen Einfluss Iloprost auf eine durch ß-Glycerolphosphat (ß-GP) induzierte Kalzifizierung in vitro hat; desweiteren wurde untersucht, welche funktionelle Bedeutung eine Stanniocalcin 1 Induktion durch Iloprost besitzt.



Abbildung 4 Strukturformel lloprost

1.5.1 Stanniocalcin 1 (Stc-1)

Ein weiteres Peptidhormon, welches in der Lage ist, den Kalziumhaushalt zu beeinflussen, ist das Stanniocalcin 1 (Stc-1). Es wurde zunächst an Knochenfischen entdeckt (Stern, Shankar et al. 1991), und konnte daraufhin in humanem Gewebe, nämlich der Niere, den Ovarien, der Prostata sowie der Schilddrüse nachgewiesen werden (Chang, Janosi et al. 1995). Versuche mit rekombinantem humanem Stc-1 haben gezeigt, dass Stc-1 bei Ratten und Schweinen den duodenalen Nettotransport von Kalziumionen verringert, aber den Phosphationentransport stimuliert (Madsen, Tavernini et al. 1998). Ein erhöhter Plasmagehalt an Kalzium induziert die Sekretion von Stanniocalcin 1, womit die Aufnahme von Kalzium vermindert wird (Wagner, Milliken et al. 1991). Bisher ist unbekannt, welcher Mechanismus der Wirkung von Stc-1 zugrunde liegt, und in welchem Maße der Ca²⁺-Transport beeinflusst wird. Wahrscheinlich ist, dass es altersbedingte Unterschiede gibt. Es ist bekannt, dass eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration ein primärer neurotoxischer Mechanismus bei Hirnschädigungen ist, der z.B. durch Ischämie hervorgerufen werden kann. Siesjo et al. zeigten in ischämischen Hirngeweben von Mensch und Ratte eine verstärkte Stanniocalcin 1 Expression (Siesjo and Bengtsson 1989; Kristian and Siesjo 1998). Stanniocalcin 1 schützt neuronale Zellen nach Hypoxie vor einem toxischen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. (Zhang, Lindsberg et al. 2000).

Die Induktion von Stc-1 wird daher als protektiver Schutzmechanismus bei Ischämie sowie oxidativem Stress angesehen. Meyer-Kirchrath et al. konnten zeigen, dass die Expression des Stanniocalcin 1 Precursors (Acc-Nr. 25997) in hSMC durch Stimulation mit lloprost (100 nM) stark induziert wird (Meyer-Kirchrath, Debey et al. 2004). In der vergleichenden Array-Analyse

ergab sich zur Kontrolle eine 24,8-fache bzw. 13,7-fache Induktion in zwei unabhängigen Versuchen. In der RT-PCR Analyse induzierte Iloprost eine zeitabhängige Induktion der relativen Precursor mRNA, mit einem Maximum zwischen 3 und 16 h. Nach 24-stündiger Stimulation kehrten die Stc-1 Precursor mRNA Expression wieder auf Basalwerte zurück. Es stellt sich die Frage, welche funktionelle Auswirkung eine Stanniocalcin Expression in glatten Gefäßmuskelzellen hat. Obgleich Chang et al. an Mäusen keine essentielle Bedeutung von Stc-1 für Wachstum und Entwicklung feststellen konnten (Chang, Cha et al. 2005), gibt es andere Untersuchungen, die einen Zusammenhang mit der Knochenetwicklung vermuten lassen (Jiang, Chang et al. 2000; Yoshiko, Aubin et al. 2002). Eine gesteigerte Stc-1 Expression whärend der frühen Ossifikation im verknöchernden Mesenchym junger Mäuse stellt einen Hinweis auf eine mögliche Funktion als Differenzierungsfaktor dar. Ebenfalls ist ein Zusammenhang zwischen Stc-1 und einer endothelialen Migration bekannt (Zlot, Ingle et al. 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst ein Stc-1 Einfluss auf die Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen untersucht und dann in folgenden Experimenten geklärt, ob Stc-1 die Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen beeinflusst.

1.5.2 Stanniocalcin 2 (Stc-2)

Stanniocalcin 2 (Stc-2) besitzt eine 73 %ige Homologie mit der Aminosäuresequenz von Stc-1 und ist um 45 Aminosäuren länger. Im Gegensatz zu Stc-1 ist die genaue Funktion von Stc-2 noch unklar. Die grosse Ähnlichkeit in der Primärsequenz lässt vermuten, dass Stc-2 eine ähnliche physiologische Bedeutung wie Stc-1 besitzt. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch keine Veränderung der Kalzium- und Phosphationenkonzentrationen transgener Stc-2 Mäuse (Gagliardi, Kuo et al. 2005). Interessanterweise zeigten sie eine Wachstumsretardierung; sie wiesen eine reduzierte Knochen- und Knorpelentwicklung auf.

Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Stanniocalcin hierbei eine physiologische Bedeutung nachkommt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Substanzen

| Substanz | Funktion | Hersteller / Quelle | eingesetzte Endkonzentration |
|-----------------------------------|------------------------------------|--|---------------------------------|
| Angiotensin 2 | AT ₁ +AT ₂ - | Sigma, Taufkirchen | 100 nM |
| | Rezeptoragonist | | |
| Forskolin | Adenylatzyklase- | Sigma-Aldrich, | 10 µM |
| | Aktivator | Deisenhofen | |
| lloprost | IP-Rezeptor-Agonist | llomedin® Infusionskonzentrat, Schering, Berlin | 100 nM |
| Interleukin 1-β | proinflammatorisches Zytokin | Promokine,Heidelberg | 10 ng/ml |
| PDGF-BB | Wachstumsfaktor | Sigma-Aldrich, Deisenhofen | 10 ng/ml |
| PGE ₂ | EP-Rezeptor-Agonist | Cayman Chemical | 100 nM |
| Phorbol-myristat- acetat (PMA) | PKC Aktivator | Alexis Biochemicals, Grünberg) | 10 nM |
| ß-Glycerolphosphat | Phosphatzusatz | Sigma-Aldrich, | |
| | Kalzifizierungsmedium | Deisenhofen | 10 mM |
| α -Thrombin | Serin-Protease | Dr. J. Stürzebecher, Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin, Jena | 10 U/ml |

2.1.2 Chemikalien und Kits

| 100 bp DNA Leiter | Biorad, München |
|---|--------------------------------------|
| Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung 40 % | Biorad, München |
| ALP assay kit | Wako Chemicals, Neuss |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Biorad, München |
| BD-Adeno-X TM expression system 2 | BD Biosciences Clontech |
| BD-Adeno-X TM LacZ Adenovirus | BD Biosciences Clontech |
| BD-Adeno-X TM rapid titer kit | BD Biosciences Clontech |
| BD-Adeno-X TM virus purification kit | BD Biosciences Clontech |
| BioArray <i>high yield RNA transcript labeling kit</i> (Enzo Kit ®) | Enzo Life Sciences, USA |
| Bradford protein assay kit | Biorad, München |
| Kalzium C-Test | Wako Chemicals, Germany |
| ECL western blotting detection reagent | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Milchpulver | Fluka, Ulm |
| NucleoBond® plasmid midi kit | BD Biosciences Clontech |
| Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) | Roth, Karlsruhe |
| Qiagen OneStep® RT-PCR kit | Qiagen, Hilden |
| RNeasy® <i>mini kit</i> | Qiagen, Hilden |
| Silbernitrat | Sigma, Deutschland |
| Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) | Molecular Probes, Göttingen |
| superscript double stranded cDNA synthesis kit | Gibco-Invitrogen, Karlsruhe |
| Thymidin, [Methyl- ³ H] | Perkin Elmer, USA |
| TITANIUM™ Taq PCR <i>kit</i> | BD Biosciences Clontech |
| Tri® Reagenz | Sigma, Deutschland |

2.1.3 Immunochemikalien

| Antikörper | Herkunft | Quelle/Referenz | kDa | Verdünnung |
|-----------------|----------|---------------------|-----|------------|
| humanes Decorin | rabbit | Larry Fischer, | 38 | 1/1000 |
| | | LF-136 | | |
| Stanniocalcin 1 | rabbit | Dr. Leif C. | 28 | 1/1000 |
| | | Andersson, Helsinki | | |
| Stanniocalcin 1 | goat | SantaCruz, | 28 | 1/200 |
| | | Heidelberg | | |

2.1.4 Zellkultur

| Substanz | Hersteller |
|--|-------------------------------|
| hCASMC | Promocell, Heidelberg |
| Trypsin/EDTA | Biochrom AG, Berlin |
| Penicillin(10.000IE)/Streptomycin(10.000µg/ml) | Gibco-Invitrogen, Karlsruhe |
| fötales Rinderserum (FBS) | Bio Whittaker / Cambrex |
| ElectroMAX™ DH10B™ Zellen | Invitrogen Cat. No. 18290-015 |

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

| "Falcon" Röhrchen (Polypropylenröhrchen), | Greiner, Solingen |
|---|--------------------------------------|
| 15ml / 50 ml | |
| Gel-Blotting-Papier | Schleicher & Schüll (Whatman®, GB) |
| Hyperfilm ECL | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Phase Lock Gels | Eppendorf, Hamburg |
| PVDF Membran | Millipore, Eschborn |
| Zellkulturgefäße | BD Biosciences, Heidelberg |

2.1.6 Puffer und Lösungen

Material und Methoden

| Amido-Schwarz-Entfärbelösung | 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure |
|--------------------------------------|--|
| Amido-Schwarz-Färbelösung 0,1% (m/v) | Amido-Schwarz, 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure |
| Blaumarker (10x) | 30% Glycerol, 0,04% Bromphenolblau |
| Blot-Puffer | 190 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol |
| Coomassie-Blau-Färbelösung 0,2% | Coomassie Brilliant-Blau, 40% Methanol, 10% Essigsäure |
| DEPC-Wasser | 0,1% (v/v) Diethyl-pyrocarbonat |
| Fragmentierungspuffer (5x) | 200 mM Tris-Acetat (pH 8,1), 500 mM K- Acetat, 150 mM Mg-Acetat |
| Hybridisierungspuffer (2x) | 200 mM MES, 2M (Na ⁺), 40 mM EDTA, 0,02% Tween 20 |
| Laemmli-Puffer (2x) | 125 mM NaHPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ -Puffer (pH 7,0), 100 mM DL-Dithiothreitol, 20% (v/v) Glycerin, 4% (m/v) SDS, 0,002% Bromphenolblau |
| Lauf-Puffer | 190 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% (m/v) SDS |
| PBS | 137 mM NaCl, 9,6 mM Na ₂ HPO ₄ , 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,4) |
| Sammelgelpuffer | 0,5 mM Tris/HCI (pH 6,8) |
| TBE-Puffer (10x) | 1 mM Tris, 83 mM Borsäure, 10 mM EDTA (pH 7,4) |
| TBS (10x) | 100 mM Tris/HCl, 1.5 mM NaCl (pH 7,4) |
| TBST | 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,1% Tween 20 |
| TBST-BSA | TBST, 5% (m/v) bovines Serumalbumin |

Material und Methoden

| TBST-M | TBST, 5% (m/v) Milchpulver |
|----------------|--|
| Trenngelpuffer | 1,5 mM Tris/HCI (pH 8,8) |
| Waschpuffer A | SSPE (6x), 0,01% Tween 20, 0,005% <i>antifoam</i> |
| Waschpuffer B | 100 mM MES, 0,1 M (Na⁺), 0,01% Tween 20 |

2.2 Geräte

| Migrationskammer: | AP 48 Chemotaxis chamber | Neuro Probe Inc., USA |
|-----------------------|--|-----------------------|
| Mikroskop: | Olympus BX 50 | Olympus, Hamburg |
| Proteinbestimmung: | ELISA-Reader Modell 550 | Bio-Rad, München |
| Gelauswertung: | GelDoc 1000 mit Quantity One ® Software | Bio-Rad, München |
| Array-Hybridisierung: | GeneChip® hybridization ofen | Affymetrix UK Ltd. |
| Sterile Werkbank: | Heraeus Laminair HLB 2448 GS | Heraeus, Hannover |
| Zentrifugen: | Centrifuge 5415 | Eppendorf, Hamburg |
| | Megafuge 10 | Heraeus, Hannover |
| RNA-Messung: | Genequant II DNA/RNA | Amersham Pharmacia |
| | <i>calculator</i> (1OD260=40µgRNA/ml) | |
| RT-PCR: | Trio Thermocycler | Biometra, Göttingen |

2.3 Zellkultur

Die Substanzen für die Nährmedien wurden von Gibco Life Technologies bezogen. Die Kulturgefäße , die 60 cm² Schalen, sowie die 6-Lochplatten wurden von der Firma Becton-Dickinson bezogen. Das FCS wurde von den Firmen Gibco Life Technologies und BioWhittaker verwendet.

2.3.1 Kultivierung menschlicher glatter Gefäßmuskelzellen

Glatte Gefäßmuskelzellen (SMCs) des Menschen wurden durch Explant-Technik aus der Arteria mammaria interna isoliert (Braun et al., 1997). Die Kultivierung erfolgte in DMEM mit 15 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 1,9 mM L-Glutamin, 9.6 mM Natrium-Pyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren bei 37 °C unter Begasung mit 5 % CO₂. Für die Weiterkultivierung wurden die Zellen nach erreichter Konfluenz mit Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,5 mM) passagiert. Für die einzelnen Versuche wurden in der Regel SMCs der Passage 3 - 10 (p3 – p10) verwendet. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Zellen vor den akuten Experimenten einmal mit PBS gewaschen und für 24 h in serumfreiem DMEM mit 100 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin inkubiert.

Experimente zur Funktion von Stc-1 wurden mit humanen Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien (*human coronary artery smooth muscle cells* (CA-SMC) der Firma Promocell durchgeführt. Als Kulturmedium diente das *smooth muscle cell growth medium* 2 (SMCGM 2) mit Supplementzusatz als Vollmedium, bzw. ohne Supplementzusatz als Hungermedium.

2.3.2 Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen

Glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) wurden 14 Tage lang in Vollmedium mit 10 mM ß-Glycerolphosphat (ß-GP) als Induktor der Kalzifizierung kultiviert. Mediumwechsel fand alle 3 Tage statt. Am Tag 14 wurde der Mediumüberstand vorsichtig entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und zu weiteren Experimenten verwendet. Es wurde mittels RT-PCR die Expression mineralisationsregulierender Gene untersucht sowie das Maß der Kalzifizierung mittels histologischem Nachweis durch von Kossa Färbung und biochemischer Kalziumbestimmung erfasst.

2.3.2.1 Histologischer Nachweis der Kalzifizierung

Kalzifizierte SMC wurden zunächst mit PBS gewaschen und 30 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Anschließend wurde der Methanol entfernt, mit einer 5 %igen Silbernitratlösung (250 µl /well) überschichtet und 10 min unter starker UV Exposition inkubiert. Extrazelluläre Kalziumapatitablagerungen färbten sich während dieser Zeit schwarz. Anschließend wurde überschüssiges Silbernitrat mittels Thiosulfat wieder entfernt.

2.3.2.2 Biochemische Kalziumbestimmung

Nach 14-tägiger Kalzifizierung wurden die Zellen dreimal mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend für 24 h mit 0,1 M HCl im Brutschrank entKalzifiziert. Das im HCl-Überstand gelöste extrazelluläre Kalzium wurde komplexometrisch mittels o-Kresolphthalein erfasst. (Kalzium C-Kit, Wako Chemicals, Neuss) und spektrometrisch gemessen. Mit dem mit PBS gewaschenen Zellrückstand wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die ermittelte Kalziummenge wurde auf die jeweilige Proteinmenge bezogen und normiert.

2.4 Biochemische Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Nach dreimaligem Waschen mit PBS auf Eis wurden die Zellen mit 100 µl Triton X-100 Puffer aufgeschlossen, zentrifugiert und die ALP-Aktivität im Zellüberstand mittels des ALP assay kit der Firma WAKO chemicals, Neuss gemessen. Mit den Zellpellets wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt und die jeweils ermittelte ALP Aktivität auf die Proteinkonzentration bezogen.

2.5 RT-PCR

RT-PCR Reaktionen wurden in einem TRIO-Thermo-Cycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die für die Amplifizierung der cDNA verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Für alle gezeigten RT-PCR-Experimente wurde ein One-Step ® RT-PCR kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Als interner Standard diente die Genexpression des Enzyms Glycerol-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Für jeden RT-PCR-Ansatz (Gesamtvolumen 25 μ l) wurden 250 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Zur Visualisierung wurden jeweils 11 μ l des RT-PCR-Ansatzes mit 1,5 μ l Blaumarker versetzt und in Ethidiumbromidhaltigen Agarose-Gelen (1,0 – 1,5 %) aufgetrennt (0,5 μ g/ml). Die densitometrische Auswertung der Intensitäten der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht-Bestrahlung mittels einer Geldoc® 2000-Apparatur und der Software Quantity One® (Bio-Rad, München). Für jede Probe wurde der Quotient aus den Intensitäten des zu untersuchenden Gens und des internen Standards GAPDH gebildet. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde jeweils ein Quotient als Referenzwert definiert (nicht-stimulierte Kontrolle = 1 bzw. Stimulation = 100%) und die Quotienten der weiteren Banden auf diesen Referenzwert bezogen (relative mRNA-Expression).

| | | Primer-Sequenz | Produkt |
|--------------------------------|-----------|--------------------------|---------|
| Gen | Abkürzung | - | (bp) |
| bone sialo protein 2 | BSP-2_dn | TCCATTGTCGTATTCATTGACG | 457 |
| | BSP-2_up | CAGGGTATACAGGGTTAGCTGC | |
| core binding factor α 1 | cbfa1_dn | GAGATTTGTGGGCCGGAGTG | 288 |
| | cbfa1_up | CCCCACGACAACCGCACCAT | |
| Kollagen 1α1 | Col1a1_dn | GGCTCCGGATGTTCTCGATCTG | 439 |
| | Col1a1_up | CAGGGCGACAGAGGCATAAAGG | |
| Decorin | Dec_dn | TCCGTAAGGGAAGGAGGAAG | 439 |
| | Dec_up | CCTTTGGTGAAGTTGGAACG | |
| E1a | E1a 3′ | GCCACAGGTCCTCATATAGCAAA | 219 |
| | É1a 5′ | GGGTCCGGTTTCTATGCCAA | |
| E1b | E1b3′ | CGTTCCCAGAAATGTAGCAACA | 236 |
| | E1b5′ | CCAGACACCGTCCTGAGTGTAT | |
| Matrix GLA Protein | MGP_dn | CCCTATTGAGCTCGTGGACAGG | 201 |
| | MGP_up | CTGATCCTTCTTGCCATCCTGG | |
| Osteoprotegerin | OPG_dn | TGCATTTCCTTTCTGAGTTAGC | 504 |
| | OPG_up | TCTGGACATCTCCATTAAGTGG | |
| TNAP | TNAP_dn | ACAATGCCCACAGATTTCCCAG | 415 |
| | TNAP_up | CCAAGTACTGGCGAGACCAAGC | |
| GAPDH 1 | GAPDH up | TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA | 250 |
| | GAPDH dn | TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT | |
| GAPDH 2 | GAPDH up | TCAAGGCTGAGAATGGGAAG | 100 |
| | GAPDH dn | TACTCAGCACCAGCATCACC | |
| Stanniocalcin 1 | Stc-1_up | AGGTGCTCCACTTTCCAAAG | 409 |
| | Stc-1_dn | ACCTCAGTGATGGCTTCAGG | |
| Stanniocalcin 2 | Stc-2_up | CCTGTCCCTGCAGAATACAGCG | 405 |
| | Stc-2_dn | CAGCAGCAAGTTCACGAGGTCC | |

Tabelle 1

2.6 Proteinanalyse

2.6.1 Western Blot-Verfahren

Für die Untersuchungen mittels Western Blot wurden subkonfluente Zellen einer 6-Loch-Platte nach einmaligem Waschen mit PBS durch Zugabe von 1 x Laemmli-Puffer lysiert. Das Zell-Lysat wurde mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturplatten gelöst, kurz im Eppendorf-Gefäß sonifiziert, und für 5 min bei 85 °C denaturiert. Bei dieser Hitzebehandlung kommt es zu einer reduktiven Spaltung vorhandener Disulfidbrücken, zur negativen Aufladung und zur Linearisierung der Proteine. Die Proben wurden zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert bzw. sofort verwendet.

2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine aus dem Zell-Lysat erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dazu wurde zwischen zwei Glasplatten zunächst übereinander ein 0,75 mm dickes Trenngel (10 % Acrylamid) und nach erfolgter Polymerisation ein Sammelgel (4 % Acrylamid) gegossen. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Kamm mit der benötigten Taschenanzahl (10 oder 15) eingebracht. Nach Befüllen der Taschen mit jeweils 10 – 15 µl Lysat erfolgte der Gel-Lauf bei 200 V für 40 min in einer Bio-Rad Mini PROTEAN 3 Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad, München). Als Molekulargewichtsmarker diente ein Biotin-konjugierter hochmolekularer Proteinstandard (New England Biolabs, Beverly, MA, USA).

2.6.3 Proteintransfer

Die im PAA-Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels einer *semi dry blotting* Apparatur (Bio-Rad, München) auf eine Methanol-benetzte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA, USA) transferiert. Der Transfer erfolgte mit Blotpuffer bei 15 V für 40 min.

2.6.4 Antikörper-Hybridisierung und Detektion

Zur Sättigung unspezifischer Bindungen wurden die Membranen unmittelbar nach dem Proteintransfer 1 Stunde in TBST-M prähybridisiert ("Blocken"). Zum immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine erfolgte anschließend die Hybridisierung mit

Primärantikörpern (1:500 – 1:2000 in 5 - 10 ml TBST-M) über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit TBST (je 15 min) erfolgte die Hybridisierung mit peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern (1:4000 in TBST-M oder TBST-BSA) für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen (TBST-M / 3 x 15 min) wurden die Proteine mit Hilfe des Lumi-Light® *western blotting* Substrates (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers detektiert. Bei dieser Methode wird das Substrat (Luminol) durch die peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper mittels H_2O_2 oxidiert und die entstehende Lichtemission (Chemilumineszenz) durch Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) visualisiert.

2.6.5 Prüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung

Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurden die PVDF-Membranen nach der Detektion mit Amido-Schwarz-Färbelösung für 10 min bei RT inkubiert und überschüssiger Farbstoff anschließend mit Amido-Schwarz-Entfärbelösung ausgewaschen. Nach Trocknung der Membranen wurden die Proteinbanden sichtbar und die gleichmäßige Beladung konnte überprüft werden.

2.6.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit Hilfe des Bio-Rad *protein assay dye reagent* (Bio-Rad, München) bestimmt. Als Standard diente eine Eichkurve, die mit BSA-Lösungen aufsteigender Konzentration (0 – 2.4 µg/ml) erstellt wurde. Die photometrische Bestimmung der Proben erfolgte 20 min nach Zugabe des Bradford-Reagenz in einer Mikrotiterplatte in einem ELISA-*reader* (Microplate Reader Model 550, Bio-Rad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Bestimmung der Proteinkonzentration fand Anwendung als Kontrolle zur Kalzifizierung.

2.7 Migrationsassay

Die Migrationsversuche fanden unter Verwendung von Polycarbonatfiltern der Porengröße 10 µm statt, die mit bovinem Kollagen Typ 1 beschichtet wurden. In den unteren Teil einer 48-Loch Mikro-Chemotaxis Kammer wurde Medium SMC-GM2 (ohne *supplement*, ohne FBS) sowie

Material und Methoden

Medium SMC-GM2 plus PDGF-BB (10ng/ml) oder HGF als chemotaktische Agenzien vorgelegt. Nach Platzierung der beschichteten Membran wurde die Kammer zusammengesetzt und der obere Teil der Kammer befüllt (20.000 Zellen/Loch=250.000 Zellen/cm²). Dazu wurden die Zellen zuvor kurz trypsiniert, gezählt und in *supplement*- und serum-freien Medium *smooth muscle growth medium 2* (SMC-GM2, Promocell) suspendiert. Jede Versuchsbedingung erfolgte innerhalb eines Experimentes 6-fach.

Die Migrationsdauer betrug 6 h. Anschließend wurde die Kammer demontiert, die dem oberen Kammerteil zugewandte Membranseite mehrmals mit PBS gespült und zur Entfernung nichtmigrierter Zellen mehrmals über eine Gummilamelle gezogen. Die durch die Membran migrierten Zellen wurden durch 1-minütiges Eintauchen der Membran in Methanol fixiert und anschließend 10 min unter Lichtschutz mittels Propidiumiodid (5 μ l/ml PBS) eingefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (15 min) wurde die Propidiumiodidfluoreszenz mit Hilfe des Phosphoimagers bei 580 nm erfasst.

2.8 Messung der DNA-Synthese

Die Proliferationsrate der Zellen wurde durch Messung der DNA-Synthese ermittelt. CASMC wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und für 72 h mit LacZ oder Stc-1 Viren inkubiert. Nach dreimaligem Mediumwechsel wurden die Zellen für 48 h in serumfreiem Medium synchronisiert und für 24 h mit [³H]-Thymidin (1µCi/ml) behandelt. Der radioaktive Überstand wurde verworfen, die Zellen anschließend zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 10%-iger Trichloressigsäure zur Fällung der DNA inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit eiskalter 10%-iger Trichloressigsäure erfolgte die DNA-Lyse in 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung (0,4ml/Loch) unter ständiger Bewegung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Jeweils 380 µl Lysat wurden mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und anschließend in einem Szintillationszähler vermessen. Jede Versuchsbedingung wurde als Vierfachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert daraus als n=1 betrachtet.

2.9 Statistische Analyse

Alle Daten sind, soweit nicht anders gekennzeichnet, repräsentativ für mindestens drei unabhängige Versuche mit ähnlichem Ergebnis. Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von *n* Einzelexperimenten angegeben. Das
Signifikanzniveau p für α wurde mit 0,05 festgelegt und Signifikanzunterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen wurden mittels *one-way analysis of variance* (ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni-Test überprüft. Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit der GraphPad Prism® Software (Version 4.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) oder Microsoft Excel[™] (Microsoft GmbH, Frankfurt). Messdaten für cbfa-1 entsprechen drei unabhängigen Versuchen. Hierbei wurden kalzifizierte Zellen als Kontrolle gewertet und die anderen Ergebnisse darauf bezogen. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt.

2.10 Genexpressions-Analyse

Für die quantitative Genexpressionsanalyse von hASMC wurde das GenChip® System von Affymetrix® (Affymetrix UK Ltd.) verwendet. Zur Anwendung kamen HG-U133A *arrays*. Sie repräsentieren ca. 20.000 Gene, deren Sequenzen in Form von Sequenzabschnitten (25mere) auf der Glasoberfläche des *arrays* fixiert sind. Diese DNA-Oligonukleotide dienen als Sonden (*probes*) und hybridisieren mit komplementären cRNA-Oligonukleotiden einer aufgearbeiteten, biotinylierten cRNA (*target*). Auf dem *array* befinden sich ebenfalls *expressed sequence tags*, d.h. DNA-Sequenzen, denen noch keine Funktion zugeordnet werden konnte. Einige der Gene sind mehrfach repräsentiert.

Die Arbeitsschritte der Array-Analyse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

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

In vitro Transkription – Synthese einsträngiger *antisense-cRNA* mittels T7 RNA-Polymerase mit der cDNA als Transkriptionsmatrize. Die Ribonukleotide UTP und CTP sind biotinyliert und ermöglichen so die spätere Detektion der DNA-RNA-Hybride.

Fragmentierung – Fragmentierung der langen cRNA-Ketten durch Hydrolyse in Nukleotide von 35-200 Basen: Erhöhung der *assay* Sensivität.

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

Färbung und Detektion (Scannen) – Färbung der Biotin-markierten Hybride mit Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat und Fluoreszenzanregung bei einer Wellenlänge von 488 nm mit dem Fluorophor Phycoerythrin. Detektion des emittierten Lichtes bei 570 nm. Die Intensität der Fluoreszenzemission ist proportional zur Menge gebundener cRNA an den jeweiligen Sonden auf dem *array*.

2.10.1 Puffer und Lösungen

| Antikörper-Lösung | 2 x Färbe-Puffer |
|--|--|
| 1 x Färbe-Puffer | 100 mM MES |
| 2 mg/ml acetyliertes BSA | 1 M NaCl |
| 0.1 mg/ml Goat IgG | 0.05 % Tween 20 |
| 3 g/ml Anti-Streptavidin-Antikörper | · |
| deionisiertes Wasser | |
| | |
| C v DNA Ensemblemente Duffer | C v DNA Francestianus na Duffan |
| 5 X RNA-Fragmentierungs-Putter | 5 X RNA-Fragmentierungs-Putter |
| 200 mM Tris-Acetat pH 8,1 | 200 mM Tris-Acetat pH 8,1 |
| 500 mM K-Acetat | 500 mM K-Acetat |
| 150 mM Mg-Acetat | 150 mM Mg-Acetat |
| | |
| SAPE-Lösung | 20 x SSPE |
| 1 x Färbe-Puffer | 2 M NaCl |
| 2 mg/ml acetyliertes BSA | 0,2 M NaH ₂ PO ₄ |
| 10 µg/ml Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) | 0,02 M EDTA |
| deionisiertes Wasser | |
| Waaah Buffar A (night stringant) | 2 x Hybridiciorungo Buffor |
| | 200 mM MES |
| 0.1.9 Twoon 20 | 200 IIIVI IVIES 1.77 M NoCL (2 M No ⁺) |
| U,UT % Tween 20 | 1,77 M NOU (2 M NA) |
| Wasch-Puffer B (stringent) | |
| | |
| | рн 0,5 – 0,7 |
| 0,01 % I ween 20 | |
| | |

Tabelle 2: Puffer und Lösungen der Genexpressionsanalyse

2.10.2 RNA – Isolierung

Gesamt-RNA wurde aus kultivierten SMCs nach der Trizol-Methode isoliert. (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe). Hierzu wurden die Zellen direkt nach Abnahme des Mediums in der Kulturschale durch Zugabe eines gebrauchsfertigen Phenol-Isothiozyanat-Gemisches (1 ml/10 cm², Trifast® Reagenz (peqLab Biotechnologie, Erlangen) oder TriReagent (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)) lysiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde das Lysat in autoklavierte Eppendorf-Gefäße überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt, ausgeschüttelt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13). Von dem wässrigen Überstand wurden 450 µl abgenommen und die darin gelöste RNA durch Zugabe von Isopropanol (450 µl) für mindestens 30 min bei 4 °C ausgefällt. Nach anschließender Zentrifugation für 30 min (13000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13) wurde das erhaltene RNA-Pellet in 200 µl DEPC Wasser gelöst und anschließend erneut durch Zugabe von steriler 5 M Kaliumacetat-Lösung (1/10 des Volumens) und absolutem Ethanol (doppeltes Volumen) prazipitiert. Nach erneuter Zentrifugation (20 min, 13000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13) wurde das RNA-Pellet an der Luft getrocknet, in DEPC-Wasser (20 – 30 ml) aufgenommen und anschließend im Schüttelinkubator unter kurzzeitiger Erwärmung (65 °C) 5 min gelöst. Die Proben wurden nach Zentrifugation entweder sofort quantifiziert oder bei -20 °C gelagert. Die Konzentration und Reinheit der präparierten RNA wurde durch Messung der Absorption einer 1:50-verdünnten Lösung bei 260 nm und 280 nm in einem Genequant II DNA/RNA calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt. Da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm und das von aromatischen Aminosäuren oder Phenol bei 280 nm liegt, bietet der Quotient aus beiden Absorptionswerten (Ratio 260/280 nm) eine gute Abschätzung der RNA-Reinheit und sollte zwischen 1.5 und 2 liegen. 1 OD_{260} = 40 µg/ml RNA.

2.10.3 Aufreinigung der RNA

Die RNA wurde mittels Säulen des RNeasy® *mini kit* nach den Vorgaben des Herstellers (Quiagen) aufgereinigt. Die Elutionsvolumina wurden so gewählt, dass die Endkonzentration (0,5 µg/µl) in der cDNA-Synthese eingesetzt werden konnte.

2.10.4 RNA – Qualitätskontrolle

Überprüfung Zur der Integrität der isolierten mRNA wurde eine denaturierende Gelelektrophorese in einem 1%-igen Agarose-Formaldehyd-Gel mit 1 х 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 erfolgte mit dem SuperScript[™] *kit* nach Anweisungen des *technical manual* von Affymetrix. 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)24-3'

Nach erfolgter Erststrang-Synthese wurde das Probenmaterial bei -20°C gelagert, die Komponenten der Zweitstrang-Synthese zugefügt 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.

2.10.6 Aufreinigung und Konzentrierung der cDNA

Mittels *Phase Lock* Gelen (PLG) wurde die Ausbildung einer stabilen Interphase zwischen wässriger und organischer Phase bei der Phenolextraktion gewährleistet. Die wässrige Phase mit der gelösten Probe lässt sich auf diese Weise ohne große Verluste entfernen. Der gesamte cDNA-Ansatz wurde mit 152 µl 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 (140 µl). Mit 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 zwei Waschschritten mit 80%igem Ethanol unterzogen, getrocknet und in 12 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

2.10.7 In-vitro Transkription (IVT)

Für die Übersetzung der cDNA in cRNA und die Markierung mit Biotin mit Hilfe des Enzo Kits ® wurde der gesamte cDNA-Ansatz (12 μl) eingesetzt. Die Komponenten des *kits* wurden laut Protokoll zugegeben, vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert (5 Sek.) und für 5 h bei 37°C (Heizblock) inkubiert. Alle 45 min wurde erneut kurz gemischt und die biotinylierte cRNA bei -20°C eingefroren.

2.10.8 Aufreinigung und Konzentrierung der biotinylierten cRNA

Das RNeasy® *mini kit* diente der Aufreinigung der cRNA. Hierzu wurden ca 20 µl cRNA 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 cDNA

Jeweils 20 µg cRNA wurden mit 8 µl 5 x Fragmentierungspuffer versetzt und mit 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

Zunächst wurden die *arrays* mit 1 x Hybridisierungspuffer befüllt und für 10 min bei 45°C im GeneChip® Hybridisierungsofen temperiert. Der Hybridisierungscocktail wurde zunächst für 5 min bei 99°C und weiteren 5 min bei 45°C inkubiert. 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 mit 250 µl Waschpuffer A ersetzt. Nach Platzierung der *arrays* in der *fluidics station* (Affymetrix) erfolgten, computergesteuert, 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

Anschließend wurden die arrays bei 570 nM im Agilent GeneArray® Scanner gescannt.

2.10.12 Qualitätskontrolle und Expressionsanalyse

Zunächst erfolgte die qualitative Beurteilung der vorangegangenen Schritte der cRNA-Synthese und Hybridisierung. Hierzu zählt die Auswertung der B2-Oligos positive als Hybridisierungskontrollen. Die cRNA-Qualität wird mittels Aktin und GAPDH, als interne Kontrollgene, abgeschätzt. Jedem Gen sind in der Regel 32 Zellen (probe cells) innerhalb eines probe sets zugeordnet; pro Zelle sind mehrere Millionen Kopien eines spezifischen Oligonukleotids aufgebracht. In 16 der Zellen entsprechen die Sonden vollständig einem bestimmten Bereich des jeweiligen Gentranskripts. So wird eine optimale Hybridisierung von Sonde und cRNA (perfect match, PM) ermöglicht. Die restlichen 16 Zellen enthalten Oligonukleotide, die einen homomerischen 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*).

2.11 Adenovirale Überexpression

Adenoviren sind nicht-behüllte Viren mit einer doppelstrangigen, linearen DNA als Genom. Der Grundkörper, auch Kapsid genannt, besteht aus Hexon- und Penton-Kapsomeren, an denen antennenförmige Fiberproteine verankert sind. Man unterscheidet mehr als 100 Serotypen. Ein typisches Adenovirus hat einen Durchmesser von 60 - 90 nm, Fibern und einen ikosaedrischen Aufbau.



Abbildung 5 Aufbau eines Adenovirus

2.11.1 Methodik

Für die adenovirale Genexpression wurde das Adeno-X[™] Expression System 2 verwendet.

Als Akzeptorvektor diente der pLP-Adeno-X-CMV Vektor mit ΔE1/ΔE3 replikationsdefizientem, adenoviralem Typ 5 (Ad5) Genom. (Mizuguchi & Kay, 1998, 1999; Adeno-X Expression System *user manual* [PT3414-1]). Anstatt einer *multiple cloning site* besitzt er loxP Sequenzen des Bakteriophagen P1 (Sauer, B., 1994).

Stc-1 wurde zunächst in den Donorvektor pDNR-CMV kloniert, dieser wurde mittels einer Cre/Lox-P sequenzspezifischen Rekombination mit dem Adeno-X Akzeptorvektor rekombiniert. Das Ergebnis dieser Reaktion war die ortsspezifische Klonierung von Stc-1 ins adenovirale Genom. Cre ist ein 38 kDa Rekombinaseprotein des Bakteriophagen P1. Es bewirkt die Rekombination zwischen sogenannten loxP Seiten (Sauer, 1994; Abremski et al., 1984). Diese

Seiten bestehen aus zwei 13 bp *inverted repeats*, die durch eine 8 bp *spacer* Region getrennt sind (Abb. 6).



Abbildung 6 Aufbau einer loxP Seite

Diese besitzt eine definierte Orientierung, wodurch das transferierte Gen in eine fixe Orientierung gebracht wird. Der Creator® Donorvektor besitzt zwei loxP Seiten, welche das 5'-Ende einer *multiple cloning side* (MCS) und das 5'Ende des *open reading frames* für das Chloramphenicol-Resistenzgen (Cmr) flankieren. Er besitzt außerdem das Ampicillin Gen zur Selektion in E. Coli, als auch das Sugrase Gen von B. subtilis (SacB) zur negativen Selektion nach erfolgter Cre/Lox Rekombination.



Abbildung 7 Donorvektor pDNR-CMV-Stc-1: Cm^r = Chloramphenicol-Resistenzgen, Amp^r = Ampecillin-Resistenzgen, *SacB* = Sugrase Gen von B. subtilis, $P_{CMV | E}$ (Abb. adaptiert an Adeno-X Expression System 2, *user manual*)

2.11.2 Umklonierung von Stc-1 in pDNR-CMV

Als Ausgangsvektor für Stc-1 diente der Vektor DKFZp686A1677Q2 pSPORT1-Sfi vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung Berlin). Stc-1 wurde mittels des Restriktionsenzyms HindIII ausgeschnitten und in den HindIII geschnittenen pDNR-CMV Vektor ligiert. Über Restriktionsananylse wurde ein Klon ausgewählt, der die korrekte Seitenorientierung aufwies. Dieser wurde in E. coli vervielfältigt und der Vektor durch Aufreinigung über Nucleobond AX Säulen isoliert.

2.11.3 Cre/Lox Rekombination von pDNR-CMV mit pLP-Adeno-X-CMV

Die Cre/Lox Rekombination des pDNR-CMV-Stc-1 Vektors mit dem adenoviralen Vektor fand nach folgendem Schema statt (Abb. 8):



Abbildung 8 Cre/Lox Rekombination des pDNR-CMV-Stc-1 Donorvektors mit pLP-Adeno-X-CMV (Abb. nach Adeno-X Expression System 2, *user manual*)

Der Reaktionsmix setzte sich aus folgendem Schema zusammen:

- 1 μl pDNR-CMV-Stc1 (0,3 μg/μl)
- 1 µl Cre Rekombinase
- 18 µl BD-Adeno-X LP Reaction Mix

Anschließend wurde 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert, für 5 min. auf 70°C zur Inaktivierung der Rekombinase erhitzt und der gesamte Versuchsansatz für weitere Versuche bei -20°C gelagert.

2.11.4 Transformation in E. coli

Eine Transformation in E.coli wurde mittels Elektroporation nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden 2 µl Cre-Rekombinase-Reaktionsmix à 40 µl elektrokompetente E.coli der Firma Invitrogen eingesetzt (ElectroMAX[™]DH10B[™] Cells Invitrogen Cat. No. 18290-015). Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium resuspendiert, 1 h bei 37°C inkubiert, 1 min. bei 6000 rpm zentrifugiert und in 100 µl SOC Medium resuspendiert.

2.11.5 Ausplattieren

Die jeweilige Kultur wurde auf 10 cm LB-Ampicillin/Chloramphenicol Platten mit 7% Sucrose ausplattiert und 30h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die jeweiligen Kolonien mittels Titanium [™] Taq PCR *kit* analysiert.

2.11.6 Mini-Präparation und PCR Kolonienscreening

Zunächst wurden mittels steriler Holzstäbchen zufällig ausgewählte 10 Kulturen "angepickt" und eine jeweils kleine Menge in 20 µl entmineralisiertes Wasser überführt. Durch kurzes Vortexen wurden die Kolonien resuspendiert und 10 µl davon in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol gegeben. Diese inkubierten weitere 6-8 Stunden unter vorsichtigem

Schütteln bei 37°C. Gleichzeitig wurden nun die jeweils restlichen 10 µl der Suspensionen mittels PCR analysiert. Der PCR Mix setzte sich wie folgt zusammen:

10 µl Wasser (PCR Reinheitsgrad)
10 µl E.coli Zellsuspension
2,5 µl 10x TITANIUM™ *Taq* PCR Buffer
1 µl Adeno-X LP Primer Mix
1 µl dNTP Mix (10 mM ea. of dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,5 µl 50X TITANIUM™ *Taq* DNA Polymerase

25 µl Gesamtvolumen

Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

95°C für 2 Min.

20 Zyklen:

94°C 15 Sek.

64°C 30 Sek.

68°C 30 Sek.

Das PCR Produkt wurde in 1,8%igen Agarose/Ethidiumbromidgelen aufgetrennt. Jeweils 5µl Aliquots PCR Mix wurden pro Tasche mit 2,5 µl 10x DNA Ladepuffer eingesetzt. 6 von 10 ´gepickten´ Klonen zeigten durch die doppelte Selektion die gewünschte Größe.

2.11.7 Aufreinung der rekombinanten adenoviralen DNA (MIDI-Präparation)

Es wurde nun ein positiver Klon für die weitere MIDI Präparation ausgewählt und 100 ml LB/Amp/Cm Medium mit der restlichen Kultur angeimpft. Diese Kultur wurde bis zur log-Phase bei 37°C kultiviert und anschließend eine Plasmid MIDI Präparation nach dem Nucleobond®

Protokoll (PT3167-1) durchgeführt. Zur Klärung des Bakterienlysates wurde die Filtermethode verwendet.

2.11.8 Restriktionsanalysen

1µg DNA wurde 3 h lang mit dem Enzym XhOI verdaut, auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und analysiert. Charakteristisch für pLP-Adeno-X-CMV sind Fragmente folgender Größe: 14,5, 8,0, 7,6, 2,5, 1,4 und 0,6 bp, wovon zwei je nach Insertgröße variieren. Die gefundenen Fragmente entsprachen den für eine erfolgreiche Klonierung gefundenen Größen.

2.11.9 Gewinnung rekombinanter Adenoviren in HEK 293 Zellen

Zur Gewinnung rekombinanter Adenoviren wurde die virale DNA mit Pac I verdaut und linearisiert. Auf diese Weise werden die *inverted terminal repeats* (ITRs), die das adenovirale Genom flankieren, nach außen gebracht (Abb. 8). Sie besitzen den Ursprung der adenoviralen DNA Replikation und müssen sich jeweils an den Enden des linearen DNA Moleküls befinden, um die korrekte Formation des Replikationskomplexes zu gewährleisten. (Tamanoi & Stillman, 1982). Anschließend wurden HEK 293 Zellen mit einer Zelldichte von 1-2x 106 Zellen / 60-mm Kulturschale ausgesät und mittels Lipofectin® laut Vorschrift des Herstellers transfiziert. Danach wurde alle 24 Stunden auf das Auftreten des cytopathischen Effektes überprüft. Bei ca. 80% des Effektes wurden drei aufeinander folgende *freeze-thaw* Zyklen durchgeführt. Diese bestanden zunächst aus einem Gefrierschritt mittels Trockeneis, dann einem Auftauschritt bei 37°C im Wasserbad und anschließendem Vortexen. Durch diesen Prozess wurde das Zellmaterial aufgespalten und die Viren freigesetzt. In der Folge wurde nun erneut eine größere Zahl an HEK Zellen mit Viren infiziert. Diese produzierten daraufhin Adenoviren, die kontinuierlich isoliert wurden und immer größere Mengen an HEK Zellen infizierten, bis eine gewünschte Menge an Adenoviren vorhanden war.

2.11.10 Virusaufreinigung

Zur Virenaufreinigung kam ein Cäsiumchlorid-Dichtestufengradient (Maniatis, et al. 1982) zur Anwendung. Hierbei wurde der Beckman *swing-out*-Rotor Typ *SW 40* verwendet, dessen Zentrifugenröhrchen ein Volumen von 12 ml haben. Die Gradienten wurden durch Unterschichten von 5 verschiedenen Dichtestufen (je 2 ml) einer Dichte von 1,45-1,35-1,30-1,25 und 1,20 g/ml gegossen. Die Cäsiumchloridlösungen waren mit 5 mM MgCl₂ versetzt und mit 40 mM Tris (HCl) bei pH 7,3 abgepuffert. Zentrifugiert wurde in einer Beckman - Ultrazentrifuge für 12 Stunden bei 67.000 g (20.000 U/min) und 4 °C. Die Banden wurden anschließend durch Punktieren mit einer Injektionsnadel abgezogen. Anschließend fand eine Dialyse für zweimal 4 h bei 4°C mit 4 I einer Lösung folgender Zusammensetzung statt: 3,16 Liter H₂O, 400 ml PBS, 40 ml 10 mM MgCl₂, 400 ml 87% Glycerol (Sigma), 40 ml of 50 M CaCl₂. Die Virenstocks wurden zur sofortigen Verwendung bei 4°C gelagert oder zur späteren Benutzung bei -80°C eingefroren.

2.11.11 Titerbestimmung

Zur Bestimmung des jeweiligen Virentiters wurden HEK 293 Zellen mit der Konzentration 5x10⁵ Zellen/ml pro Loch in eine 12-Loch-Platte ausgesät. Als Medium diente Vollmedium + 10% FBS und Antibiotikazusatz. Es wurden 10-fach Verdünnungen der Virenstocklösung von 10⁻² bis 10⁻⁶ angesetzt und anschließend jeweils 100 µl pro Loch hinzupipettiert. Jeder Ansatz wurde zweifach durchgeführt. Danach wurden die Zellen für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde vorsichtig 100% iger eiskalter Methanol zur Zellfixierung hinzugefügt und die Zellen für 10 min bei -20°C inkubiert. Der Methanol wurde abgesaugt, die Zellen dreimal mit je 1ml PBS + 1% BSA gewaschen, und 0,5 ml mouse Anti-Hexon Antikörper in der Verdünnung 1:1000 in PBS + 1% BSA pro Loch hinzugefügt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Antikörperlösung abgesaugt, die Zellen wieder erneut dreimal mit je 1ml PBS + 1% BSA gewaschen und dann HRP-konjugierter antimouse-Antikörper der Ratte in der Verdünnung 1:500 in PBS + 1% BSA dazugegeben und für 1 h bei 37 °C unter Schwenken inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 500 µl DAB Lösung zugefügt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DAB-Lösung entfernt, die Zellen mit 1 ml PBS/Loch überschichtet und die jeweiligen Färbungen mikroskopisch bei 20-facher Vergrößerung nach folgender Formel ausgewertet:

(infizierte Zellen/Feld) x (Felder/Loch)

PFU/ml = -

(Virusvolumen in ml) x (Verdünnungsfaktor)

Beispiel:

ausgezählte Felder: 10 durchschnittliche Anzahl infizierter Zellen: 10,3 Felder / Loch bei 20-facher Vergrößerung: 573 eingesetztes Virusvolumen: 0,1 ml Verdünnungsfaktor: 10⁻⁵

 $PFU/mI = \frac{10,3 \times 573}{0,1 \times 10^{-5}} = 5,9 \times 10^{9} PFU/mI$

2.11.12 multiplicity of infection (MOI)

Ausgehend von der Tatsache, dass ein Virus eine Transduktion bewirkt und somit eine *plaque forming unit* (PFU) bildet, entspricht 1 PFU/ml einer *infectious unit*/ml (IFU/ml). Die folgenden Versuche wurden mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 100 durchgeführt, d.h. eine Zelle wurde mit 100 Viren transduziert (z.B. 2x10⁵ Zellen/*well*, 2x10⁷ IFU/µI).

2.11.13 Test auf rekombinante Adenoviren (RCA-Test)

DNA wurde aus HEK Zellen, die die E1A- und E1B-Genregionen tragen, als Positivkontrolle mittels eines Qiagenkits isoliert. 10 µl Virenstock wurden mit 10 µl Proteinase K (Qiagen) für 1h

bei 37°C inkubiert (Kapsidverdau). Anschließend wurde das Enzym für 20 min. bei 95°C inaktiviert und eine PCR laut folgendem Schema durchgeführt (DelloRusso, Scott et al. 2002):

30 Zyklen:

95°C 30 Sek. 55°C 30 Sek. 72°C 1 Min.

72°C 10 Min.

Nur bei der Positivkontrolle traten folgende Banden auf: E1A 219 bp, E1B 236 bp. Den Viren fehlte diese Information zur Rekombination. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der DNA-Präparation aus Viren eine PCR auf Stc-1 durchgeführt, welche positiv ausfiel.

3 Ergebnisse

Im ersten Teil werden die Effekte des stabilen PGI₂-Analogon Iloprost auf die Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen beschrieben. Hiervon ausgehend wurde nach Genen gesucht, die durch Iloprost induziert werden und im Kalziumhaushalt eine Rolle spielen. Die Funktion zweier Kandidaten, Decorin und Stanniocalcin 1, wird näher untersucht. Es folgen die Auswirkung einer adenoviralen Stanniocalcin 1 Expression auf die Ergebnisse funktioneller Experimente zur Kalzifizierung, Proliferation und Migration.

3.1 Untersuchungen zur Kalzifizierung

3.1.1 Biochemische Kalziumbestimmung

Mittels ß-Glycerolphosphat wurde die Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen über 14 Tage induziert. Wie in Abbildung 9 dargestellt, konnte lloprost die Kalzifizierung um ca. 30% hemmen (n=10). Forskolin zeigte einen signifikanten Anstieg der extrazellulär messbaren Kalziumionenmenge, PGE₂ hingegen zeigte keine Hemmung gegenüber der ß-GP Kontrolle (Abb.11).



Abbildung 9 Kalzifizierung durch ß-GP (10 mM); Iloproststimulation (100 nM) an Tag 1, 3, 6, 9, 12 (t=14d, n=10, Mittelwert +- SEM: *, p < 0,05 ßGP vs. ßGP+Ilo)

3.1.2 Histologischer Nachweis der Kalzifizierung

Die Verringerung der ß-GP induzierten Kalzifizierung durch Iloprost (100 nM) wurde morphologisch erfasst. Nach 14-tägiger Kalzifizierung konnten extrazellulär gebildete Kalziumhydroxyapatitkristalle durch von Kossa Färbung mittels Silbernitratlösung sichtbar gemacht werden. Die vergleichende Analyse mit Iloprost zeigte einen feineren und stellenweise geringeren Kristallisationsgrad. Folgende Abbildungen stellen jeweils nur einen kleinen Ausschnitt der kalzifizierten Zellen dar (Abb. 10).



Kontrolle

+BGP

+BGP/+llo

Abbildung 10 histologischer Nachweis der Kalzifizierung mittels von Kossa Färbung, 40-fache Vergrößerung



Abbildung 11 Kalzifizierung unter dem Einfluss von Forskolin (10 μ M) und PGE₂ (100 nM) (t=14d, n=3, Mittelwert ± SEM: *, p < 0,05)

3.1.3 Analyse von Kalzifizierungsmarkern

Nachfolgend wurden anhand von RT-PCR, Westernblot und Aktivitätsbestimmung Faktoren untersucht, die im Zusammenhang mit der Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen eine Rolle spielen. Es wurden jeweils die Expressionen bzw. Aktivitäten nach 14-tägiger Kalzifizierung mit und ohne lloprosteinfluss untersucht.

3.1.3.1 cbfa-1

Gefäßmuskelzellen unterlaufen eine phänotypische Veränderung während einer durch ß-Glycerolphosphat induzierten Kalzifizierung (Steitz, Speer et al. 2001). Cbfa-1 spielt hierbei als osteoblastärer Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle. Eine Expressionsinduktion wird mit einer Änderung zum osteoblastären Phänotypen gleichgesetzt. Nach 14-tägiger Kalzifizierung mit 10 mM ß-GP kam es zu einer signifikanten Induktion von cbfa-1. Iloprost hemmte die cbfa-1 Expression signifikant um den Faktor 0,5 (Abb. 12).





3.1.3.2 Gewebsunspezifische alkalische Phosphatase (TNAP)

Als osteoblastäre Marker werden die Proteine bezeichnet, die den osteoblastären Phänotyp kennzeichnen. Hierzu zählt u.a. die gewebsunspezifische alkalische Phosphatase (TNAP) als knochenspezifisches Protein, als auch das bereits beschriebene Typ I Kollagen (Yoon, Golub et al. 1989). Die alkalische Phosphatase lässt sich bereits früh in der Plasmamembran der Osteoblasten nachweisen (Lynch, Stein et al. 1995). Sie katalysiert den Prozess der Matrixkalzifizierung. TNAP gilt als klassischer Marker der osteoblastären Kaskade (Bianco, Riminucci et al. 1993) bzw. als Marker der Knochenneubildung (Farley and Baylink 1986). Der Nachweis von TNAP wird häufig mit dem osteogenen Potential von Zellen gleichgesetzt (Pittenger et al. 1999; Halvorsen et al. 2001; Kuznetsov et al. 2001). An kalzifizierten Muskelzellen konnte ebenfalls eine erhöhte TNAP mRNA-Expression als auch Aktivität festgestellt werden (Bianco, Riminucci et al. 1993).

Unter Kalzifizierungsbedingungen wurde sowohl ein signifikanter mRNA-Expressionsanstieg als auch eine erhöhte TNAP Aktivität beobachtet. Unter Iloprost kam es zu einer signifikanten Hemmung beider Effekte (Abb. 13, 14).



Abbildung 13 TNAP mRNA Expression nach 10-tägiger Kalzifizierung (n=3, Mittelwert ± SEM: *, p < 0,05 ßGP vs. ßGP+llo)



Abbildung 14 Aktivität der gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase nach 7-tägiger Kalzifizierung in *units* x 10^{-3} /mg Protein (n=3, Mittelwert ± SEM: *, p < 0,05 ßGP vs. ßGP+IIo)

3.1.3.3 Bone Sialo Protein 2 (BSP-2)

Das *bone sialo protein* 2 (BSP-2) ist mit eines der bedeutendsten nicht-kollagenen Glykoproteine der extrazellulären Matrix, welches hauptsächlich bei der Biomineralisation freigesetzt wird. Es trägt ein RGD Motiv, welches auch andere Adhäsionsmoleküle tragen und interagiert mit Zellintegrinen. An Knochen konnte gezeigt werden, dass es das Anheften von Osteoblasten und Osteoklasten via $\alpha_v \beta_3$ Integrinrezeptoren vermittelt. Liganden für $\alpha_v \beta_3$ Integrine spielen eine zentrale Rolle bei der Angiogenese. In vitro Studien konnten ebenfalls zeigen, dass BSP wahrscheinlich eine Bedeutung bei der Initiation oder dem Wachstum von Kalziumapatitkristallen spielt. Dabei ist sowohl das Vorhandensein von Kollagen, als auch von BSP von Bedeutung (Wang, Zhou et al. 2006). Wie in vorangegangenen Versuchen wurde an glatten Gefäßmuskelzellen durch 14-tägige ß-GP Zugabe eine Kalzifizierung induziert und anschließend die BSP-2 mRNA-Expression mittels RT-PCR bestimmt. Hierbei zeigte sich keine Veränderung des Expressionsmusters (Abb. 15).





3.1.3.4 Kollagen 1α1 (Col 1α1)

Das Kollagen $1\alpha 1$ Gen (COL $1\alpha 1$) kodiert die Alpha-1-Kette des Typ-I-Kollagen, dem Hauptprotein der Knochenmatrix. Ein Polymorphismus in einer Sp1-Bindungsstelle im 1. Intron des COL $1\alpha 1$ -Gens hat sich in mehreren unabhängigen Populationen als Determinante der Knochendichte erwiesen. Weitere Studien zeigen, dass dieser Polymorphismus bei Männern und postmenopausalen Frauen auftrat, die gleichermaßen unter Frakturen litten. Der COL $1\alpha 1$ -Sp1-Polymorphismus scheint über ein Missverhältnis der Bildung der Alpha-1- zu Alpha-2-Kollagenuntereinheiten in die Regulation der Kollagenbildung einzugreifen und zu einer verminderten Knochenqualität zu führen.

Die Versuche zeigten keinen Einfluss auf die Expression von Kollagen $1\alpha 1$ (Abb. 16).



Abbildung 16 Kollagen 1α 1 Expression nach 14-tägiger Kalzifizierung (n=3, Mittelwert ± SEM)

3.1.3.5 Decorin

Decorin ist kolokalisiert mit Kollagen, unterstützt den Aufbau von Kollagenfasern und reguliert die Wachstumsfaktorenaktivität und das Zellwachstum. VSMCs in Kultur exprimieren geringe Decorinmengen (Severson, Ingram et al. 1995; Tao, Smart et al. 1997), und in menschlichen nicht-atherosklerotischen Arterien lässt sich Decorin durch Färbung nur in der Adventitia nachweisen. In atherosklerotischen Arterien lässt sich Decorin hauptsächlich in der Intima nachweisen nahe der Media und nur gering im subendothelialen Teil der Intima (Sartipy, Johansen et al. 2000) sowie nahe des makrophagenreichen *lipid core* (Evanko, Raines et al. 1998). Obgleich seine Rolle bisher noch unbekannt ist, vermuteten Hoshi et al., dass Decorin ein Kalzifizierungsinhibitor im Knochen ist, da eine primäre Kalzifizierung der Knochenmatrix bereits nach Entfernung der Kollagenfibrillen erfolgt (Hoshi, Kemmotsu et al. 1999).

Bekannt ist, dass Decorin *in vivo* besonders im Osteoid nachgewiesen werden kann, dass der Nachweis mit Ausreifung der Knochenmatrix allerdings schwächer wird (Blumberg et al. 1997). Entsprechend bewirkt eine Decorindefizienz bei Mäusen keine auffälligen Veränderungen im Knochen, wohl aber im kollagenen Bindegewebe. Dort kommt es zu Veränderungen im Sinne des Erkrankungsbildes eines Ehlers-Danlos-Syndroms, wofür insbesondere die Interaktionen von Decorin mit verschiedenen Kollagentypen verantwortlich gemacht werden (Corsi et al. 2002). Typische Symptome beim Ehlers-Danlos-Syndrom sind die Hyperelastizität und die

Ergebnisse

ungewöhnliche Zerreißbarkeit der Haut. Die Gelenke sind überstreckbar; nach leichten Verletzungen bleiben fischmaulartige Narben zurück.

Fischer et al. konnten zeigen, dass Decorin eine SMC Kalzifizierung induziert und in atherosklerotischen Plaques auftritt. Wahrscheinlich trägt es die Eigenschaft eines Promoters für eine Intimakalzifizierung. Die Bindungsfähigkeit von Kollagen für LDL-Cholesterin ist unter Gegenwart von Decorin stark erhöht (Kovanen and Pentikainen 1999), ein Befund der große Bedeutung im Hinblick auf die Effekte oxidierter Lipide auf die Arterienwand haben könnte.

Es sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, ob eine Decorinexpression durch Iloprost beeinflusst wird. Zunächst konnte gezeigt werden, dass Iloprost eine Induktion der Decorin mRNA Expression nach 14-tägiger Kalzifizierung hemmt (Abb.19). Desweiteren bestätigte sich dieser Befund ebenfalls auf Proteinebene (Abb.20). Eine 14-tägige Kalzifizierung unter Decorinzugabe ergab eine signifikante Zunahme der Kalzifizierung im Vergleich zu einer Hemmung unter Iloprost (Abb. 21).



Abbildung 17 Decorin RNA-Expression nach 14-tägiger Kalzifizierung und Iloprost (100nM) (n=6, Mittelwert ± SEM: *, p < 0,05 ßGP vs. ßGP+Ilo)



Abbildung 18 Decorin Protein-Expression unter Kalzifizierung und Iloprost (100nM, t=14d)



Abbildung 19 Kalzifizierung unter Iloprost (100 nM) und Decorin (t=14d, n=3, Mittelwert ± SEM: *, p < 0,05 ßGP+Ilo vs. +ßGP+Ilo+Dec)

3.1.4.1 Matrix GLA Protein (MGP)

Matrix GLA Protein stellt einen Inhibitor der Kalzifizierung dar. Es ist bekannt, dass die MGP Expression in kalzifizierten Arterien erhöht ist. In vivo Studien zeigten, dass es die Expression von cbfa-1 stimuliert und die Expression von α-Aktin in glatten Gefäßmuskelzellen hemmt. In vitro Studien ergaben, dass der MGP-Effekt über *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) vermittelt wird. MGP ist in der Lage sowohl eine Kalzifizierung zu inhibieren, als auch zu unterstützen. Dies hängt von der jeweiligen Höhe der Expression von BMP-2 im Vergleich zu MGP ab. Ist der BMP-2 Level hoch, inhibiert MGP, ist er niedrig, stimuliert MGP die Kalzifizierung. (Zebboudj, Shin et al. 2003).

Unter Kalzifizierung mit ß-GP kam es zu einem signifikanten Anstieg der MGP Expression um den Faktor 2. Dies ging einher mit einer zu beobachtenden Kalziumapatitablagerung. Iloprost zeigte keinen merklichen Effekt (Abb. 16).





3.1.4.2 Osteoprotegerin (OPG)

Neben verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren des Knochens, wie z.B. bone morphogenetic proteins (BMP) oder transforming growth factors (TGF), gehört auch Osteoprotegerin (OPG) zu der Gruppe von Signalmolekülen, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen. Im Gegensatz zu anderen Signalmolekülen beeinflusst das Fehlen von OPG hauptsächlich den Knochenstoffwechsel, jedoch kaum die restliche Organentwicklung. Zwar bilden OPG-defiziente Mäuse ein Skelett aus, aber es entwickelt sich sehr früh eine schwere Form der Osteoporose (Mizuno, Amizuka et al. 1998). Osteoprotegerin verhindert durch kompetitive Bindung des receptor activator of NFkappa B Ligand (RANKL) eine Aktivierung von RANK auf Osteoklasten. Dadurch hemmt OPG die osteoklastäre Differenzierung sowie die Aktivierung der Osteoklasten und beeinflusst seinem Namen entsprechend den Knochenstoffwechsel zu Gunsten des Knochenaufbaus (Aubin and Bonnelye 2000). Zusätzlich ist die OPG-Expression auch sehr stark parakrinen Effekten unterworfen (Hofbauer, Khosla et al. 2000). Nach 14-tägiger Kalzifizierung zeigte sich an drei unabhängigen Versuchen keine Induktion oder Hemmung der OPG RNA-Expression (Abb. 17).





3.1.5 Untersuchungen zu Stanniocalcin 1

3.1.5.1 Zeitabhängigkeit der Regulation von Stc-1 durch lloprost

Debey et al. konnten zeigen, dass lloprost (100 nM) Stc-1 mit einer Induktion von + 18,8 \pm 2,7, n=3 in SMC induziert. Die Behandlung der SMC mit lloprost (100nM) über einen Zeitraum von 24 Stunden führte zu einer maximalen Induktion nach 6 h. Nach 24 h hatte die Stc-1 Expression wieder das Ausgangsniveau erlangt (Abb.22).



Abbildung 22 zeitabhängige Induktion von Stc-1 durch lloprost (100 nM) (n=3, Mittelwert \pm SEM: *, p < 0,05 0 vs. 6h)

3.1.5.2 Konzentrationsabhängigkeit der Stc-1 Induktion durch lloprost

Die Zellen wurden mit 1, 10 und 100 nM lloprost für 6 h stimuliert und die Menge gebildeter Stc-1 mRNA mittels RT-PCR untersucht. Die quantitative Auswertung von 3 Versuchen ergab bei einer lloprost-Konzentration von 100 nM eine signifikante Induktion der Stc-1 Expression im Vergleich zur Kontrolle. Ein nur geringer Effekt zeigte sich bei einer Stimulation mit 1 und 10 nM lloprost (Abb. 23).



Abbildung 23 konzentrationsabhängige Induktion von Stc-1 durch Iloprost nach 6-stündiger Stimulation (n=3, Mittelwert ± SEM: *, p < 0,05 0 vs. 100 nM Iloprost)

3.1.6 Untersuchungen zu Stanniocalcin 2

3.1.6.1 Zeitabhängigkeit der Regulation von Stc-2 durch lloprost

Anhand weiterer Versuche sollte der Iloprost Einfluss auf die Stanniocalcin 2 Freisetzung untersucht werden. Hierzu erfolgte die Behandlung der Zellen über einen Zeitraum von 24 h mit Iloprost (100 nM). Im Gegensatz zur Stc-1 Induktion zeigte sich kein signifikanter Effekt auf die

Ergebnisse

Stc-2 Expression nach maximal 6 h. Nach weiteren 24 h stieg die Stc-2 Expression auf etwas mehr als das Ausgangsniveau an (Abb. 24).



Abbildung 24 Zeitabhängigkeit der Stc-2 Expression durch Iloprost (100 nM) (n=3, Mittelwert ± SEM)

3.1.6.2 Konzentrationsabhängigkeit der Stc-2 Expression durch lloprost

In 3 Versuchen wurden Zellen mit 1, 10 und 100 nM lloprost für 6 h stimuliert und die Menge gebildeter Stc-1 mRNA mittels RT-PCR untersucht. Die quantitative Auswertung ergab ab einer lloprost-Konzentration von 1 nM eine geringe Hemmung der Stc-1 Expression. Dieser Effekt konnte durch eine Steigerung der lloprost-Konzentration auf 10 und 100 nM nicht merklich vergrößert werden (Abb. 25).



Abbildung 25 Konzentrationsabhängigkeit der Stc-2 Expression durch lloprost (t=6 h, n=3, Mittelwert \pm SEM: *, p < 0,05 vs. ßGP+llo)

3.1.7 Regulation von Stc-1 durch PGE₂

Mittels RT-PCR wurde untersucht, ob auch PGE₂ eine Veränderung der Stc-1 Expression hervorruft. PGE₂ gilt als Agonist aller 4 EP-Rezeptoren, die sich hinsichtlich ihrer Signaltransduktion unterscheiden. EP₁, EP₂ und EP₄ üben stimulatorische Effekte aus. Der EP₁-Rezeptor agiert über G_q-Proteine und aktiviert die Phospholipase C; EP₂ und EP₄ agieren über G_s-Proteine, die die Adenylatzyklase aktivieren und zur cAMP Freisetzung führen. Der EP₃ Rezeptor ist G_i-gekoppelt, verringert die cAMP Freisetzung und übt eine inhibitorische Funktion aus. Zur Untersuchung des PGE₂ Effektes wurden Zellen 6 h mit 100 nM PGE₂ bzw. 100 nM Iloprost stimuliert. Nach 6 h kam es durch PGE₂ zu einer Induktion der Stc-1 Expression auf das zweifache Niveau im Vergleich zur Kontrolle. Eine Iloproststimulation bewirkte einen Expressionsanstieg um den Faktor 3 (Abb. 26).



Abbildung 26 Stc-1 Induktionsvergleich Iloprost/PGE₂ (n=3, Mittelwert ± SEM: *, p < 0,05 vs. Iloprost)

3.2 Untersuchung des Einflusses von Stc-1 auf die Kalzifizierung

Im Folgenden sollte untersucht werden welchen Einfluss eine adenovirale Stc-1 Expression auf das Kalzifizierungsverhalten glatter Gefäßmuskelzellen hat.

3.2.1 Stc-1 Induktion nach 14-tägiger Kalzifizierung

Mittels RT-PCR wurde die Stc-1 Expression nach 14-tägiger Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen mit ß-GP in An- und Abwesenheit von Iloprost erfasst. An den Tagen 1, 3, 6, 9 und 12 fanden ein Mediumwechsel und eine Stimulation mit 100 nM Iloprost statt. Im Vergleich zu ßGP war eine schwache Induktion der Stc-1 Expression durch Iloprost nach 14 Tagen nachweisbar. (Abb. 27).

Ergebnisse



control ßGP ßGP/llo

Abbildung 27 Stc-1 Expression nach 14-tägiger Kalzifizierung unter Ilprost (100 nM)

3.2.2 Stc-1 Einfluss auf eine 14-tägige Kalzifizierung

In drei voneinander unabhängigen Versuchen wurden Zellen sowohl mit Ad-LacZ als auch Ad-Stc1 Viren transduziert und über 14 Tage durch ß-GP (10mM) kalzifiziert. Nach 14 Tagen wurde die gebildete Kalziumionenmenge komplexometrisch mittels o-Cresolphthalein erfasst und gegen die jeweilige Proteinmenge normiert. Die mit LacZ Viren transduzierten Zellen kalzifizierten unter ßGP um den Faktor 5,6 und Iloprost inhibierte diesen Effekt auf 4,8. Zellen, die mit Stc-1 Viren transduziert wurden, wiesen eine etwas geringere Kalzifizierung auf (4,5facher Ca²⁺-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle). Iloprost verringerte die Kalzifizierung auf 3,8. Vergleicht man die beiden Induktionen mit ßGP untereinander, so zeigt sich, dass Stc-1 – wenn auch gering – die Kalzifizierung inhibiert (Abb.28).



Abbildung 28 Kalzifizierung unter LacZ, Stc-1 (n=3, Mittelwert ± SEM), MOI 100

3.3 Stanniocalcin 1 Einfluss auf die Proliferation glatter Gefässmuskelzellen

lloprost hemmt die Proliferation kultivierter, glatter Gefäßmuskelzellen (Uehara, Ishimitsu et al. 1988; Takizawa, Kawahata et al. 1999). Zur Untersuchung der proliferationshemmenden Eigenschaft von Stc-1 in SMC wurde die DNA-Synthese in hASMC mittels [³H]-Thymidin-Einbau PDGF-BB 24 in Gegenwart von über einen Zeitraum von h bestimmt. Die Transduktionsexperimente führten sowohl bei der LacZ Kontrolle als auch bei den Stc-1 Viren zu einer Abnahme des Stimulationseffektes durch PDGF-BB im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle erhöhte sich die DNA-Synthese sowohl bei LacZals auch Stc1-stimulierten Zellen (Abb. 29).



Abbildung 29 Stc-1 Einfluss auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (n=3, Mittelwert ± SEM:**, p < 0,01 Kontrolle vs. PDGF, LacZ:***, p < 0,001 Kontrolle vs. PDGF, Stc-1:**, p < 0,01 Kontrolle vs. PDGF(gepaarter t-Test))

3.4 Stanniocalcin 1 Einfluss auf die Migration glatter Gefässmuskelzellen

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der durch Stanniocalcin 1 vermittelten Effekte wurde der Einfluss auf die HGF und PDGF-BB-stimulierte Migration von hASMC über einen

Zeitraum von 6 h analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden SMC gleicher Anzahl ausgesät und mit LacZ- und Stc-1-Viren infiziert. Anschließend wurde eine Migration durch HGF und PDGF Stimulation induziert. Nach Beendigung der Migration zeigte sich, dass Stanniocalcin 1 die Migration hemmt. Dies bestätigte vorherige Experimente (Zlot, Ingle et al. 2003), jedoch kam es dort nicht zu einer Hemmung nach PDGF (Abb. 30)





PDGF

Abbildung 30 Stc-1 Einfluss auf eine HGF bzw. PDGF induzierte Migration glatter Gefäßmuskelzellen (HGF: n=3, gepaarter t-Test, *, p< 0,05 LacZ vs. Stc-1; PDGF: n=4, gepaarter t-Test, *, p< 0,05)

4 Diskussion

Am Anfang der Atherosklerose steht der Verlust oder die Einschränkung wichtiger Endothelzellfunktionen, was als endotheliale Dysfunktion bezeichnet wird. Das dysfunktionelle Endothel hat seine physiologische Fähigkeit zu Hemmung der Kontraktion glatter Muskelzellen, der Adhäsion von Leukozyten und Monozyten sowie der Thrombozytenaggregation und Zellproliferation verloren. Es exprimiert spezifische Adhäsionsmoleküle und chemotaktische Substanzen, die zur Einwanderung mononukleärer Leukozyten in die Intima führen. Selektine vermitteln den Kontakt der Endothelzellen mit Monozyten, wodurch deren Rollen entlang der Endotheloberfläche ermöglicht wird. Die Monozyten werden dann durch die immunglobulinähnlichen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) und VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1) gestoppt und migrieren unter dem Einfluss chemotaktischer Faktoren wie des MCP-1(monocyte chemoatractant proteine-1) in den subendothelialen Raum, wo sie zu Makrophagen werden. Diese nehmen verstärkt oxidativ modifizierte LDL (low density Lipoprotein) über die scavenger-Rezeptoren auf und wachsen zu Schaumzellen, das typischen Merkmal der frühen atherosklerotischen Plaque. Dies hat zunächst keine klinischen Konsequenzen und ist voll reversibel. Erst aufgrund der weiteren Freisetzung von Wachstumsfaktoren (PDGF (platelet derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), IGF (insulinlike growth factor), FGF(fibroblast growth factor)), deren Synthese durch inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 stimuliert wird, kommt es zur Einwanderung und Proliferation glatter Muskelzellen mit Bindegewebsproduktion und Bildung eines progredienten Atheroms (Ross 1999; Glass and Witztum 2001). Die im Weiteren stattfindende Kalzifizierung der atherosklerotischen Plaque wird beeinflusst von der Synthese von Induktoren oder Inhibitoren der Kalzifizierung durch glatte Muskelzellen, die auch bei der Knochenbildung und Mineralisation von Bedeutung sind (cbfa-1, TNAP, Decorin). Durch die Atherombildung entsteht eine arterielle Stenose, die jedoch über Jahre symptomlos bleiben kann und nur selten der Grund für ein akutes Ereignis ist. Erst durch die Ruptur der Plaque kommt es zur Thrombenbildung und zum plötzlichen arteriellen Verschluss mit all seinen Folgen (Burke and Virmani 2007). Es sind also die Eigenschaften und das Verhalten der Plaque für das Schicksal des Patienten entscheidend. Diese Plaquestabilität hängt entscheidend vom Kollagengehalt der fibrösen Kappen ab, der wiederum durch das Gleichgewicht von Biosynthese und Abbau bestimmt wird. Die Kollagensynthese in glatten Muskelzellen wird beispielsweise durch PDGF oder TGF- β (transforming growth factor- β) aus Plättchen stimuliert, während Interferon- γ aus aktivierten T-Zellen die Genexpression von Bindegewebsproteinen deutlich hemmt (Hansson,
Libby et al. 2002; Buono, Pang et al. 2004). Neben einer verminderten Synthese kann auch ein vermehrter Kollagenabbau in der fibrösen Kappe wesentlich zur Plaquedestabilisierung beitragen. Matrixabbauende Metalloproteinasen, die im Verlauf entzündlicher Prozesse von Makrophagen freigesetzt werden, scheinen hierbei eine Schlüsselrolle zu spielen (Gough, Gomez et al. 2006).

Eine der möglichen Vorstellungen, der in dieser Arbeit nachgegangen wurde, ist diejenige, dass Prostazyklin bei der Kalzifizierung eine wichtige Funktion erfüllt (Belton, Byrne et al. 2000), indem es die Expression mineralisationsregulierender Gene beeinflusst.

Im Folgenden soll nun auf der Grundlage der zuvor gesammelten Daten diskutiert werden, ob und wenn ja, welche Rolle die einzelnen Faktoren spielen und wie sich die Ergebnisse zu einem Bild zusammenfügen lassen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde zunächst die Stanniocalcin 1 Expression durch Iloprost und PGE₂ näher untersucht und dann desweiteren der Einfluss auf die atherogenen Prozesse Proliferation, Migration und Kalzifizierung untersucht.

4.1 Untersuchungen zur Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen

4.1.1 Der Einfluss von lloprost auf die Kalzifizierung

Prostazyklin (PGI₂) inhibiert die Plättchenaggregation und wirkt vasodilatierend. Prostazyklinsynthase (PGIS) bildet PGI₂ aus Prostaglandin H₂ und kommt vorwiegend im Endothel und in glatten Gefäßmuskelzellen vor. Mutationen im PGIS Gen führen zu essentiellem Bluthochdruck, myokardialen Infarkten und Schlaganfällen (Nakayama 2005; Nakayama 2006). Diese Beobachtungen legen nahe, dass PGI₂ das Risiko für das Entstehen kardiovaskulärer Erkrankungen beeinflusst.

Obgleich unterschiedliche Vorstellungen vorliegen, ob Prostazyklin selbst eine Kalzifizierung induziert oder nicht (Raisz, Vanderhoek et al. 1979; Chambers and Ali 1983; Walenga and Bergstrom 1985), ist es unbekannt, wie Prostazyklin einer anderweitig induzierten Kalzifizierung entgegentritt. Dies wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass lloprost einen zuvor durch ß-GP induzierten Kalzifizierungsprozess hemmt.

Es ist bekannt, dass lloprost cAMP erhöht. Da Tintut et al. 2000 zeigten, dass TNF α via cAMP Kalzifizierung im SMC induziert – sich somit ein Widerspruch zu unseren Daten andeutet -, wurde sowohl der Forskolin- als auch PGE₂-Effekt untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden Stimuli, die ebenfalls cAMP erhöhen, keine Hemmung der Kalzifizierung verursachen. Daher deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Iloprost spezifischere Effekte z.B. durch differentielle Genregulation (wie untersucht) nach langfristiger Gabe (14 Tage) hervorruft, die andere cAMP-induzierende Agonisten und Prinzipien nicht teilen.

4.1.2 Der Einfluss von PGE₂ auf die Kalzifizierung

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stimuliert PGE₂ die EP-Rezeptoren 1-4, die ganz unterschiedliche Eigenschaften besitzen. EP1 koppelt an Gq-Proteine und induziert über PLC intrazelluläre Ca²⁺-Kanäle, was zur Vasokonstriktion führt. EP2 ist Gs gekoppelt; eine Stimulation führt zur cAMP Freisetzung und zur Vasodilatation. Die Folge ist eine Relaxation von SMC. EP3 ist Gi gekoppelt, bewirkt eine Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration und steigert die Migration. EP4 ist Gs gekoppelt, erhöht die cAMP-Konzentration und bewirkt eine Vasodilatation (Narumiya, Sugimoto et al. 1999). Zur Kalzifizierung existieren unterschiedliche Beobachtungen, die zwar nicht an glatten Gefäßmuskelzellen gemacht wurden, jedoch eng mit generell ablaufenden Kalzifizierungsprozessen verbunden sind.

Higashi et al. beobachteten an Osteoblasten eine PGE₂ Induktion während der Mineralisationsphase nach Interleukin-1ß Stimulation (Higashi, Ohishi et al. 2000). Nauman et al. untersuchten Osteoblasten unter pulsatilen Flussbedingungen und konnten einen kurzzeitigen Anstieg der PGE₂ Konzentration messen. Zugleich jedoch zeigte sich bei ihren Experimenten kein Langzeiteffekt auf die Proliferation sowie die Mineralisation dieser Zellen

(Nauman, Satcher et al. 2001). Unsere Beobachtungen ergaben nur eine sehr geringe, nicht signifikante Inhibition einer Kalzifizierung und deckten sich mit diesem Ergebnis. Zugleich zeigte die dazugehörige DMSO Kontrolle eine ausgeprägte Inhibition, was den Schluss zulässt, dass der geringe PGE₂ Effekt auch auf DMSO beruhen könnte.

Lediglich Camargo et al. zeigten mineralisationsfördernde Effekte von PGE_2 auf immortalisierte zementoblastische Zellen (OCCM) (Camargo, Lagos et al. 2005). Über die EP1 und EP3 Rezeptoragonisten 16,16-Dimethylprostaglandin E_2 und Sulproston konnten sie einen Mineralisationseffekt verstärken.

Dies entspricht jedoch nicht unserer Beobachtung an glatten Gefäßmuskelzellen für PGE₂. Wahrscheinlich sind die stimulatorischen Effekte von PGE₂ auf alle EP-Rezeptoren so unterschiedlich, dass sie in ihrer Summe keinen Effekt auf die Kalzifizierung haben.

4.1.3 Cbfa1 Expression und Bedeutung für die Kalzifizierung

Der core binding factor alpha 1 spielt als osteoblastärer Transkriptionsfaktor eine Schlüsselrolle in der Osteoblastendifferenzierung und Expression osteoblastenspezifischer Gene. Otto et al. generierten durch homologe Rekombination cbfa1-defiziente Mäuse (Otto, Thornell et al. 1997). Homozygote Mutanten waren kleiner, hatten kürzere Extremitäten und starben kurz nach der Geburt an Ateminsuffizienz. Sowohl der membranöse Knochen des Schädels als auch der enchondrale Knochen des restlichen Skeletts fehlten vollständig. Cbfa1 -/- Mäuse entwickelten eine Knorpelanlage, aber es fand keine Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten, keine Verknöcherung und keine Vaskularisierung des Knorpels statt.

Histochemische Analysen ergaben ein komplettes Fehlen von Osteoblasten und nur eine geringe Anzahl kleiner Osteoklasten. Einen ähnlichen Befund fanden Komori et al., die ebenfalls Mäuse mit einem mutierten *Cbfa1*-Locus untersuchten (Komori, Yagi et al. 1997).

Auch glatte Gefäßmuskelzellen unterlaufen eine phänotypische Veränderung während einer durch ß-Glycerolphosphat induzierten Kalzifizierung (Steitz, Speer et al. 2001). Als Zeichen der Mineralisation kommt es zu Kalziumhydroxylapatitablagerungen an Kollagenfibrillen und Matrixvesikeln, was an kalzifizierten vaskulären Läsionen beobachtet wurde. Im zeitlichen Verlauf verlieren sich Muskelzellen Marker wie SM22 α und *smooth muscle* α -actin und bilden einen osteogenen Phänotyp aus. Dies schlägt sich in einer vermehrten cbfa1 Expression nieder und einem Anstieg derjenigen Gene, die eine Bindungsstelle für cbfa1 besitzen. Eben diese Beobachtung ging einher mit den Ergebnissen unserer vorausgegangenen Versuche. Unter den genannten Bedingungen kam es zu einem signifikanten Anstieg von cbfa1; als Folge daraus stieg auch die ALP mRNA-Expression und Aktivität an. Die auf molekularer Ebene gefundenen Ergebnisse gingen einher mit den mittels von Kossa Färbung bestätigten mikroskopischen Befunden sowie der quantitativ erhöht messbaren Kalziummenge im Extrazellularraum.

Zhang et al. konnten mit Hilfe von COX1 -/- und COX2 -/- Mäusen zeigen, dass die COX2 eine wichtige Rolle bei der enchondralen und intramembranösen Knochenentwicklung spielt (Zhang, Schwarz et al. 2002). Tibiafrakturen an COX2 -/- Mäusen heilten langsamer als an COX1 -/- Mäusen und Wildtypen. Ebenfalls zeigten Stammzellen aus den Knochen von COX2 -/- Mäusen osteogene Defekte, die sich durch PGE₂ aufheben ließen. Cbfa1 wurde in COX 2 -/- Zellen geringer exprimiert. Sie zogen die Schlussfolgerung, dass COX2 die Induktion von cbfa1 reguliert und so Reparaturmechanismen des Skeletts steuert.

Unsere Versuche an glatten Gefäßmuskelzellen, einem völlig anderen Zellsystem, untersuchten einen zusätzlichen PGI₂ Effekt auf eine bereits stark induzierte Kalzifizierung durch ß-GP. Unter diesen Bedingungen hemmte Iloprost die cbfa-1 Induktion. Zukünftige Untersuchungen könnten

klären, wie sich glatte Gefäßmuskelzellen unter ß-GP und PGI₂ zu einem osteoblastären Phänotypen hin verändern.

4.1.4 Induktion der gewebsunspezifischen Phosphatase (TNAP)

Die Wirkung von TNAP beim Kalzifizierungsprozess beruht auf dem kontinuierlichen Entzug von Pyrophosphat, welches inhibitorische Eigenschaften besitzt (Hessle, Johnson et al. 2002; Harmey, Hessle et al. 2004; Murshed, Harmey et al. 2005). Cbfa1 steigert die Promotorenaktivität für TNAP: die Folge daraus ist eine verstärkte TNAP Expression. Genau dies konnte bei unseren Experimenten beobachtet werden. Sowohl die mRNA-Expression als auch die Aktivität wurden bei der durch ß-GP eingeleiteter Kalzifizierung induziert. Zugleich führte eine Hemmung der cbfa1 Expression durch Iloprost zu einer geringeren TNAP mRNA-Expression als auch Aktivität.

4.1.5 bone sialo protein 2 (BSP-2)

Das *bone sialo protein* 2 (BSP-2) ist ein Glykoprotein, das etwa 12% der nicht-kollagenen Knochenmatrix darstellt und wird normalerweise von Osteoblasten und Osteoklasten produziert (Fisher 1983; Fisher 1990). BSP vermittelt die Adhäsion zwischen Osteoklasten bzw. Osteoblasten und der extrazellulären Knochenmatrix und reguliert die Knochenmineralisierung (Fisher 1983; Fisher 1990; Bianco 1991; Raynal 1996). Es stellt einen Stimulus für die Kalziumapatitnukleation dar. Obgleich sich durch unsere Ergebnisse keine direkte BSP-2 Induktion nachweisen ließ, ist dennoch davon auszugehen, dass bereits vorhandenes BSP-2 die Nukleation förderte. Es stellt eine notwendige Komponente dar, auf deren Grundlage cbfa1 und TNAP eine Kalzifizierung auslösen konnten.

4.1.6 Kollagen 1 α 1 (Col1 α 1)

Kollagen Typ 1 Fasern werden als stäbchenförmige Verstärkungselemente zum Aufbau der Knochen benötigt. Durch bestimmte Mutationen in den Genen für das α 1(I)-Polypeptid entsteht die Osteogenesis imperfecta, eine Bindegewebserkrankung, bei der die Knochen

außerordentlich brüchig werden. Es entwickeln sich einige Formen dieser Erkrankung bereits nach einem Aminosäurenaustausch innerhalb der Kollagenkette (Prockop, Colige et al. 1993). Da sich für die Ausbildung der Kollagentripelhelix an jeder dritten Stelle ein Glycinrest befinden muss, reicht bereits ein Austausch dieser Aminosäure gegen nahezu jede andere aus, instabile Helices zu bilden. Die mutierten und nicht gefaltenen Kollagenmoleküle verbleiben im rauhen ER, in denen Typ I Kollagen vorwiegend gebildet wird.

Eine weitere Möglichkeit die Kollagenfunktion zu beeinflussen besteht darin Mutationen an funktionellen Abschnitten, wie z.B. der Bindungsstelle für Decorin, auszulösen. Man vermutet, dass diese funktionellen Abschnitte bei bisher ungeklärten Kollagenopathien eine Rolle spielen, bei denen der extrazelluläre Matrixzusammenhalt gestört ist (Font, Aubert-Foucher et al. 1993; Font, Eichenberger et al. 1996; Weber, Harrison et al. 1996).

Ein Effekt auf die Expression war bei unseren Versuchen nicht messbar.

4.1.7 Decorin und vaskuläre Kalzifizierung

Proteoglykane sind Makromoleküle, die aus einem *core* Protein und langen Seitenketten, Glykosaminoglykane genannt, bestehen. Die Glykosaminoglykane sind aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten aufgebaut, welche gewöhnlich negativ geladene Gruppen tragen, meist Sulfat- und Carboxylgruppen. Proteoglykane werden gemäß der Größe ihres Proteinanteils in größere und kleinere Typen unterteilt. Die kleineren Proteoglykane besitzen mehrere leucinreiche *repeats*, die primär für Interaktionen mit Kollagen verantwortlich sind. Die größeren Proteoglykane sind hauptsächlich an Interaktionen mit dem Nicht-Proteoglykan Hyaluronsäure beteiligt. In vitro konnte gezeigt werden, dass LDL-Cholesterin mit hoher Affinität an viele Proteoglykane der Arterienwand binden kann. An der Interaktion zwischen LDL-Cholesterin und Proteoglykanen sind diejenigen Aminosäuren des Apolipoproteins B-100 beteiligt, die Ionenbindungen mit den negativen Ladungen der Proteoglykansulfate eingehen können. Gewöhnlich bindet Decorin an Kollagen über die Bindungsstelle KGEAGPQGPRGSE

(Positionen 174 bis 186 der Tripel-helix in COL1α1) (Weber, Harrison et al. 1996). Während der Atherogenese ändert sich die Zuckerkette vom Dermatansulfat hin zu Chondroitinsulfat, welche eine höhere Affinität für Lipoproteine besitzt (Camejo, Hurt-Camejo et al. 1999; Olsson, Bondjers et al. 1999).



Monozyten, Makrophagen

Abbildung 31 Decorin und vaskuläre Kalzifizierung

(Teile der Abbildung in Anlehnung an Olsson, Bondjers et al. 1999)

Daraus ergibt sich eine erhöhte Retention atherogener Lipoproteine. Oxidiertes LDL-Cholesterin aktiviert Monozyten und Makrophagen. Die Makrophagen sind mit Hilfe eines Rezeptors (Scavenger-Rezeptor) in der Lage, Low Density Lipoprotein (LDL) gebundene Cholesterinester aufzunehmen und modifiziert an das High Density Lipoprotein (HDL) zum Abtransport zu

u bertragen. Bei Überladung der Makrophagen entstehen aus diesen fettbeladene, vakuolisierte

Schaumzellen, die sich in der Intima als "fatty-streaks" anlagern und die früheste Form der Atherosklerose darstellen (Nagy, Tontonoz et al. 1998). Tintut et al. konnten zeigen, dass eine Kokultur kalzifizierender Muskelzellen mit Monozyten die alkalische Phosphatase aktivierte, woraufhin die Kalzifizierung eingeleitet wurde (Tintut, Patel et al. 2002). Dies ist ein möglicher Mechanismus, wie Decorin die Kalzifizierung fördern könnte. In atherosklerotischen Läsionen

lässt sich Decorin in der Neointima neben Kalziumhydroxylapatit nachweisen (Sartipy, Johansen et al. 2000). Fischer et al. fanden, dass in arteriellen Gefäßmuskelzellen durch retrovirale Überexpression von Decorin eine verstärkte Calzifizierung ausgelöst werden konnte (Fischer et al.,2004). In humanen atherosklerotischen Läsionen lässt sich eine Kolokalisation von Decorin und Kalziumhydroxylapatit durch von Kossa Färbung nachweisen. Neuere Untersuchungen fanden heraus, dass Statine eine in vitro Kalzifizierung hemmen (Kizu, Shioi et al. 2004).

4.1.8 Matrix GLA Protein (MGP)

Das Matrix Gla Protein (MGP) war der erste endogen gefundene Inhibitor einer SMC Kalzifizierung. MGP ist ein Vitamin-K-abhängiges Protein, welches von proliferierenden vaskulären Muskelzellen am Ort der atherosklerotischen Plaquebildung exprimiert wird und regulatorisch bei der Verkalkung von Geweben eine Rolle spielt. Mäuse, die nicht das Gen zur MGP Kodierung besitzen, entwickeln eine ausgeprägte Mediakalzifizierung und sterben bereits früh nach der Geburt (Luo, Ducy et al. 1997). Eine MGP Expression wird durch Kalzium über den *calcium sensing receptor* reguliert (Farzaneh-Far, Proudfoot et al. 2000). Humane SMC in Zellkultur exprimieren wenig MGP mRNA, wohingegen SMC eines osteogenen Phänotyps hohe MGP Expressionen zeigen (Proudfoot, Skepper et al. 1998). Dies zeigten auch unsere Ergebnisse.

4.1.9 Osteoprotegerin (OPG)

Es gibt immer mehr Hinweise dafür, dass OPG nicht nur ein protektiver Faktor für die osteogene Entwickung, sondern auch für das Gefäßsystem ist. OPG *knockout* Mäuse zeigten Osteoporose und eine arterielle Kalzifizierung der Media und der Nierenarterien (Bucay, Sarosi et al. 1998). Mäuse, die keine Geninformation für OPG besaßen und rekombinantes OPG bekamen, entwickelten im weitaus geringeren Mass Kalziumhydroxylapatitablagerungen im Gefäßsystem (Min, Morony et al. 2000). Eine OPG Expression konnte in der Media größerer Arterien (Simonet, Lacey et al. 1997), glatten Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien (Hofbauer, Shui et

al. 2001) sowie Endothelzellen nachgewiesen werden (Malyankar, Scatena et al. 2000). In Endothelzellen fungiert OPG als autokriner *survival* Faktor, indem es vor Apoptose schützt. Unsere Ergebnisse zeigten eine basale OPG Expression, die sich im Verlauf der Kalzifizierung und Inhibition nicht veränderte. Die Kalzifizierungshemmung durch lloprost beruht nicht auf einer erhöhten OPG Expression.

4.1.10 Regression der Kalzifizierung

Auf Grund der Beobachtung, dass es sich bei der Kalzifizierung um einen regulierten Prozess handelt, stellt sich die Frage, ob sich eine Regression der Abläufe induzieren lässt. Bisher liegen noch keine quantitativen Studien vor, die eine deutliche Regression der Kalzifizierung an Erwachsenen zeigen. Es existieren jedoch zwei mögliche Mechanismen, die anhand von Studien am Tier belegt werden. Zum einen ist es die Auflösung von Mineralablagerung durch Makrophagen, welche ähnliche Eigenschaften wie Osteoklasten besitzen (Steitz, Speer et al. 2002). Eine andere beinhaltet eine Ansäuerung des umliegenden Gewebes durch das Enzym Carboanhydrase (Essalihi, Dao et al. 2005). Zum jetzigen Zeitpunkt mangelt es an Hinweisen für eine Infiltration von Entzündungsparametern bei der Mediakalzifizierung; ausschliessen lässt sich dieser Mechanismus jedoch nicht. Bereits 1993 konnte durch Jones et al. eine Stimulation der Prostazyklinsynthese durch TNF α und II-1 β an Endothelzellen gezeigt werden (Jones, Carlton et al. 1993). Dies spricht für eine physiologische Bedeutung der im Bezug auf die Kalzifizierung gefundenen Ergebnisse. Wenn ein Entzündungsgeschehen die vaskuläre Kalzifizierung fördert, so muss es auch Mechanismen geben, die dieser entgegenwirken. Eine durch Prostazyklin via Decorin eingeleitete Hemmung stellt solch einen Mechanismus dar.

4.2 Untersuchungen zu Stanniocalcin 1

4.2.1 Der differentiell induktive Effekt von lloprost und PGE₂

Paciga et al. stellten fest, dass Stanniocalcin 1 mit Forskolin und . PGE₂ induziert werden kann (Paciga, DiMattia et al. 2004). Unsere Ergebnisse zeigten eine fast doppelt so starke Stc-1 Induktion durch Iloprost im Vergleich zu PGE₂. Untersuchungen von Bulin et al. ergaben, dass PGE₂ im Vergleich zu Iloprost zu einer geringeren cAMP Freisetzung führt (Bulin, Albrecht et al. 2005). Dies stellt einen möglichen Grund für die verstärkte Stc-1 Expression durch Iloprost dar.

4.2.2 Der Einfluss von Stc-1 auf die Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen

Filvaroff et al. zeigten, dass Stanniocalcin 1 an Mäusen vielfältige metabolische Veränderungen hervorruft. Es beeinflusst die Kalziumhomöostase, Muskelmasse, Knochenmasse und –struktur, Angiogenese sowie die Osteoblasten und Osteoklasten in ihrer Funktion. Stc-1 inhibierte die Kalziumaufnahme und förderte die Phosphatresorbtion (Filvaroff, Guillet et al. 2002). Wir stellten uns die Frage, ob Stc-1 auch die Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen beeinflusst. Aus diesem Grund nutzen wir die Möglichkeit des adenoviralen Gentransfers und führten anschließend Kalzifizierungsexperimente über 14 Tage durch. Hierbei kam es allein durch die Transduktion mit Viren zu einer ausgeprägten Kalzifizierung. Grund dafür ist die Tatsache, dass ein viraler Gentransfer proinflammatorisch wirkt, was generell die Kalzifizierung fördert. Trotz dieser Tatsache kam es im Vergleich zur Lac Z Kontrolle zu einer leichten Kalzifizierungshemmung durch Stc-1.

4.2.3 Stanniocalcin 1 Untersuchungen zur Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

Es wird vermutet, dass Stanniocalcin 1 eine Bedeutung im Zellmetabolismus hat. Bindungsstudien mittels eines Stc-1-ALP-Fusionsproteins zeigten, dass Stc-1 sowohl auf der äußeren Zellmembran als auch auf der inneren Mitochondrienmembran von Nephronzellen bindet (McCudden, James et al. 2002). Stc-1 könnte daher eine bisher noch ungeklärte Funktion im Energiehaushalt der Zelle besitzen.

Unsere Untersuchungen an glatten Gefäßmuskelzellen beschränkten sich auf ihr Proliferationsverhalten. Zlot et al. konnten zeigen, dass Stc-1 eine durch HGF ausgelöste endotheliale Proliferation nicht beeinflusst (Zlot, Ingle et al. 2003). Unsere Versuche zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf die Proliferation. Die Transduktionsexperimente führten sowohl bei der LacZ Kontrolle als auch bei den Stc-1 Viren zu einer Abnahme des Stimulationseffektes durch PDGF-BB. Wahrscheinlich stellt die Transduktion mit Viren einen so grossen Eingriff in den Zellstoffwechsel dar, dass PDGF-BB nur einen geringen Effekt hatte. Im Vergleich zur LacZ Kontrolle hemmte Stc1 die DNA-Synthese nicht.

4.2.4 Der Einfluss von Stc-1 auf die Migration glatter Gefäßmuskelzellen

Eine Hemmung der Migration durch PGI₂ wurde bereits an menschlichen, arteriellen SMC sowie menschlichen Fibroblasten beschrieben (Blindt, Bosserhoff et al. 2002; Kohyama, Liu et al. 2002). Bulin et al. konnten zeigen, dass es unter lloprost zu einer drastisch veränderten Struktur des Aktin-Zytoskeletts sowie der Abnahme fokaler Adhäsionen in SMC kam (Bulin, Albrecht et al. 2005). Ebenfalls wurde eine Hypophosphorylierung der FAK am Tyrosinrest 397 festgestellt. Eine FAK-Autophosphorylierung ist Voraussetzung für eine Assoziation mit Src-Kinasen und PI-3-Kinase, deren nachfolgenden Signaltransduktionen eine migrationsfördernde Eigenschaft zugesprochen wird (Schlaepfer and Hunter 1998; Goncharova, Ammit et al. 2002). Die Effekte von Iloprost auf FAK und FA lieferten einen möglichen Erklärungsansatz für die antimigratorische Eigenschaft.

Zlot et al. stellten fest, dass Stc-1 ein selektiver Modulator einer *hepatocyte growth factor* (HGF) induzierten Migration von Endothelzellen ist (Zlot, Ingle et al. 2003). Unsere Versuche zeigten, dass Stc-1 auch eine HGF und PDGF-BB induzierte Migration von SMC hemmt.

Mechanismen, die diesem Sachverhalt zugrunde liegen, sind bisher nicht bekannt, jedoch gibt es einige Hinweise, die eine mögliche Erklärung dafür bieten. Stc-1 kommt im Gegensatz zu Fischen, wo es ursprünglich in den Stanniuskorpuskeln gefunden wurde, in einer großen Anzahl von Geweben vor. Jiang et al. schlussfolgerten daraus, das Stc-1 sowohl auto-, als auch parakrine Funktionen trägt. Sie konnten Stc-1 bei der Muskel- und Knochenentwicklung der Maus nachweisen (Jiang, Chang et al. 2000). Weitere Versuche ergaben, dass Stc-1 an Kardiomyozyten mit verantwortlich für phänotypische und strukturelle Veränderungen ist und als

Kalziumkanalinhibitor fungiert (Sheikh-Hamad, Bick et al. 2003). Rezeptorbindungsstudien konnten Stanniocalcin 1 im Mitoplasma nachweisen. An sub-mitochondrialen Partikeln aus Schweineherzen konnte durch Stc-1 Zugabe ein Effekt auf den Elektronentransfer gezeigt werden (McCudden, James et al. 2002). Dabei übte Stc-1 konzentrationsabhängig stimulatorische Einflüsse aus. Als Elektronenakzeptor kann Stc-1 Elektronen der Atmungskette entziehen; dies führt zu NADH Entzug, woraus sich ein geringerer Energiestoffwechsel ergibt und eine Zellmigration verlangsamt wird. Es ist ebenfalls möglich, dass es stimulatorische Einflüsse auf den Elektronentransport durch Erhöhung der Atmungsenzymsaktivität ausübt. Dies hätte zur Folge, dass vermehrt NADH durch Superoxidanionen zu NAD⁺ oxidiert würde. Superoxidanionen würden auf diese Weise dem Zellsystem entzogen und könnten ihren promigratorischen Einflüss nicht mehr ausüben.

5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, welchen Einfluss lloprost auf die Kalzifizierung glatter Gefässmuskelzellen hat und welche Gene daran beteiligt sind. Bei der Suche nach verantwortlichen Faktoren konnte gezeigt werden, welche Proteine an den beobachteten Effekten mitwirken: charakteristisch für eine beginnende Kalzifizierung war der Nachweis des osteoblastären Transkriptionsfaktors cbfa-1 sowie eine Zunahme der Expression und Aktivität der alkalischen Phosphatase. Beide Prozesse werden durch Iloprost gehemmt. Unter Kalzifizierungsbedingungen kam es weiterhin zu einer gesteigerten Decorinexpression, welche sich durch Iloprost hemmen ließ. Weitere Untersuchungen könnten klären, wie sich das Zusammenspiel zwischen Decorin und Kollagen unter Iloprosteinfluss verändert bzw. welche weiteren Prostaglandine Einfluss auf die Decorinexpression haben. Vielleicht existieren noch weitere Rückkopplungsmechanismen, die durch Decorin ausgelöst werden. Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt wäre die Klärung, ob es durch Effekte auf die Epimerisierung der Glukuronsäure zu Effekten auf das Dermatansulfat/Chondroitinsulfat-Verhältnis kommt. Dies ist bedeutsam, da Chondroitinsulfat eine höhere Affinität für Lipoproteine besitzt.

Es wurde gezeigt, dass Stanniocalcin 1 die Migration glatter Gefäßmuskelzellen hemmt. Der genaue Mechanismus dieser Hemmung ist jedoch nicht bekannt. McCudden et al. konnten zeigen, dass für Stanniocalcin 1 ein Rezeptor sowohl auf Zellmembranseite als auch auf der Mitochodrienmembran vorhanden ist (McCudden, James et al. 2002). Funktionelle Studien zeigten, dass rekombinantes Stc-1 konzentrationsabhängige stimulatorische Effekte auf den Elektronentransfer submitochondrialer Partikel ausübt. Somit könnten elementare Prozesse in Zellstoffwechsel beeinflusst werden und darüber die Migration gehemmt werden.

Der Stc-1 Einfluss auf die Kalzifizierung konnte nicht mittels adenoviraler Infektion und Überexpression geklärt werden, da die Infektion selbst einen grossen Einfluss auf die Kalzifizierung hatte. Es ist denkbar, dass ein Versuchsansatz mit rekombinantem Stc-1 eine geeignete Alternative zur Untersuchung dieser Fragestellung wäre.

6 Zusammenfassung

Atherosklerose geht häufig mit vaskulärer Kalzifizierung sowie einer Migration glatter Gefäßmuskelzellen (SMC) aus der Media in die Intima einher. Beide Prozesse unterliegen dem Einfluss von lokal gebildetem Prostazyklin (PGI₂). An der Prostazyklinsynthese sind die Cyclooxygenasen-1 und -2 beteiligt.

Über die Wirkung von Prostazyklin auf Kalzifizierung von VSMC ist wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Prostazyklineffekte auf eine Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen und die zugrunde liegenden Effekte auf bekannte Regulatoren der Kalzifizierung sowie neue Kadidaten (Stc-1) untersucht.

Die Expression mit der Kalzifizierung verbundener Faktoren wurde mittels RT-PCR, Westernblot, sowie Aktivitätsbestimmung bestätigt. Nach 14-tägiger Kalzifizierung mittels ß-Glycerolphosphat (ß-GP) zeigte sich eine Induktion des osteoblastären Transkriptionsfaktors cbfa-1, der Alkalischen Phosphatase, als auch der Matrixkomponente Decorin. Andere untersuchte Faktoren blieben unreguliert. Eine Stimulation mit Prostazyklin zeigte eine Hemmung der cbfa-1 Expression, eine geringere TNAP Induktion auf RNA- und Proteinebene, sowie eine geringere Aktivität. Desweiteren konnte auf RNA- und Proteinebene gezeigt werden, dass Decorin unter Prostazyklineinfluss geringer exprimiert wird. Eine Kalzifizierung mittels ß-GP unter Zugabe von Decorin führt zur Aufhebung der Kalzifizierungshemmung. Daher kann geschlussfolgert werden, dass Prostazyklin über die Inhibition von einerseits cbfa1 und TNAP und andererseits über Hemmung der Decorinexpression die Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen hemmt.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Stanniocalcin auf die Kalzifizierung und den Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen untersucht, da die Stanniocalcin-1 Expression durch Iloprost induziert wird. Stanniocalcin-2 wird dagegen durch Iloprost nicht induziert. In folgenden Untersuchungen konnte durch adenovirale Überexpression an glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden, dass Stanniocalcin-1 die Migration PDGF-BB und HGF stimulierter Zellen hemmt. Dagegen wurde die Proliferation von VSMC nicht durch Stc-1 Überexpression beeinflusst. Ein Effekt von Stc-1 auf die Kalzifizierung konnte in dem gewählten Überexpressionsmodell nicht sicher nachgewiesen werden.

Die Migrationshemmung über Stc-1 sowie die Kalzifizierungshemmung stellen neue Mechanismen zur Vasoprotektion durch lloprost dar.

7 Literaturverzeichnis

- Aubin, J. E. and E. Bonnelye (2000). "Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption." <u>Osteoporos Int</u> **11**(11): 905-13.
- Bae, S. C., Y. Yamaguchi-Iwai, et al. (1993). "Isolation of PEBP2 alpha B cDNA representing the mouse homolog of human acute myeloid leukemia gene, AML1." <u>Oncogene</u> 8(3): 809-14.
- Banks, L. M., B. Lees, et al. (1994). "Effect of degenerative spinal and aortic calcification on bone density measurements in post-menopausal women: links between osteoporosis and cardiovascular disease?" <u>Eur J Clin Invest</u> 24(12): 813-7.
- Beadenkopf, W. G., A. S. Daoud, et al. (1964). "Calcification in the Coronary Arteries and Its Relationship to Arteriosclerosis and Myocardial Infarction." <u>Am J Roentgenol Radium</u> <u>Ther Nucl Med</u> 92: 865-71.
- Belton, O., D. Byrne, et al. (2000). "Cyclooxygenase-1 and -2-Dependent Prostacyclin Formation in Patients With Atherosclerosis." <u>Circulation</u> **102**(8): 840-845.
- Bianco, P., L. W. Fisher, et al. (1991). "Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues." <u>Calcif Tissue Int</u> **49**(6): 421-6.
- Bianco, P., M. Riminucci, et al. (1993). "Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation: relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition." <u>J Histochem Cytochem</u> **41**(2): 183-91.
- Bianco, P., M. Riminucci, et al. (1993). "Localization of bone sialoprotein (BSP) to Golgi and post-Golgi secretory structures in osteoblasts and to discrete sites in early bone matrix." <u>J Histochem Cytochem</u> 41(2): 193-203.
- Bidanset, D. J., C. Guidry, et al. (1992). "Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI." J Biol Chem **267**(8): 5250-6.
- Blindt, R., A. K. Bosserhoff, et al. (2002). "Activation of IP and EP(3) receptors alters cAMPdependent cell migration." <u>Eur J Pharmacol</u> 444(1-2): 31-7.
- Block, G. A. (2000). "Prevalence and clinical consequences of elevated Ca x P product in hemodialysis patients." <u>Clin Nephrol</u> **54**(4): 318-24.
- Bostrom, K., D. Tsao, et al. (2001). "Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells." J Biol Chem **276**(17): 14044-52.
- Bostrom, K., K. E. Watson, et al. (1993). "Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions." J Clin Invest **91**(4): 1800-9.

- Bucay, N., I. Sarosi, et al. (1998). "osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification." <u>Genes Dev</u> **12**(9): 1260-8.
- Bulin, C., U. Albrecht, et al. (2005). "Differential effects of vasodilatory prostaglandins on focal adhesions, cytoskeletal architecture, and migration in human aortic smooth muscle cells." <u>Arterioscler Thromb Vasc Biol</u> **25**(1): 84-9.
- Buono, C., H. Pang, et al. (2004). "B7-1/B7-2 costimulation regulates plaque antigen-specific Tcell responses and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice." <u>Circulation</u> **109**(16): 2009-15.
- Burke, A. P., A. Taylor, et al. (2000). "Coronary calcification: insights from sudden coronary death victims." <u>Z Kardiol</u> **89 Suppl 2**: 49-53.
- Burke, A. P. and R. Virmani (2007). "Pathophysiology of acute myocardial infarction." <u>Med Clin</u> <u>North Am</u> **91**(4): 553-72; ix.
- Byington, R. P., C. D. Furberg, et al. (2002). "Effect of estrogen plus progestin on progression of carotid atherosclerosis in postmenopausal women with heart disease: HERS B-mode substudy." <u>Arterioscler Thromb Vasc Biol</u> 22(10): 1692-7.
- Camargo, P. M., R. Lagos, et al. (2005). "Prostaglandins E(2) and F(2alpha) enhance differentiation of cementoblastic cells." <u>J Periodontol</u> **76**(2): 303-9.
- Camejo, G., E. Hurt-Camejo, et al. (1999). "Lipid mediators that modulate the extracellular matrix structure and function in vascular cells." <u>Curr Atheroscler Rep</u> **1**(2): 142-9.
- Canfield, A. E., M. J. Doherty, et al. (2000). "Matrix Gla protein is differentially expressed during the deposition of a calcified matrix by vascular pericytes." <u>FEBS Lett</u> **487**(2): 267-71.
- Chambers, T. J. and N. N. Ali (1983). "Inhibition of osteoclastic motility by prostaglandins I2, E1, E2 and 6-oxo-E1." J Pathol **139**(3): 383-97.
- Chang, A. C., J. Janosi, et al. (1995). "A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin." <u>Mol Cell Endocrinol</u> **112**(2): 241-7.
- Chang, A. C. M., J. Cha, et al. (2005). "The Murine Stanniocalcin 1 Gene Is Not Essential for Growth and Development." <u>Mol. Cell. Biol.</u> **25**(23): 10604-10610.
- Cheng, F., D. Heinegard, et al. (1994). "Patterns of uronosyl epimerization and 4-/6-O-sulphation in chondroitin/dermatan sulphate from decorin and biglycan of various bovine tissues." <u>Glycobiology</u> 4(5): 685-96.
- Coates, T., G. S. Kirkland, et al. (1998). "Cutaneous necrosis from calcific uremic arteriolopathy." <u>Am J Kidney Dis</u> **32**(3): 384-91.
- Cormode, E. J., M. Dawson, et al. (1986). "Keutel syndrome: clinical report and literature review." <u>Am J Med Genet</u> **24**(2): 289-94.

- DelloRusso, C., J. M. Scott, et al. (2002). "Functional correction of adult mdx mouse muscle using gutted adenoviral vectors expressing full-length dystrophin." <u>Proc Natl Acad Sci U</u> <u>S A</u> 99(20): 12979-84.
- Edmonds, M. E., N. Morrison, et al. (1982). "Medial arterial calcification and diabetic neuropathy." <u>Br Med J (Clin Res Ed)</u> **284**(6320): 928-30.
- Eifinger, F., F. Wahn, et al. (2000). "Coronary artery calcifications in children and young adults treated with renal replacement therapy." <u>Nephrol Dial Transplant</u> **15**(11): 1892-4.
- Essalihi, R., H. H. Dao, et al. (2005). "Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: a new vascular function for carbonic anhydrase." <u>Circulation</u> **112**(11): 1628-35.
- Evanko, S. P., E. W. Raines, et al. (1998). "Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta." <u>Am J Pathol</u> **152**(2): 533-46.
- Everhart, J. E., D. J. Pettitt, et al. (1988). "Medial arterial calcification and its association with mortality and complications of diabetes." <u>Diabetologia</u> **31**(1): 16-23.
- Farley, J. R. and D. J. Baylink (1986). "Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index in vitro." <u>Metabolism</u> **35**(6): 563-71.
- Farzaneh-Far, A., D. Proudfoot, et al. (2000). "Matrix gla protein is regulated by a mechanism functionally related to the calcium-sensing receptor." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 277(3): 736-40.
- Filvaroff, E. H., S. Guillet, et al. (2002). "Stanniocalcin 1 alters muscle and bone structure and function in transgenic mice." <u>Endocrinology</u> **143**(9): 3681-90.
- Fisher, L. W., S. W. Whitson, et al. (1983). "Matrix sialoprotein of developing bone." J Biol Chem **258**(20): 12723-7.
- Fleischmajer, R., L. W. Fisher, et al. (1991). "Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin." <u>J Struct Biol</u> **106**(1): 82-90.
- Foley, R. N. and P. S. Parfrey (1998). "Cardiovascular disease and mortality in ESRD." J Nephrol **11**(5): 239-45.
- Font, B., E. Aubert-Foucher, et al. (1993). "Binding of collagen XIV with the dermatan sulfate side chain of decorin." J Biol Chem **268**(33): 25015-8.
- Font, B., D. Eichenberger, et al. (1996). "Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon, decorin and fibromodulin." <u>Matrix</u> <u>Biol</u> 15(5): 341-8.
- Fujisawa, R., Y. Nodasaka, et al. (1995). "Further characterization of interaction between bone sialoprotein (BSP) and collagen." <u>Calcif Tissue Int</u> **56**(2): 140-4.

- Furie, B. and B. C. Furie (1992). "Molecular and cellular biology of blood coagulation." <u>N Engl J</u> <u>Med</u> **326**(12): 800-6.
- Gagliardi, A. D., E. Y. Kuo, et al. (2005). "Human stanniocalcin-2 exhibits potent growthsuppressive properties in transgenic mice independently of growth hormone and IGFs." <u>Am J Physiol Endocrinol Metab</u> 288(1): E92-105.
- Gay, B. B., Jr. and J. P. Kuhn (1976). "A syndrome of widened medullary cavities of bone, aortic calcification, abnormal dentition, and muscular weakness (the Singleton-Merten syndrome)." <u>Radiology</u> **118**(2): 389-95.
- Giachelli, C. M., N. Bae, et al. (1993). "Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques." <u>J Clin Invest</u> 92(4): 1686-96.
- Glass, C. K. and J. L. Witztum (2001). "Atherosclerosis. the road ahead." Cell 104(4): 503-16.
- Goncharova, E. A., A. J. Ammit, et al. (2002). "PI3K is required for proliferation and migration of human pulmonary vascular smooth muscle cells." <u>Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol</u> 283(2): L354-63.
- Goodman, W. G., J. Goldin, et al. (2000). "Coronary-artery calcification in young adults with endstage renal disease who are undergoing dialysis." <u>N Engl J Med</u> **342**(20): 1478-83.
- Gough, P. J., I. G. Gomez, et al. (2006). "Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice." <u>J Clin Invest</u> **116**(1): 59-69.
- Guerin, A. P., G. M. London, et al. (2000). "Arterial stiffening and vascular calcifications in endstage renal disease." <u>Nephrol Dial Transplant</u> **15**(7): 1014-21.
- Hansson, G. K., P. Libby, et al. (2002). "Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis." <u>Circ Res</u> **91**(4): 281-91.
- Harmey, D., L. Hessle, et al. (2004). "Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by akp2, enpp1, and ank: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders." <u>Am J Pathol</u> **164**(4): 1199-209.
- Hauschka, P. V., J. B. Lian, et al. (1989). "Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone." <u>Physiol Rev</u> **69**(3): 990-1047.
- Hedbom, E. and D. Heinegard (1993). "Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens." J Biol Chem **268**(36): 27307-12.
- Herrmann, S. M., C. Whatling, et al. (2000). "Polymorphisms of the human matrix gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction." <u>Arterioscler Thromb Vasc</u> <u>Biol</u> **20**(11): 2386-93.

- Hessle, L., K. A. Johnson, et al. (2002). "Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 99(14): 9445-9.
- Higashi, S., H. Ohishi, et al. (2000). "Augmented prostaglandin E2 generation resulting from increased activities of cytosolic and secretory phospholipase A2 and induction of cyclooxygenase-2 in interleukin-1 beta-stimulated rat calvarial cells during the mineralizing phase." Inflamm Res 49(3): 102-11.
- Hildebrand, A., M. Romaris, et al. (1994). "Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta." <u>Biochem J</u> 302 (Pt 2): 527-34.
- Hofbauer, L. C., S. Khosla, et al. (2000). "The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption." <u>J Bone Miner Res</u> **15**(1): 2-12.
- Hofbauer, L. C., C. Shui, et al. (2001). "Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 280(1): 334-9.
- Hoshi, K., S. Kemmotsu, et al. (1999). "The primary calcification in bones follows removal of decorin and fusion of collagen fibrils." <u>J Bone Miner Res</u> **14**(2): 273-80.
- Hunt, J. L., R. Fairman, et al. (2002). "Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study." <u>Stroke</u> **33**(5): 1214-9.
- Hunter, G. K. and H. A. Goldberg (1993). "Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **90**(18): 8562-5.
- Ibels, L. S., A. C. Alfrey, et al. (1979). "Arterial calcification and pathology in uremic patients undergoing dialysis." <u>Am J Med</u> **66**(5): 790-6.
- lozzo, R. V., D. K. Moscatello, et al. (1999). "Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor." J Biol Chem **274**(8): 4489-92.
- Jeziorska, M., C. McCollum, et al. (1998). "Calcification in atherosclerotic plaque of human carotid arteries: associations with mast cells and macrophages." <u>J Pathol</u> **185**(1): 10-7.
- Jiang, W. Q., A. C. Chang, et al. (2000). "The distribution of stanniocalcin 1 protein in fetal mouse tissues suggests a role in bone and muscle development." <u>J Endocrinol</u> 165(2): 457-466.
- Johnson, K. A., L. Hessle, et al. (2000). "Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1." <u>Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol</u> **279**(4): R1365-77.

- Jones, D. A., D. P. Carlton, et al. (1993). "Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines." J Biol Chem **268**(12): 9049-54.
- Jono, S., M. D. McKee, et al. (2000). "Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification." <u>Circ Res</u> **87**(7): E10-7.
- Jono, S., Y. Nishizawa, et al. (1998). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide." <u>Circulation</u> **98**(13): 1302-6.
- Kania, M. A., A. S. Bonner, et al. (1990). "The Drosophila segmentation gene runt encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system." <u>Genes Dev</u> 4(10): 1701-13.
- Ketteler, M., P. Bongartz, et al. (2003). "Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study." <u>Lancet</u> 361(9360): 827-33.
- Kizu, A., A. Shioi, et al. (2004). "Statins inhibit in vitro calcification of human vascular smooth muscle cells induced by inflammatory mediators." <u>J Cell Biochem</u> **93**(5): 1011-9.
- Kohyama, T., X. Liu, et al. (2002). "Prostacyclin analogs inhibit fibroblast migration." <u>Am J</u> <u>Physiol Lung Cell Mol Physiol</u> **283**(2): L428-32.
- Komori, T., H. Yagi, et al. (1997). "Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts." <u>Cell</u> **89**(5): 755-64.
- Kong, Y. Y., H. Yoshida, et al. (1999). "OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis." <u>Nature</u> **397**(6717): 315-23.
- Kovanen, P. T. and M. O. Pentikainen (1999). "Decorin links low-density lipoproteins (LDL) to collagen: a novel mechanism for retention of LDL in the atherosclerotic plaque." <u>Trends</u> <u>Cardiovasc Med</u> 9(3-4): 86-91.
- Kristian, T. and B. K. Siesjo (1998). "Calcium in ischemic cell death." Stroke 29(3): 705-18.
- Krusius, T. and E. Ruoslahti (1986). "Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **83**(20): 7683-7.
- Lehto, S., L. Niskanen, et al. (1996). "Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus." <u>Arterioscler</u> <u>Thromb Vasc Biol</u> **16**(8): 978-83.
- Levy, R. J., F. J. Schoen, et al. (1983). "Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats." <u>Am J Pathol</u> **113**(2): 143-55.

- Li, J., I. Sarosi, et al. (2000). "RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> **97**(4): 1566-71.
- Loeser, R., C. S. Carlson, et al. (1992). "Articular-cartilage matrix gamma-carboxyglutamic acidcontaining protein. Characterization and immunolocalization." <u>Biochem J</u> 282 (Pt 1): 1-6.
- London, G. M., A. P. Guerin, et al. (2003). "Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality." <u>Nephrol Dial Transplant</u> **18**(9): 1731-40.
- Luo, G., P. Ducy, et al. (1997). "Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein." <u>Nature</u> **386**(6620): 78-81.
- Lynch, M. P., J. L. Stein, et al. (1995). "The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization." <u>Exp Cell Res</u> **216**(1): 35-45.
- Madsen, K. L., M. M. Tavernini, et al. (1998). "Stanniocalcin: a novel protein regulating calcium and phosphate transport across mammalian intestine." <u>Am J Physiol</u> **274**(1 Pt 1): G96-102.
- Malyankar, U. M., M. Scatena, et al. (2000). "Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NFkappa B-dependent survival factor for endothelial cells." J Biol Chem **275**(28): 20959-62.
- McCudden, C. R., K. A. James, et al. (2002). "Characterization of Mammalian Stanniocalcin Receptors. MITOCHONDRIAL TARGETING OF LIGAND AND RECEPTOR FOR REGULATION OF CELLULAR METABOLISM." J. Biol. Chem. 277(47): 45249-45258.
- Meyer-Kirchrath, J., S. Debey, et al. (2004). "Gene expression profile of the Gs-coupled prostacyclin receptor in human vascular smooth muscle cells." <u>Biochem Pharmacol</u> 67(4): 757-65.
- Min, H., S. Morony, et al. (2000). "Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis." J Exp Med 192(4): 463-74.
- Mizuno, A., N. Amizuka, et al. (1998). "Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **247**(3): 610-5.
- Mohler, E. R., 3rd, F. Gannon, et al. (2001). "Bone formation and inflammation in cardiac valves." <u>Circulation</u> **103**(11): 1522-8.
- Moncada, S., R. Gryglewski, et al. (1976). "An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation." <u>Nature</u> **263**(5579): 663-5.

- Mori, K., A. Shioi, et al. (1999). "Dexamethasone enhances In vitro vascular calcification by promoting osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells." <u>Arterioscler</u> <u>Thromb Vasc Biol</u> **19**(9): 2112-8.
- Munroe, P. B., R. O. Olgunturk, et al. (1999). "Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome." <u>Nat Genet</u> **21**(1): 142-4.
- Murer, H., N. Hernando, et al. (2001). "Molecular mechanisms in proximal tubular and small intestinal phosphate reabsorption (plenary lecture)." <u>Mol Membr Biol</u> **18**(1): 3-11.
- Murshed, M., D. Harmey, et al. (2005). "Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone." <u>Genes Dev</u> **19**(9): 1093-104.
- Nagy, L., P. Tontonoz, et al. (1998). "Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma." <u>Cell</u> **93**(2): 229-40.
- Nakayama, T. (2005). "Prostacyclin synthase gene: genetic polymorphisms and prevention of some cardiovascular diseases." <u>Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents</u> 3(2): 157-64.
- Nakayama, T. (2006). "Prostacyclin analogues: prevention of cardiovascular diseases." <u>Cardiovasc Hematol Agents Med Chem</u> **4**(4): 351-9.
- Narumiya, S., Y. Sugimoto, et al. (1999). "Prostanoid receptors: structures, properties, and functions." <u>Physiol Rev</u> **79**(4): 1193-226.
- Nauman, E. A., R. L. Satcher, et al. (2001). "Osteoblasts respond to pulsatile fluid flow with short-term increases in PGE(2) but no change in mineralization." <u>J Appl Physiol</u> 90(5): 1849-54.
- Nishiyama, T., A. M. McDonough, et al. (1994). "Type XII and XIV collagens mediate interactions between banded collagen fibers in vitro and may modulate extracellular matrix deformability." J Biol Chem **269**(45): 28193-9.
- O'Keefe, J. H., Jr., C. J. Lavie, et al. (1991). "Degenerative aortic stenosis. One effect of the graying of America." <u>Postgrad Med</u> **89**(2): 143-6,151-4.
- O'Neill, W. C. (2006). "Pyrophosphate, Alkaline Phosphatase, and Vascular Calcification." <u>Circ</u> <u>Res</u> 99(2): e2-.
- Ogawa, E., M. Inuzuka, et al. (1993). "Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha." <u>Virology</u> **194**(1): 314-31.
- Oldberg, A., A. Franzen, et al. (1988). "The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein." <u>J Biol Chem</u> **263**(36): 19430-2.

- Oldberg, A., A. Franzen, et al. (1988). "Identification of a bone sialoprotein receptor in osteosarcoma cells." J Biol Chem **263**(36): 19433-6.
- Olson, J. C., D. Edmundowicz, et al. (2000). "Coronary calcium in adults with type 1 diabetes: a stronger correlate of clinical coronary artery disease in men than in women." <u>Diabetes</u> **49**(9): 1571-8.
- Olsson, U., G. Bondjers, et al. (1999). "Fatty acids modulate the composition of extracellular matrix in cultured human arterial smooth muscle cells by altering the expression of genes for proteoglycan core proteins." <u>Diabetes</u> **48**(3): 616-22.
- Otto, F., A. P. Thornell, et al. (1997). "Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development." <u>Cell</u> **89**(5): 765-71.
- Paciga, M., G. E. DiMattia, et al. (2004). "Regulation of luteal cell big stanniocalcin production and secretion." <u>Endocrinology</u> **145**(9): 4204-12.
- Parhami, F., B. Basseri, et al. (2002). "High-density lipoprotein regulates calcification of vascular cells." <u>Circ Res</u> **91**(7): 570-6.
- Pereira, B., K. K. Wu, et al. (1994). "Molecular cloning and characterization of bovine prostacyclin synthase." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **203**(1): 59-66.
- Price, P. A., J. M. Caputo, et al. (2002). "Bone origin of the serum complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix Gla protein: biochemical evidence for the cancellous boneremodeling compartment." <u>J Bone Miner Res</u> **17**(7): 1171-9.
- Price, P. A., S. A. Faus, et al. (2001). "Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption." <u>Arterioscler</u> <u>Thromb Vasc Biol</u> **21**(5): 817-24.
- Price, P. A., J. D. Fraser, et al. (1987). "Molecular cloning of matrix Gla protein: implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase." <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci U S A</u> 84(23): 8335-9.
- Price, P. A., H. H. June, et al. (2001). "Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D." <u>Arterioscler Thromb Vasc Biol</u> **21**(10): 1610-6.
- Price, P. A., H. H. June, et al. (2002). "SB 242784, a Selective Inhibitor of the Osteoclastic V-H+-ATPase, Inhibits Arterial Calcification in the Rat." <u>Circ Res</u> **91**(6): 547-552.
- Prockop, D. J., A. Colige, et al. (1993). "Mutations in type 1 procollagen that cause osteogenesis imperfecta: effects of the mutations on the assembly of collagen into fibrils, the basis of phenotypic variations, and potential antisense therapies." <u>J Bone Miner Res</u> 8 Suppl 2: S489-92.

- Proudfoot, D., J. N. Skepper, et al. (2000). "Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies." <u>Circ Res</u> 87(11): 1055-62.
- Proudfoot, D., J. N. Skepper, et al. (1998). "Calcification of Human Vascular Cells In Vitro Is Correlated With High Levels of Matrix Gla Protein and Low Levels of Osteopontin Expression." <u>Arterioscler Thromb Vasc Biol</u> **18**(3): 379-388.
- Raisz, L. G., J. Y. Vanderhoek, et al. (1979). "Prostaglandin synthesis by fetal rat bone in vitro: evidence for a role of prostacyclin." <u>Prostaglandins</u> **17**(6): 905-14.
- Ross, F. P., J. Chappel, et al. (1993). "Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption." <u>J Biol Chem</u> 268(13): 9901-7.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med 340(2): 115-26.
- Rumberger, J. A., D. B. Simons, et al. (1995). "Coronary artery calcium area by electron-beam computed tomography and coronary atherosclerotic plaque area. A histopathologic correlative study." <u>Circulation</u> **92**(8): 2157-62.
- Rutsch, F., N. Ruf, et al. (2003). "Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification." <u>Nat Genet</u> **34**(4): 379-81.
- Sampaio Lde, O., M. T. Bayliss, et al. (1988). "Dermatan sulphate proteoglycan from human articular cartilage. Variation in its content with age and its structural comparison with a small chondroitin sulphate proteoglycan from pig laryngeal cartilage." <u>Biochem J</u> 254(3): 757-64.
- Sangiorgi, G., J. A. Rumberger, et al. (1998). "Arterial calcification and not lumen stenosis is highly correlated with atherosclerotic plaque burden in humans: a histologic study of 723 coronary artery segments using nondecalcifying methodology." <u>J Am Coll Cardiol</u> **31**(1): 126-33.
- Sartipy, P., B. Johansen, et al. (2000). "Molecular basis for the association of group IIA phospholipase A(2) and decorin in human atherosclerotic lesions." <u>Circ Res</u> **86**(6): 707-14.
- Schinke, T. and G. Karsenty (1999). "Characterization of Osf1, an osteoblast-specific transcription factor binding to a critical cis-acting element in the mouse Osteocalcin promoters." <u>J Biol Chem</u> 274(42): 30182-9.
- Schlaepfer, D. D. and T. Hunter (1998). "Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs?" <u>Trends Cell Biol</u> **8**(4): 151-7.
- Schmidt, G., H. Robenek, et al. (1987). "Interaction of small dermatan sulfate proteoglycan from fibroblasts with fibronectin." <u>J Cell Biol</u> **104**(6): 1683-91.

- Schoen, F. J. and R. J. Levy (1999). "Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives." J Biomed Mater Res 47(4): 439-65.
- Schoen, F. J., J. W. Tsao, et al. (1986). "Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization." <u>Am J Pathol</u> **123**(1): 134-45.
- Schwarz, U., M. Buzello, et al. (2000). "Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure." <u>Nephrol Dial Transplant</u> **15**(2): 218-23.
- Scott, J. E., C. R. Orford, et al. (1981). "Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. An electron microscopical and biochemical investigation." <u>Biochem J</u> 195(3): 573-81.
- Scott, P. G., T. Nakano, et al. (1989). "Proteoglycans of the articular disc of the bovine temporomandibular joint. II. Low molecular weight dermatan sulphate proteoglycan." <u>Matrix</u> 9(4): 284-92.
- Severson, A. R., R. T. Ingram, et al. (1995). "Matrix proteins associated with bone calcification are present in human vascular smooth muscle cells grown in vitro." <u>In Vitro Cell Dev Biol</u> <u>Anim</u> **31**(11): 853-7.
- Shanahan, C. M., N. R. Cary, et al. (1994). "High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques." <u>J Clin Invest</u> **93**(6): 2393-402.
- Shanahan, C. M., N. R. Cary, et al. (1999). "Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cellmediated vascular calcification." <u>Circulation</u> **100**(21): 2168-76.
- Shearer, M. J. (1995). "Vitamin K." Lancet 345(8944): 229-34.
- Sheikh-Hamad, D., R. Bick, et al. (2003). "Stanniocalcin-1 is a naturally occurring L-channel inhibitor in cardiomyocytes: relevance to human heart failure." <u>Am J Physiol Heart Circ</u> <u>Physiol</u> 285(1): H442-448.
- Siesjo, B. K. and F. Bengtsson (1989). "Calcium fluxes, calcium antagonists, and calciumrelated pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis." <u>J Cereb Blood Flow Metab</u> 9(2): 127-40.
- Simonet, W. S., D. L. Lacey, et al. (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density." <u>Cell</u> **89**(2): 309-19.
- Speer, M. Y. and C. M. Giachelli (2004). "Regulation of cardiovascular calcification." <u>Cardiovasc</u> <u>Pathol</u> **13**(2): 63-70.

- Steitz, S. A., M. Y. Speer, et al. (2001). "Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated With Calcification: Upregulation of Cbfa1 and Downregulation of Smooth Muscle Lineage Markers." <u>Circ Res</u> 89(12): 1147-1154.
- Steitz, S. A., M. Y. Speer, et al. (2002). "Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification." <u>Am J Pathol</u> **161**(6): 2035-46.
- Stern, P. H., G. Shankar, et al. (1991). "Salmon stanniocalcin and bovine parathyroid hormone have dissimilar actions on mammalian bone." <u>J Bone Miner Res</u> **6**(11): 1153-9.
- Stoff, J. S. (1982). "Phosphate homeostasis and hypophosphatemia." <u>Am J Med</u> 72(3): 489-95.
- Svensson, L., D. Heinegard, et al. (1995). "Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5." J Biol Chem **270**(35): 20712-6.
- Takizawa, T., M. Kawahata, et al. (1999). "Smooth muscle cell proliferation in the ductus arteriosus and the descending aorta, and effects of enalapril on SMC proliferation in perinatal rats." <u>J Vet Med Sci</u> 61(11): 1215-8.
- Tanimura, A., D. H. McGregor, et al. (1983). "Matrix vesicles in atherosclerotic calcification." <u>Proc Soc Exp Biol Med</u> **172**(2): 173-7.
- Tao, Z., F. W. Smart, et al. (1997). "Elevated expression of proteoglycans in proliferating vascular smooth muscle cells." <u>Atherosclerosis</u> 135(2): 171-9.
- Tintut, Y., F. Parhami, et al. (1998). "cAMP stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells. Potential signaling pathway for vascular calcification." <u>J Biol Chem</u> 273(13): 7547-53.
- Tintut, Y., J. Patel, et al. (2000). "Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway." <u>Circulation</u> **102**(21): 2636-42.
- Tintut, Y., J. Patel, et al. (2002). "Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification in vitro." <u>Circulation</u> **105**(5): 650-5.
- Uehara, Y., T. Ishimitsu, et al. (1988). "Regulatory effects of eicosanoids on thymidine uptake by vascular smooth muscle cells of rats." <u>Prostaglandins</u> **36**(6): 847-57.
- Vuorio, E. and B. de Crombrugghe (1990). "The family of collagen genes." <u>Annu Rev Biochem</u> **59**: 837-72.
- Wagner, G. F., C. Milliken, et al. (1991). "Studies on the regulation and characterization of plasma stanniocalcin in rainbow trout." <u>Mol Cell Endocrinol</u> **79**(1-3): 129-38.
- Walenga, R. W. and W. Bergstrom (1985). "Stimulation of calcium uptake in rat calvaria by prostacyclin." <u>Prostaglandins</u> **29**(2): 191-202.
- Wallin, R., D. Cain, et al. (2000). "Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)." <u>Thromb Haemost</u> **84**(6): 1039-44.

- Wallin, R., D. Cain, et al. (1999). "Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell system which resembles the system in bone cells." <u>Thromb Haemost</u> 82(6): 1764-7.
- Wang, J., H. Y. Zhou, et al. (2006). "Site-specific in vivo calcification and osteogenesis stimulated by bone sialoprotein." <u>Calcif Tissue Int</u> **79**(3): 179-89.
- Weber, I. T., R. W. Harrison, et al. (1996). "Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis." <u>J Biol Chem</u> **271**(50): 31767-70.
- Weiss, H. J. and V. T. Turitto (1979). "Prostacyclin (prostaglandin I2, PGI2) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium." <u>Blood</u> **53**(2): 244-50.
- Weiss, M. J., K. Ray, et al. (1989). "Analysis of liver/bone/kidney alkaline phosphatase mRNA, DNA, and enzymatic activity in cultured skin fibroblasts from 14 unrelated patients with severe hypophosphatasia." <u>Am J Hum Genet</u> 44(5): 686-94.
- Wennberg, C., L. Hessle, et al. (2000). "Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice." <u>J Bone Miner Res</u> **15**(10): 1879-88.
- Whinna, H. C., H. U. Choi, et al. (1993). "Interaction of heparin cofactor II with biglycan and decorin." J Biol Chem **268**(6): 3920-4.
- Whyte, M. P., D. A. Walkenhorst, et al. (1996). "Hypophosphatasia: levels of bone alkaline phosphatase immunoreactivity in serum reflect disease severity." <u>J Clin Endocrinol</u> <u>Metab</u> 81(6): 2142-8.
- Winnemoller, M., P. Schon, et al. (1992). "Interactions between thrombospondin and the small proteoglycan decorin: interference with cell attachment." <u>Eur J Cell Biol</u> **59**(1): 47-55.
- Yoon, K., E. Golub, et al. (1989). "Alkaline phosphatase cDNA transfected cells promote calcium and phosphate deposition." Connect Tissue Res **22**(1-4): 17-25; discussion 53-61.
- Yoshiko, Y., J. E. Aubin, et al. (2002). "Stanniocalcin 1 (STC1) protein and mRNA are developmentally regulated during embryonic mouse osteogenesis: the potential of stc1 as an autocrine/paracrine factor for osteoblast development and bone formation." J <u>Histochem Cytochem</u> **50**(4): 483-92.
- Zebboudj, A. F., V. Shin, et al. (2003). "Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells." <u>J Cell Biochem</u> **90**(4): 756-65.
- Zhang, K., P. J. Lindsberg, et al. (2000). "Stanniocalcin: A molecular guard of neurons during cerebral ischemia." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **97**(7): 3637-42.
- Zhang, X., E. M. Schwarz, et al. (2002). "Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair." <u>J Clin</u> <u>Invest</u> **109**(11): 1405-15.

Zlot, C., G. Ingle, et al. (2003). "Stanniocalcin 1 is an autocrine modulator of endothelial angiogenic responses to hepatocyte growth factor." J Biol Chem **278**(48): 47654-9.

8 Veröffentlichungen

Tagungen und Kongresse

C.P. Glandorff, K. Schrör, J. Meyer-Kirchrath (2003). Iloprost inhibits calcification of human vascular smooth muscle cells Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 367 Suppl 1:R66(250)

C.P. Glandorff, J.W. Fischer, M. Sarbia, K. Schrör, J. Meyer-Kirchrath (2004). Stanniocalcin-1 expression in vascular smooth muscle cells Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 369 Suppl 1:(138)

C. Glandorff, J. Meyer-Kirchrath, A.A. Weber, K. Schrör, J.W. Fischer (2006). Prostacyclin inhibits calcification of human vascular smooth muscle cell in culture Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 373 Suppl 1:90(303)

C. Glandorff, A. Marzoll, J. Meyer-Kirchrath, K. Schrör, J.W. Fischer (2006) Prostacyclin Inhibits Calcification of Human Vascular Smooth Muscle Cells in Culture. Atherosclerosis Suppl. Vol. 7, No 3, (247)

Veröffentlichung in Fachzeitschriften

J. Meyer-Kirchrath, S. Debey, C. Glandorff, L. Kirchrath, K. Schrör. Gene expression profile of the Gs-coupled prostacyclin receptor in human vascular smooth muscle cells. Biochem Pharmacol 67(4): 757-65

9 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 1. November 2007

Christian Glandorff

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. J.W. Fischer und Frau PD Dr. rer. nat. J. Meyer-Kirchrath für die Überlassung der Fragestellungen, die Unterstützung bei der Realisierung der Dissertation und das hilfreiche Gespräch.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. K. Schrör für die stets ermunternden Worte und alle Möglichkeiten, die sich mir am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie boten. Erst die Unterstützung durch sein gesamtes Team ermöglichte diese Arbeit.

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

Ein aufrichtiger Dank geht an Frau Petra Kuger, Düsseldorf, die mir bei so manch kniffeligem Problem zur Seite stand.

Mein weiterer Dank gilt Frau Peggy Mann für die praktische Unterstützung bei der Decorinaufarbeitung und Frau Berit Rabausch für die Hilfe bei den Migrationsversuchen.

Herrn Sören Twarock danke ich für all die konstruktiven Vorschläge bei der Korrektur dieser Arbeit.

Zuletzt gilt mein Dank allen Kollegen, die durch ihre freundschaftliche Art dazu beitrugen, diese Zeit in guter Erinnerung zu behalten.

11 Lebenslauf

Christian Glandorff

- Geburtsdatum : 30.3.1970
- Geburtsort : Oberhausen Rhl.
- Nationalität : deutsch

Schulische Ausbildung + beruflicher Werdegang

| 1980 – 1989 | Heinrich-Heine Gymnasium Oberhausen |
|-------------|---|
| 1989 – 1991 | Zivildienst St. Elisabeth-Krankenhaus, Oberhausen |

Studium + Promotion

| 1991 – 1994 | Studium der Pharmazie: Johann Wolfgang von Goethe Universität Frankfurt am Main |
|-------------|---|
| | Unterbrechung des Studiums aus gesundheitlichen Gründen |
| 1995 – 2000 | Studium der Pharmazie: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf |
| 2001 – 2002 | Praktisches Jahr: 1. Licht Apotheke Düsseldorf 2. Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf |
| 2002 – 2007 | Promotion am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf Direktor: Prof. Dr. med. K. Schrör |
| | Fachliche Betreuung: Prof. Dr. rer. nat. J.W. Fischer, PD Dr. rer. nat. J. Meyer-Kirchrath |

Düsseldorf, den 1. November 2007