

Aus der
Klinik für Innere Medizin III
Kardiologie, Angiologie, internistische Intensivmedizin
(Direktor: Universitäts-Professor Dr. med. Michael Böhm)

Fakultät 2 (Medizinische Fakultät – Klinische Medizin)
der Universität des Saarlandes, Homburg / Saar

**Die Bedeutung der monozytären Rac1 GTPase
und der glattmuskulären Integrin-Linked Kinase
für die Pathogenese der Atherosklerose**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2007

vorgelegt von

Yvonne Patricia Clever
geboren am 03.01.1976
in Remscheid

Dekan: Universitäts-Professor Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Universitäts-Professor Dr. med. Michael Böhm

2. Berichterstatter:

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche erkenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und der Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützung erhalten. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Homburg, den 15.04.2007

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Michael Böhm danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation in den Forschungslaboren der Klinik III für Innere Medizin der Universitätskliniken des Saarlandes erstellen zu können.

Herrn Professor Dr. med. Georg Nickenig danke ich für die Überlassung des Themas und seine wissenschaftliche Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Erik Friedrich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung in allen Abschnitten der Durchführung dieser Arbeit.

Ich möchte mich auch bei den technischen Assistenten, bei allen Doktoranden und wissenschaftlich tätigen Ärzten im Labor für die Möglichkeit bedanken, mit Ihnen im Team zusammenarbeiten zu dürfen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	10
1.1 Die Bedeutung der monozytären Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) und der glattmuskulären Integrin-Linked Kinase (ILK) für die Pathogenese der Atherosklerose.....	10
1.2 The role of the monocyte Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) and the smooth muscle Integrin-Linked Kinase (ILK) for the pathogenesis of atherosclerosis	13
2. Einleitung.....	16
2.1 Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen	16
2.2 Die Rolle von Monozyten und glatten Gefäßmuskelzellen bei der Pathogenese der Atherosklerose	18
2.3 Die Rolle von Chemokinen und ihre Wirkung auf intrazelluläre Signalwege bei der Pathogenese der Atherosklerose	19
2.4 Bedeutung der monozytären Rac1 Guanosintriphosphatase und der glattmuskulären Integrin-Linked Kinase bei der Pathogenese der Atherosklerose.....	20
2.5 Wirkstoffe als Modulationsfaktoren der Atherogenese.....	22
2.5.1 17 β -Östradiol als anti-atherosklerotischer Modulationsfaktor der Atherogenese	22
2.5.2 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A Reduktase-Hemmer (Statine) als anti-atherosklerotische Modulationsfaktoren der Atherogenese	23
2.5.3 Angiotensin II als pro-atherosklerotischer Modulationsfaktor der Atherogenese	23
2.5.4 Angiotensin II Rezeptorantagonisten (Sartane) als anti-atherosklerotische Modulationsfaktoren der Atherogenese	24
3. Materialien und Methoden	25
3.1 Materialien	25
3.1.1 Substanzen und Antikörper.....	25
3.1.2 Versuchstiere	29
3.1.3 Zellkultur-Materialien.....	29
3.1.4 Lösungen, Nährmedien und Puffer	30
3.1.5 Geräte und Software	33
3.2 Methoden	34
3.2.1 Zellisolierung und Zellkultur	34
3.2.1.1 Isolierung primärer mononukleärer Zellen.....	34
3.2.1.2 Bead-Aufreinigung primärer Monozyten	35
3.2.1.3 Isolierung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC).....	35
3.2.1.4 Immunhistochemische Charakterisierung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC).....	36
3.2.1.5 Zellkultur primärer Monozyten und monozytärer THP-1-Zellen	37
3.2.1.6 Zellkultur glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)	37
3.2.1.7 Zellkultur humaner Endothelzellen aus Nabelschnur-Venen (HUVEC)	38
3.2.2 Transfektion.....	39
3.2.2.1 Transfektion monozytärer THP- 1-Zellen mit Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) cDNA Plasmiden.....	39
3.2.2.2 Transfektion glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) mit Integrin-Linked Kinase (ILK) cDNA Plasmiden.....	40
3.2.3 Durchflusszytometrie (Fluoreszenz aktiviertes Zell-Sortier-System, FACS).....	41
3.2.3.1 CD14 Oberflächenbestimmung primärer Monozyten	41
3.2.3.2 Apoptosemessung transfizierter glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC).....	41
3.2.4 Messung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) im L-012 Assay	42
3.2.5 Biochemische Assays	43
3.2.5.1 Messung SDF-1 α -getriggelter Aktivierung von Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) in monozytären THP-1-Zellen (GST-PAK Pull-Down Assay).....	43
3.2.5.2 Messung der Expression der Integrin-linked Kinase (ILK) in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC).....	46
3.2.5.3 Messung der Aktivität der Integrin-linked Kinase (ILK) in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) (Kinase-Assay).....	48

3.2.6	Funktionelle Assays.....	50
3.2.6.1	F-Aktin Phalloidin-Färbung von Aktin-Zytoskelett-Strukturen.....	50
3.2.6.2	Adhäsions-Versuch in der Flusskammer.....	51
3.2.6.3	Messung der Migrationsrate glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC).....	54
3.2.6.4	Messung der Proliferationsrate glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC).....	54
3.2.6.5	Messung der Apoptoserate glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC).....	55
3.2.7	Tierversuche und Immunhistochemie.....	56
3.2.7.1	Tierversuche.....	56
3.2.7.2	Immunhistochemische Färbung von Aortenschnitten.....	56
3.2.8	Statistische Analyse.....	57
4.	Ergebnisse.....	58
4.1	17 β -Östradiol hemmt die Monozyten-Adhäsion unter Fluss-Bedingungen.....	58
4.2	17 β -Östradiol hemmt die Monozyten-Adhäsion durch Herabregulation der monozytären Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase).....	60
4.3	Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) wird durch SDF-1 α aktiviert und vermittelt die Adhäsion von Monozyten unter Flussbedingungen.....	63
4.4	Mechanismus der Rac1-vermittelten Monozyten-Adhäsion.....	66
4.5	Die Integrin-Linked Kinase (ILK) vermittelt die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC).....	71
4.6	Regulation der Integrin-Linked Kinase (ILK) durch Angiotensin II und 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA) Reduktase-Hemmer (Statin).....	75
4.7	Die Integrin-Linked Kinase (ILK) vermittelt Angiotensin II- und 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA) Reduktase-Hemmer (Statin) -induzierte Effekte auf die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC).....	79
4.8	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA) Reduktase-Hemmer (Statin) vermittelte Regulation der Integrin-Linked Kinase (ILK) in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) in vivo.....	83
5.	Diskussion.....	85
5.1	Die Bedeutung der monozytären Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) in Monozyten für die Pathogenese der Atherosklerose.....	85
5.2	Die Bedeutung der glattmuskulären Integrin-Linked Kinase (ILK) in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) für die Pathogenese der Atherosklerose.....	88
6.	Literaturverzeichnis.....	91
7.	Publikationen.....	99
8.	Lebenslauf.....	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1:	Schema-Zeichnung der laminaren Flusskammer (Parallel-Plate Flow Chamber, Immunetics, Cambridge, MA).....	52
Abbildung 3-2:	Photografische Darstellung der laminaren Flusskammer (Parallel-Plate Flow Chamber, Immunetics, Cambridge, MA (großes Bild) und der Zellkultur-Kammer (kleines Bild)).....	53
Abbildung 4-1	17 β -Östradiol hemmt die Adhäsion monozytärer THP-1-Zellen unter Flussbedingungen durch Herabregulation der monozytären Rac1 GTPase.	59
Abbildung 4-2:	17 β -Östradiol hemmt die Aktivität der monozytären Rac1 GTPase (GST-PAK Pull-Down Assay).....	61
Abbildung 4-3:	17 β -Östradiol hemmt die Aktivität der monozytären Rac1 GTPase.	62
Abbildung 4-4:	Rac1 vermittelt die Adhäsion monozytärer THP-1-Zellen unter Flussbedingungen.....	64
Abbildung 4-5:	Die Rac1-Aktivität in monozytären THP-1-Zellen wird zeitabhängig von SDF-1 α getriggert (GST-PAK Pull-Down Assay).....	65
Abbildung 4-6:	Die ROS-Freisetzung ist Rac1-abhängig (L-012 Assay).....	67
Abbildung 4-7:	Rac1 induziert basale und SDF-1 α -getriggerte Freisetzung von ROS und die Ausbildung Pseudopodien-artiger Veränderungen von Aktin-Zytoskelett-Strukturen (Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen).....	68
Abbildung 4-8:	Die Rac1 GTPase induziert durch Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts eine ROS-unabhängige Adhäsion von monozytären THP-1-Zellen.	70
Abbildung 4-9:	Die ILK hat in VSMC keinen Einfluss auf die Apoptoserate (FACS-Auswertung).	71
Abbildung 4-10:	Die optimale SDF-1 α Konzentration wurde in Vorversuchen ermittelt. Die VSMC-Migrationsrate korreliert mit der Höhe der SDF-1 α Konzentration (Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen).	72
Abbildung 4-11:	Die ILK fördert in VSMC die Migration (Migrations-Versuch).....	73
Abbildung 4-12:	Die ILK fördert in VSMC die Proliferation (Zell-Zählung).....	74
Abbildung 4-13:	Angiotensin II fördert die ILK-Expression zeitabhängig (Western Blot).	76
Abbildung 4-14:	Angiotensin II fördert die ILK-Aktivität zeitabhängig (Kinase Assay).	77
Abbildung 4-15:	Statine hemmen ILK-Expression und ILK-Aktivität zeitabhängig (Western Blot).	78
Abbildung 4-16:	Statine hemmen die Expression und Aktivität der ILK (Western Blot und Kinase-Assay).....	80
Abbildung 4-17:	Statine hemmen die VSMC-Proliferation, Angiotensin II fördert die VSMC-Proliferation auf einem ILK-abhängigen Signalweg.....	81
Abbildung 4-18:	Statine hemmen die VSMC-Migration, Angiotensin II fördert die VSMC-Migration (Migrations-Versuch) auf einem ILK-abhängigen Signalweg.....	82
Abbildung 4-19:	Anreicherung von ILK und VSMC in atherosklerotisch geschädigten Gefäßwänden im Vergleich (Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen).....	84

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	Angina pectoris
ApoE -/-	Apolipoprotein E Defizienz
AT II	Angiotensin II
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DN	dominant-negativ
FACS	Fluoreszenz-aktiviertes Zell-Sortier-System
g	Gramm
G	Schleuderziffer der Zentrifuge
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HMG-CoA-Reduktase-Hemmer	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A Reduktase-Hemmer, Statin
HUVEC	humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen
ILK	Integrin-gekoppelte Kinase
l	Liter
mA	Milliampere
MCP-1	Monozyten-Chemotaktisches-Protein-1
Min.	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimolar
mol	Molar
ng	Nanogramm
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PEG-SOD	Polyethylenglykol-Superoxid-Dismutase
PRIND	prolongiertes reversibles ischämisches neurologisches Defizit
ROS	reaktive Sauerstoffradikale
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.	siehe

S.	Seite
SDF-1 α	Stromazell-Faktor 1 α
Statine	HMG-CoA-Reduktase-Hemmer
TIA	transitorische ischämische Attacke
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
vs.	gegen
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsions-Molekül 1
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen
WT	Wildtyp
Sek.	Sekunde
μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm
μ mol	Mikromolar

1. Zusammenfassung

1.1 Die Bedeutung der monozytären Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) und der glattmuskulären Integrin-Linked Kinase (ILK) für die Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen sind in den westlichen Industrienationen ursächlich für mehr als die Hälfte aller Todesfälle. Die Atherosklerose wird nach der Response-To-Injury-Theorie als Entzündungsantwort auf einen Verletzungsreiz angesehen. Beim pathophysiologischen Ablauf der Entzündungsreaktion ist die Chemokin-vermittelte Rekrutierung von im Blut zirkulierenden Monozyten und wandständigen glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) der Gefäß-Media ein entscheidender erster Schritt der Atherogenese. Zunächst werden Monozyten und VSMC über Chemokin-vermittelte Signalwege rekrutiert und aktiviert. Der darauf folgende, für die Entstehung der Atherosklerose wesentliche Schritt stellt bei den Monozyten die Adhäsion an das Endothel, bei den VSMC die Migration und Proliferation im geschädigten Gewebe dar. Monozyten und VSMC setzen den Entzündungsprozess in Gang, halten ihn aufrecht und tragen zur Ausdehnung der atherosklerotischen Läsionen bei. Trotz ihrer wesentlichen Bedeutungen sind die Funktionen der Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) in Monozyten und der Integrin-linked Kinase (ILK) in VSMC für die Pathogenese der Atherosklerose nicht hinreichend untersucht. Die vorgelegte Arbeit untersucht zum einen den Einfluß von 17β -Östradiol, dem anti-atherosklerotische Wirkungen zugeschrieben werden, auf die Funktion von Rac1 GTPase bei der Adhäsion SDF-1 α -stimulierter primärer Monozyten und monozytärer THP-1-Zellen und zum anderen die Rolle der ILK bei Statin- und Angiotensin II-vermittelter Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen.

Über die Funktion der Rac1 GTPase ist bekannt, dass sie eine wichtige Rolle bei der Integrin-abhängigen Adhäsion von T-Lymphozyten und Fibroblasten spielt. Die bisher nicht aufgeklärte Wirkung der Rac1 GTPase auf die Adhäsion von Monozyten wurde unter der Hypothese untersucht, dass Rac1 GTPase sowohl für die SDF-1 α -induzierte, von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) abhängigen Adhäsion, als auch für die morphologischen und funktionellen Veränderungen des monozytären Aktin-Zytoskeletts von Bedeutung ist. Hierauf basierend wurde der Zusammenhang zwischen der Aktivität der Rac1 GTPase und der atheroprotektiven Wirkung von 17β -Östradiol hinsichtlich der Adhäsion von Monozyten untersucht.

In Adhäsions-Versuchen unter physiologischen Flussbedingungen in der laminaren Flusskammer konnte nachgewiesen werden, dass 17 β -Östradiol die Monozyten-Adhäsion Dosisabhängig hemmt. Als Hinweis auf eine Regulation der Rac1 GTPase durch 17 β -Östradiol zeigte sich, dass die Transfektion monozytärer THP-1-Zellen mit konstitutiv-aktiven Rac1L61 cDNA Plasmiden die durch 17 β -Östradiol hervorgerufene Hemmung der Monozyten-Adhäsion aufheben konnte. Mittels GST-PAK Pull-Down Assays konnte bewiesen werden, dass 17 β -Östradiol die Monozyten-Adhäsion durch Modulation der Aktivität der Rac1 GTPase in Monozyten hemmt. In weiteren Adhäsions-Versuchen wurde gezeigt, dass die Adhäsion von Monozyten durch Rac1 vermittelt wird. THP-1-Monozyten, die mit konstitutiv-aktiven Rac1L61 cDNA Plasmiden transfiziert wurden, zeigten einen signifikanten Anstieg der Adhäsion, wohingegen Monozyten, die mit dominant-negativem Rac1N167 cDNA Plasmiden transfiziert wurden, eine signifikante Verminderung der Adhäsion aufwiesen. Zugabe von SDF-1 α führte zu einer rapiden Adhäsion von Monozyten, die durch Transfektion mit konstitutiv-aktiven Rac1L61 cDNA Plasmiden potenziert werden konnte. Im GST-PAK Pull-Down Assays wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung von Rac1 GTPase durch SDF-1 α getriggert wird. Durch Messung der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) sowie durch morphologische Analyse von F-Aktin Phalloidin gefärbten Zytoskelett-Strukturen wurde nachgewiesen, dass die Adhäsion von Monozyten mechanistisch durch die Ausbildungen Pseudopodien-artiger Zytoskelett-Strukturen in Abhängigkeit von der Aktivität der Rac1 GTPase bewirkt wird, wohingegen die Rac1-abhängige Freisetzung von ROS hier mechanistisch keine Rolle spielt.

Die ILK wird als pleiotropes Signalprotein von einer Vielzahl von Zellen exprimiert. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die ILK dort eine Schlüsselrolle bei der Apoptose, Proliferation, Adhäsion und Migration einnimmt. Die Rolle der ILK bei der Migration und Proliferation von VSMC wurde bisher jedoch nicht erforscht. In der vorgelegten Arbeit wurde die ILK in VSMC unter der Annahme einer atheroprotektiven Wirkung untersucht. Nach Transfektion mit Wild-Typ sowie dominant-negativen ILK cDNA Plasmiden wurden bei ILK-defizienten VSMC verminderte Migrations- und Proliferationsraten nachgewiesen. Demgegenüber waren Migrations- und Proliferationsraten in ILK-überexprimierenden Zellen signifikant erhöht. Es zeigte sich keine ILK-abhängige Wirkung auf die Überlebensrate der VSMC.

Zur näheren Bestimmung des zugrunde liegenden Mechanismus wurden VSMC mit dem proatherosklerotischen Wirkstoff Angiotensin II und einem 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A Reduktase-Hemmer (HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (Statin)) als potenter Gegenspieler der Atherogenese behandelt. Angiotensin II bewirkte einen deutlichen Anstieg der ILK-Expression und Kinase-Aktivität, gegensätzlich dazu zeigte sich nach Behandlung mit Statinen eine Herabregulierung von ILK-Expression und -Aktivität. Dementsprechende Ergebnisse konnten anhand funktioneller Assays verifiziert werden. Unter Behandlung mit Angiotensin II konnte ein deutlicher, ILK-abhängiger Anstieg der Migrations- und Proliferationsrate nachgewiesen werden, wohingegen Statine sowohl die Migration als auch die Proliferation signifikant verringerten. In vivo wurde das Vorkommen der ILK in Aorten gesunder (Wild-Typ) Mäuse und in Aorten Atherosklerose-kranker Apolipoprotein E-defizienter (ApoE $-/-$) Mäuse untersucht. In atherosklerotischen Plaques von ApoE $-/-$ Mäusen konnte eine starke Anreicherung der ILK in VSMC nachgewiesen werden. Hingegen zeigte sich in Aorten gesunder Tiere und nach Statin-Behandlung eine deutlich schwächere Anreicherung von ILK in VSMC.

Die vorgelegte Arbeit zeigt zum einen, dass die Rac1 GTPase eine Schlüsselrolle bei der Adhäsion von Monozyten einnimmt. 17β -Östradiol ist ein potenter Hemmstoff der Rac1-Aktivität und damit ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt in der Prävention und Therapie der Atherosklerose. Die Arbeit zeigt zum anderen, dass ILK für die VSMC-Migration und VSMC-Proliferation von zentraler Bedeutung ist. Die gegensätzlichen Effekte von Angiotensin II und Statin auf VSMC werden durch ILK vermittelt. Somit stellt ebenfalls ILK einen neuen Angriffspunkt in der Atherosklerose-Prävention und -Therapie dar.

1.2 The role of the monocyte Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) and the smooth muscle Integrin-Linked Kinase (ILK) for the pathogenesis of atherosclerosis

Atherosclerosis and its subsequent diseases cause more than half of all cases of death in the western industrialized countries. Corresponding to the response-to-injury-theory, atherosclerosis is defined as an inflammatory response to an injury stimulus. Pathophysiologically, chemokine-induced recruitment of circulating monocytes from peripheral blood and of vascular smooth muscle cells (VSMC) from the media layer of the vessel wall media plays a pivotal role in the inflammatory process and represents an important step in atherogenesis. In the first step of this process, monocytes and VSMC are activated and recruited by chemokine-induced signalling pathway which is a crucial step in the pathogenesis of atherosclerosis. In this process, monocytes adhere to the endothelium of the vessel wall and VSMC migrate to the intima layer and proliferate inside the inflamed tissue. Monocytes as well as VSMC initiate and maintain inflammation and contribute to the expansion of atherosclerotic lesions. Although it is known that Rac1 and ILK play an important role in the regulation of signalling pathways and diverse cellular functions, the roles of Rac1 in monocytes and of ILK in VSMC for the pathogenesis of atherosclerosis are incompletely understood.

The present work investigates the effects of 17 β -estradiol on Rac1-mediated SDF-1 α -stimulated adhesion of monocytes, and the role of ILK in Statin- and Angiotensin II-induced proliferation and migration of VSMC.

It is known that Rac1 plays an important role in integrin-dependent adhesion of T-lymphocytes and fibroblasts. We investigated the impact of Rac1 on monocyte adhesion as data suggested that Rac1 may be important for SDF-1-induced ROS-dependent cell adhesion as well as for morphological and functional changes of the monocyte actin-cytoskeleton. Based on this we investigated the relationship between activation of Rac1 and atheroprotective effects of 17 β -estradiol in monocyte adhesion. Adhesion experiments carried out under physiological flow conditions in the laminar flow chamber show dose-dependent inhibition of monocyte-adhesion after treatment with 17 β -estradiol. 17 β -estradiol mediates its effects via regulation of Rac1 as transduction of monocytic THP-1 cells with constitutively-active Rac1L61 cDNA constructs reverses the inhibitory effect conferred by 17 β -estradiol on monocyte adhesion. GST-PAK pull-down assays show that 17 β -estradiol inhibits monocyte adhesion by negatively modulating Rac1 activity in monocytes.

Furthermore, adhesion experiments show that monocyte adhesion is mediated by Rac1. In that respect, transduction of THP-1 monocytes with constitutively-active Rac1L61 results in a significant increase in adhesion, whereas dominant-negative Rac1N17-transduced cells exhibit a significant decrease in endothelial adhesion. Addition of SDF-1 α rapidly induced monocyte adhesion, which is augmented in constitutively-active Rac1L61-transduced cells. Using GST-PAK pull-down assays it was shown that activation of Rac1 is triggered by SDF-1 α . Measurement of ROS-release and morphological analysis of F-actin phalloidin stained monocyte cytoskeleton show that monocyte adhesion mechanistically depends on Rac1-triggered formation of lamellopodia but is independent from ROS-release.

ILK is a pleiotropic signalling protein and is expressed in various cell types. Several studies have previously identified ILK as a key regulator in apoptosis, proliferation, adhesion, and migration. However, the functional role of ILK in VSMC apoptosis, migration, and proliferation is unknown. In VSMC transduced with dominant-negative ILK cDNA constructs, ILK-deficiency diminishes VSMC migration and proliferation. In contrast wild-type ILK-transduced VSMC ILK-overexpression significantly increases rates of cell migration and proliferation. In contrast, transfection experiments showed that ILK has no effect on VSMC survival. To further characterize the underlying molecular mechanism, VSMC were treated with the pro-atherogenic mediator angiotensin II or an anti-atherogenic statin. Treatment with angiotensin II significantly increases ILK-expression and kinase activity while statins down-regulate ILK-expression and activity. Corresponding effects were verified in functional assays. Angiotensin II-treatment conspicuously increases cell migration and proliferation in an ILK-dependent manner, whereas treatment with statins significantly decreases migration and proliferation capacity of VSMC.

In vivo, we investigated the expression of ILK in aortic sections of wild-type mice before and after statin treatment as well as in apoE-deficient atherosclerotic mice. ILK is up-regulated in VSMC in aortic sections following induction of atherosclerosis in apoE-deficient mice. In contrast, statin treatment suppresses ILK-expression in VSMC in vessel walls of wild-type mice.

The present work demonstrates that rac1 plays a key role in monocyte adhesion. 17 β -estradiol inhibits monocyte adhesion via down-regulation of Rac1 activity which points to novel strategies for the prevention and therapy of atherosclerosis. Additionally, our results indicate that ILK plays a major role in VSMC migration and proliferation. We show that the opposing effects of angiotensin II and statins on VSMC are mediated at least in part by ILK. Thus, ILK may represent a new target in the prevention and therapy of atherosclerosis.

2. Einleitung

2.1 Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen

Die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen verursachen in den westlichen Industrienationen mehr als die Hälfte aller Todesfälle [1, 2]. In atherosklerotisch geschädigten Gefäßen führt die progrediente Lumeneinengung zu Minderperfusion und Sauerstoffdefizit mit konsekutiver Funktionseinschränkung des Gewebes. Von der Atherosklerose kann jeder Teil des arteriellen Gefäßsystems betroffen sein. Entsprechend vielfältig sind die Folgeerkrankungen: Atherosklerose kann zu Schlaganfall und peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) führen [3 - 5]; atherosklerotische Veränderungen der Herzkranzgefäße führen zu Myokardischämie, Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz [6 - 8]. Die koronare Herzkrankheit ist unter der männlichen Bevölkerung die häufigste Todesursache der manifesten Atherosklerose [7]. Das Krankheitsbild Atherosklerose wurde zunächst als reine Lipidspeicherkrankheit verstanden. Weiterführende Studien zeigten jedoch, daß sich die Pathogenese der Atherosklerose weitaus komplexer darstellte und neu definiert werden musste [9]. Heute bestehen zur Pathogenese der Atherosklerose mehrere Theorien, denen allen nach der Response-To-Injury-Theorie eine initiale Endothelverletzung mit nachfolgender Entzündungsantwort zugrunde gelegt wird [10, 11]. Eine Vielzahl von endogenen, genetisch bedingten und exogenen Risikofaktoren ist bekannt. Diese Risikofaktoren werden als schädigende Agenzien definiert, die die Grundvoraussetzung zur Entstehung der Atherosklerose darstellen. Zu den Risikofaktoren gehören neben anderen: Geschlecht, Alter, pathologische erhöhte Blutfettwerte (Hypercholesterinämie) und Blutzuckerwerte (Diabetes mellitus), arterielle Hypertonie, Östrogenmangel und Nikotinabusus [12 – 17].

Der pathophysiologische Prozess der Atherogenese beginnt mit einer endothelialen Dysfunktion, die aufgrund einer Verletzung des Endothels durch schädigende Agenzien entsteht und zu einer Entzündungsreaktion führt. Freigesetzte Entzündungsmediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin, platelet-derived growth factor (PDGF), Angiotensin II und Endothelin erhöhen die Endotheldurchlässigkeit für Lipoproteine und Entzündungszellen. Zunächst lagern sich im geschädigten Gewebe Lipoproteine in die Intima ein. Dieser Prozess ruft eine Entzündungsreaktion hervor, in dessen Folge sich die physiologischen hämostatischen Eigenschaften des geschädigten Gefäßendothels verändern.

Infolge der Schädigung des Gefäßendothels kommt es zur vermehrten Adhäsion von Blutzellen, wie Leukozyten, Thrombozyten und Monozyten. Monozyten und Lymphozyten adhären, migrieren in die Intima der Gefäßwand und setzen dort den Entzündungsprozess fort. Die zu Gewebsmakrophagen differenzierten Monozyten proliferieren, nehmen die eingelagerten Lipoproteine auf und wandeln sich zu Schaumzellen um. Die Schaumzellen gehen zugrunde, setzen ihren lipidhaltigen Inhalt frei und vermehren damit den Anteil von nekrotischem Material in der atherosklerotischen Plaque. Im weiteren Verlauf kommt es zu Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) mit Gefäßwandverdickung an der Stelle des Endothelschadens. Über die Freisetzung von Chemokinen, Zytokinen, hydrolytischen Enzymen und Wachstumsfaktoren wird der Entzündungsprozess weiter in Gang gehalten. Es entstehen größere Endothelschäden und Nekrosen. In Folge der Restrukturierung bildet sich eine Hülle, gebildet von VSMC, aus Fibrin und extrazellulärer Matrix, über dem geschädigten Gewebe aus. Diese Hülle bedeckt den Plaque, welcher im Inneren aus einer Ansammlung von Lipiden, nekrotischem Zellmaterial und expandierender Läsion besteht [6, 11, 18, 19]. Der pathologisch veränderte Gefäßwandabschnitt ist nur bedingt zur Dilatation fähig. Progredientes Plaquewachstum, verminderte Dilatationsfähigkeit und Thrombosierung des geschädigten Gefäßwandabschnittes verursachen Stenosen mit Minderperfusionen und Funktionsausfällen im abhängigen Gewebe distal der Stenose. Die Perfusionsstörungen können in vielfältiger Form klinisch in Erscheinung treten, unter anderem als periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), als Angina abdominals, als zerebrale (transitorische ischämische Attacke (TIA) oder PRIND (prolongiertes reversibles ischämisches neurologisches Defizit)) oder myokardiale (Angina pectoris (AP)) Durchblutungsstörung.

Je nach Größe der Plaque und in Abhängigkeit von seiner entzündlichen Aktivität, kann es zur Plaqueinstabilität und Plaqueruptur kommen. Infolge der Ruptur werden Plaquebestandteile freigesetzt, auf denen sich Thrombozyten auflagern. Die Thrombozyten-Auflagerungen führen zu einer rasch progredienten Lumeneinengung, zu Minderperfusion und Ischämie des zu versorgenden Stromgebietes mit konsekutiver Funktionseinschränkung und Gewebsuntergang. Bei der Stenosierung einer Koronararterie kommt es durch Thrombosierung im Bereich der Plaque zu einer raschen Einengung des Lumens mit nachfolgender Ischämie des abhängigen Myokards. Die typische klinische Symptomatik kann sich zunächst als Angina pectoris (AP) zeigen, in ihrer weiteren Folge können Herzrhythmusstörungen, eine Herzinsuffizienz oder ein Myokardinfarkt auftreten [4, 6, 7, 20].

2.2 Die Rolle von Monozyten und glatten Gefäßmuskelzellen bei der Pathogenese der Atherosklerose

Monozyten sind als mononukleäre Zellen eine Untergruppe der Leukozyten. Sie gehören zum Monozyten-Makrophagen-System der Immunabwehr und sind zu Migration und Phagozytose fähig. Zur Eliminierung körperfremder und körpereigener schädigender Agenzien besitzen sie Lysosomen mit darin enthaltenen Säurehydrolasen und Peroxidasen. Die Rekrutierung und Adhäsion im Blut zirkulierender Monozyten spielt eine wesentliche Rolle bei Entzündungsprozessen und somit bei der Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen. [11, 21, 22]. Den größten Anteil an Entzündungszellen in atherosklerotischen Gefäßläsionen stellen Makrophagen und Lymphozyten dar [23]. Im Blut zirkulierende Monozyten werden durch Chemokine angelockt, die bei Gewebsverletzungen und Entzündungsprozessen von Blut- und Gewebszellen freigesetzt werden. Über spezielle Chemokin-Rezeptoren werden intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt, die Einfluß auf zelluläre Eigenschaften, wie Adhäsion, Migration und Proliferation nehmen [24]. Durch Chemokine aktivierte Monozyten erlangen die Fähigkeit, über spezielle Adhäsionsmoleküle am Gefäßendothel zu adhären und in die Gefäßwände hinein zu migrieren. Dort sezernieren sie gewebsschädigende Hydrolasen und Peroxidasen sowie Chemokine, die den Entzündungsprozess weiter vorantreiben und die Größenzunahme atherosklerotischer Läsionen bedingen [23, 25].

Die glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) der Media dienen als kontraktile Zellen physiologischer Weise der Aufrechterhaltung und Modulation des Gefäßmuskeltonus und Gefäßwiderstandes. Sie stellen im Herz-Kreislauf-System einen wichtigen Regulationsfaktor für Blutdruck und Gewebsperfusion dar. Ihre Funktion unterliegt ineinander greifenden Regelkreisen, die unter anderem über das sympathische und parasympathische Nervensystem und über das Renin-Angiotensin-Alodsteron-System gesteuert werden. Die Regulation dieser Systeme erfolgt über Rezeptoren und Signalproteine. Diese Signalproteine, zu denen die Integrin-Linked Kinase zählt, haben in unterschiedlichsten Zellpopulationen Einfluss auf Zell-Funktionen, wie Apoptose, Migrations-, und Proliferationsverhalten [26 - 33]. VSMC spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose. In der Spätphase der Atherogenese verlieren sie ihre kontraktile Eigenschaften und erlangen die Fähigkeit zu Migration und Proliferation. Dies sind ihre wesentlichsten Eigenschaften im Prozess der Atherogenese.

Nach Schädigung des Gefäßendothels wandern sie in die Intima ein, sezernieren pro-inflammatorische Stoffe wie Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrose-Faktor α (TNF α) und exprimieren chemotaktische, pro-adhäsive Signalproteine wie das vaskuläre Zelladhäsions-Molekül 1 (vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)) und das Monozyten-Chemotaktische-Protein-1 (MCP-1). Diese Signalproteine fördern die Migration von Monozyten und damit den Entzündungsprozess [34, 35]. Im Verlauf der Atherogenese akkumulieren die glatten Gefäßmuskelzellen in der Intima und produzieren extrazelluläre Matrix, was zur Größenzunahme des Plaques und möglicher Plaqueinstabilität führt [18].

2.3 Die Rolle von Chemokinen und ihre Wirkung auf intrazelluläre Signalwege bei der Pathogenese der Atherosklerose

Chemokine spielen bei der Entstehung der Atherosklerose eine zentrale Rolle. Sie gehören zur Familie der Zytokine. Ihre Funktion ist es, Verhalten und Eigenschaften anderer Zellen zu modulieren. Chemokine werden als Reaktion auf Entzündungs- oder Verletzungsreize von Blut- und Gewebezellen freigesetzt und aktivieren über spezielle Chemokin-Rezeptoren in der Zellmembran unterschiedliche intrazelluläre Signalwege [23, 24]. Ihre wesentliche Bedeutung im Entzündungsprozess der Atherosklerose kommt ihnen durch Aktivierung und Rekrutierung inflammatorischer und pro-atherosklerotischer Zellen, wie Monozyten und glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC), zu [24, 27, 36 – 38]. Nach ihrer Rezeptor-vermittelten Aktivierung werden zielgerichtete Zellbewegungen wie Adhäsion und Migration über unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden initiiert. Beispiele hierfür sind die Signalwege der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-K) sowie die Signalwege der Subtypen der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAP-K) [27, 36, 37, 39]. Zwei bekannte Signalmoleküle in dieser Signalkaskaden sind die Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) sowie die Integrin-Linked Kinase (ILK) [40, 41]. Beide haben wesentliche Bedeutung für Zellwachstum, Adhäsion und Migration [26 - 30, 40 - 42]. Zur Versuchsdurchführung wurden die pleiotrop vorkommenden Chemokine TNF α und SDF-1 α verwendet. Ihre Rezeptoren werden auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert [24]. SDF-1 α wird darüber hinaus von atherosklerotischen Plaques sezerniert und lockt auf diesem Wege Entzündungszellen, wie beispielsweise Monozyten, an [43 – 45].

2.4 Bedeutung der monozytären Rac1 Guanosintriphosphatase und der glattmuskulären Integrin-Linked Kinase bei der Pathogenese der Atherosklerose

Obwohl die Signalwege der Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) und der Integrin-Linked Kinase (ILK) in unterschiedlichsten Zellpopulationen hinreichend erforscht sind, konnten die Mechanismen, über welche die Rac1 GTPase in Monozyten und die ILK in glatten Gefäßmuskulzellen (VSMC) zur Pathogenese der Atherosklerose beitragen, nicht vollständig aufgedeckt werden.

Die GTPase Rac1 ist ein Mitglied der Rho-Familie von kleinen GTPasen. Sie nimmt eine Schlüsselrolle in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ein [40, 41]. In der aktiven, GTP-gebundenen Form reguliert die Rac1 GTPase Zell-Morphologie, Wachstum, Adhäsion, Migration, Endozytose und Sekretion [46]. Rac1 GTPase wird in einer Vielzahl von Zellen exprimiert und ist die Haupt-Isoform in zirkulierenden Monozyten. Dort vermittelt sie ihre biologischen Effekte über zwei unterschiedliche Mechanismen: zum einen durch Modulation des Aktin-Zytoskeletts, zum anderen und durch Generierung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS). Bisher wurde angenommen, dass die Rac1 GTPase eine entscheidende Rolle bei Migration und Chemotaxis von Leukozyten spielt. In Migrations-Versuchen mit Makrophagen Rac1-defizienter Mäuse zeigte sich jedoch keine Veränderung im Migrationsverhalten der Zellen [47]. Derzeit ist nicht bekannt, ob die Rac1 GTPase eine Rolle bei der schnellen Leukozyten-Adhäsion am Gefäßendothel spielt. Die schnelle Adhäsion zirkulierender inflammatorischer und pro-atherosklerotischer Zellen aus dem Blutstrom an das Endothel ist jedoch ein entscheidender erster Schritt bei der Rekrutierung zirkulierender Blutzellen wie Leukozyten und Monozyten und konsekutiv bedeutsam bei der Pathogenese der Atherosklerose. An der Rac1-abhängigen Monozyten-Adhäsion sind sowohl Signalwege in die Zelle hinein, als auch Signalwege aus der Zelle hinaus, beteiligt. Darüber hinaus wird eine langsame Signalgebung, die sich im Rahmen von Minuten bis Stunden abspielt, von einer schnellen Signalgebung, im Bereich weniger Sekunden, unterschieden [39]. Neuere Ergebnisse zeigen, dass die Rac1 GTPase und die Rac1-abhängige ROS-Freisetzung an der langsamen Signalgebung in die Zelle hinein beteiligt sein könnten [48]. Hingegen ist die Rolle der Rac1 GTPase bei der Chemo-kin-induzierten, innerhalb weniger Sekunden stattfindenden Signalgebung und Adhäsion bisher unzureichend unbekannt.

Unter der Hypothese, dass die Rac1 GTPase ein wesentlicher Vermittler in der Chemokin-getriggerten Signalgebung aus der Zelle heraus sein könnte, wurden THP-1-Monozyten mit konstitutiv aktiven Rac1L61 und dominant-negativen Rac1N17 cDNA Plasmiden transfiziert mit Cytochalasin D (Cyt-D), Polyethylenglykol-Superoxid-Dismutase (PEG-SOD), N-Acetylcystein (NAC) sowie mit 17 β -Östradiol behandelt. Anschließend wurden die Veränderungen der Adhäsions-Eigenschaften, des Aktin-Zytoskeletts und der ROS-Freisetzung in Pull-Down Assays, L-012 Chemiluminescence Assays, in-vitro Adhäsions-Assays (laminare Flusskammer) und mit F-Aktin Phalloidin Fluoreszenzfärbung untersucht.

Das pleiotrope Signalprotein ILK ist eine Serin-Threonin-Kinase, die in der Signalkaskade die Protein-Kinase-B/Akt und die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) phosphoryliert. Sie nimmt in einer Vielzahl von Zellen Einfluss auf Apoptose, Proliferation, Adhäsion, Chemotaxis und Migration [27, 29, 30, 49]. Die Funktion der ILK in glatten Gefäßmuskelzellen bei der Atherogenese ist bisher unbekannt. Aufgrund vorliegender Studienergebnisse mit anderen Zellpopulationen lässt sich vermuten, dass ILK in glatten Gefäßmuskelzellen ebenfalls zu einer Zunahme von Proliferation, Adhäsion und Zell-Migration führt. Die Funktion der ILK in VSMC wurde unter der Fragestellung untersucht, ob ILK in VSMC unter dem Einfluss von Statinen und Angiotensin II anti-apoptotische, proliferative und Migrations-fördernde Eigenschaften aufweist.

2.5 Wirkstoffe als Modulationsfaktoren der Atherogenese

Um die mögliche Rolle der Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) und der Integrin-Linked Kinase (ILK) bei der Therapie von Atherosklerose und koronarer Herzkrankheit mit 17 β -Östradiol, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA) Reduktase-Hemmern (Statinen) und Angiotensin II Rezeptor-Antagonisten (Sartanen) hinsichtlich primärer und sekundärer Prophylaxe koronarer Herzkrankheit zu untersuchen, wurden monozytäre THP-1-Zellen sowie glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) mit 17 β -Östradiol, Statinen und Angiotensin II behandelt. Um die Spezifität von Statinen und Sartanen nachzuweisen, wurden die Zellen zusätzlich mit den jeweiligen Antagonisten der Wirkstoffe (ICI 182.780 als Antagonist für 17 β -Östradiol, Mevalonat als Antagonist für Statin, Angiotensin II als Antagonist für Sartan) behandelt.

2.5.1 17 β -Östradiol als anti-atherosklerotischer Modulationsfaktor der Atherogenese

Das Steroidhormon 17 β -Östradiol hat nach Entdeckung der kardiovaskulär-protektiven Eigenschaften in seinem klinischen Einsatzbereich zunehmend an Bedeutung gewonnen. Seine kardiovaskuläre Wirkung lässt sich unterteilen in direkte, schnell einsetzende Effekte, direkte Langzeit-Effekte und indirekte Effekte. Nicht-genomische Effekte setzen schnell ein und führen über die direkte Aktivierung der Stickstoffmonooxid-Synthase (NO-Synthase) in Endothelzellen und die Öffnung von Calcium-Kanälen in glatten Gefäßmuskelzellen zur Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen und Vasodilatation. Genomische Effekte sind Langzeit-Effekte. Sie werden bedingt durch Veränderungen der Genexpression von Prostazyklin-Synthase, endothelialer NO-Synthase und durch genetisch bedingte Hemmung des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC). Indirekte Effekte wirken durch Senkung von Serum-Lipoproteinen, durch Senkung pro-koagulatorischer Eigenschaften und durch verstärkte Fibrinolyse vasoprotektiv [50 – 52]. Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass Östrogene die Wirkung von Rac1 GTPase in glatten Gefäßmuskelzellen herabregulieren [53]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Östrogene auf indirektem Wege die Monozyten-Adhäsion hemmen, indem sie die Aktivität endothelialer Adhäsionsmoleküle supprimieren [54, 55]. In Ergänzung zu diesen Versuchsergebnissen wurde in der vorgelegten Arbeit der direkte Effekt von 17 β -Östradiol auf das Adhäsionsverhalten von Monozyten untersucht. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Modulation der Monozyten-Adhäsion mittels 17 β -Östradiol Rac1-abhängig ist.

2.5.2 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A Reduktase-Hemmer (Statine) als anti-atherosklerotische Modulationsfaktoren der Atherogenese

3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA) Reduktase-Hemmer (Statine) stellen seit ihrer Einführung in die klinische Anwendung Ende der achtziger Jahre die potenteste Substanzklasse Lipid-senkender Wirkstoffe dar. In einer Vielzahl von Studien zur primären und sekundären Prävention kardiovaskulärer Herzkrankheiten konnte bei Patienten mit entsprechendem Risikoprofil unter Statin-Therapie eine signifikante Reduktion von Mortalität und Morbidität nachgewiesen werden [56 – 58]. Heute ist bekannt, dass Statine über ihre hepatische, Cholesterin-senkende Wirkung hinaus eine Vielzahl pleiotroper Effekte besitzen. Diese nehmen nicht nur Einfluss auf Entzündungsprozesse, Plaque-Stabilität, Endothelfunktion und thrombotische Ereignisse, sondern auch auf die Aktivität von Blutzellen wie endotheliale Progenitorzellen und Leukozyten [59 – 62]. Der exakte anti-atherosklerotische Wirkmechanismus von Statinen auf die ILK in VSMC ist bisher unbekannt.

2.5.3 Angiotensin II als pro-atherosklerotischer Modulationsfaktor der Atherogenese

Angiotensin II spielt im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Blutdruck sowie Wasser- und Elektrolyt-Haushalt und nimmt hierdurch Einfluß auf das kardiovaskuläre System. Angiotensin II steigert die Aldosteronsekretion sowie die Natrium- und Wasserretention. Über die hierdurch bedingte intravasale Volumenzunahme und durch direkte vasokonstriktorische Eigenschaften erhöht Angiotensin II den arteriellen Blutdruck und trägt indirekt zur Entstehung von Atherosklerose bei. Darüber hinaus ist Angiotensin II als direkter, pro-atherosklerotischer Mediator bekannt. Es stimuliert zum einen die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC), zum anderen die Produktion von extrazellulärer Matrix und hat auf diesem Weg an der Entstehung der Atherogenese Anteil [18, 63 – 67].

2.5.4 Angiotensin II Rezeptorantagonisten (Sartane) als anti-atherosklerotische Modulationsfaktoren der Atherogenese

Angiotensin II Rezeptorantagonisten (Sartane), wie das in der vorgelegten Arbeit eingesetzte Losartan, dienen im klinischen Bereich dem therapeutischen Einsatz bei arterieller Hypertonie und chronischer Herzinsuffizienz. Sie wirken über einen direkten, selektiven Antagonismus an AT1-Rezeptoren und hemmen die Angiotensin II Effekte durch Verringerung von Aldosteronsekretion, Natrium- und Wasserretention. Ferner wirken sie durch ihre vasodilatatorischen Eigenschaften der Angiotensin II bedingten Vasokonstriktion entgegen. Darüber hinaus nehmen Sartane modulierenden Einfluss auf die Proliferation von VSMC und können somit die atherosklerotische Degeneration geschädigter Gefäßwandabschnitte mindern [64 – 67]. Untersucht wurde hier, ob Sartane ihre anti-atherosklerotische Wirkung über den intrazellulären Signalweg der glattmuskulären ILK entfalten können.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Substanzen und Antikörper

Nachfolgend sind die verwendeten Reagenzien, Antikörper und ihre Abkürzungen aufgelistet.

Aceton	Sigma, Steinheim
Acrylamid Mix	Bio-Rad, München
Adenosintriphosphat (ATP)	Calbiochem, Bad Soden
Agarose	Sigma, Steinheim
8-Amino-5-Chloro-7-Phenyl[3,4-d]- Pyridazine-1,4(2H,3H), (L-012)	Wako, Osaka, Japan
Aminoethylcarbazol (AEC)	Sigma, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Roche, Mannheim
Angiotensin II (AT II)	Calbiochem, Bad Soden
Annexin V Fluos Staining Kit	Roche, Mannheim
Anti- α -Smooth-Muscle Aktin, Maus monoklonal	Sigma, Steinheim
Anti-Integrin-Linked-Kinase (Anti-ILK), Kaninchen	Upstate, Hampshire UK
Anti-Maus IgG	Sigma, Steinheim
Anti-Maus Fluorescence	
Tetramethylrhodamin (TRITC)	Sigma, Steinheim
Anti-Kaninchen IgG	Sigma, Steinheim
Anti-Kaninchen Fluorescence Fluorescein	
Isothiocyanat (FITC)	Sigma, Steinheim
Atorvastatin	Gödecke-Parke-Davis, Freiburg
β -Glycerolphosphat	Sigma, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Linz, Austria
Bradford-Reagenz (Protein Reagens)	Bio-Rad, München
Complete Mini Protease Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim

Cytochalasin D (Cyt-D)	Sigma, Steinheim
4, 6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Vector Laboratories, Grünberg
5, 6-Dichlorobenzimidazol (DRB)	Sigma, Steinheim
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Steinheim
4, 5-Dihydroxy-1,3-Benzenedisulfonic-Acid-Disodium Salz, (Tiron)	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Diphenyliodonium (DPI)	Sigma, Steinheim
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Eggenstein
Enhanced chemiluminescence (ECL), Western-Blot Detektion	Amersham, Braunschweig
Endotheliales Basales Medium (EBM)	Gibco, Eggenstein
Endotheliales Wachstums-Medium (EGM)	Cambrex Bio Science, Vervier, Belgien
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
FACS-Lösung (FACS lysis solutin)	Becton Dickinson, Heidelberg
Fetales Bovines Serum (FBS)	Gibco, Eggenstein
Fibronektin	Sigma, Steinheim
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Gentamycin	Chemicon, Hampshire, UK
Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3), Fusionsprotein	Cell Signaling, Danvers, MA
Glyzin	Calbiochem, Bad Soden
Hämatoxylin	Sigma, Steinheim
Humane Endothelzellen aus Nabelschnur-Venen (HUVEC)	Cambrex Bio Science, Vervier, Belgien
Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF)	Cambrex Bio Science, Vervier, Belgien
Hydrokortison	Cambrex Bio Science, Vervier, Belgien
ICI 182.780	Tocris, Avonmouth, UK
Kaleidoskop Marker, prestained	
SDS-PAGE Kaleidoskope	Bio-Rad, München

L-Glutamin	Calbiochem, Bad-Soden
Laemmli-Puffer	Serva, Heidelberg
Low Range Marker, prestained	
SDS-PAGE Low Range	Bio-Rad, München
Losartan	Merck-Sharp-Dohme, Haar
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel de Häen, Seelze
Mevalonat	Merck, Darmstadt
Mikrozystein	Calbiochem, Bad Soden
Milchpulver, fettarm, bovine	Sigma, Steinheim
Mg ²⁺ Lysis / Wash Buffer (MLB-Puffer)	Upstate, Hampshire, UK
Monozytäre THP1-Zellen	American Type Culture Collection, Wesel
Natrium-Chlorid (NaCl)	Calbiochem, Bad Soden
Nemo Binding Domain Peptid (NBD-Peptid)	Alexis, Grünberg
N-Acetyl-L-Cystein (NAC)	Sigma, Steinheim
N, N, N'N'-Tetramethylethylendiamid (TEMED)	Bio-Rad, München
Nordihydroguareticacid (NDGA)	Sigma, Steinheim
Tobramycin	Lilly, Gießen
Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X 100)	Sigma, Steinheim
17β-Östradiol	Sigma, Steinheim
Penicillin-Streptomycinlösung	Gibco, Eggenstein
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma, Steinheim
Phospho-Glykogen-Synthase-Kinase-3 (Phospho GSK-3β)	Upstate, Hampshire, UK
Polyaethylenglycolsorbitanmonolaurat (Tween)	Sigma, Steinheim
Polyethylenglykol-Superoxid-Dismutase (PEG-SOD)	Sigma, Steinheim
2-Propanol (Isopropanol)	Roth, Karlsruhe
Protein A Agarose	Roche, Mannheim

Protran Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Rac1 GST-PAK Pull-Down Assay	Upstate, Hampshire, UK
Rinderalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Rosuvastatin, AstraZeneca	Cheshire, UK
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Sodium-Lauryl-Sulfat-Sample-Puffer (SDS-Sample-Puffer)	Calbiochem, Bad Soden
Streptavidin-Peroxidase-Konjugat	Boehringer, Mannheim
Stromazell-Faktor 1 α (SDF-1 α)	R&D Systems, Wiesbaden
Tris Puffer Saline (TBS)	Sigma, Steinheim
Tris Glyzerine SDS Puffer (TGS)	Bio-Rad, München
Trishydroxymethylmethylamin Hydrochlorid (Tris HCl, Tris Base)	Chemos, Regenstauf
Tumor Nekrose Faktor Factor α (TNF α)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Trypsin	Sigma, Steinheim
Western Blocking Reagent	Roche, Mannheim
Western-Type Diät	Ssniff, Soest
Wortmannin	Calbiochem, Bad Soden

3.1.2 Versuchstiere

C57/BL6 Mäuse, männlich	Charles River Wega, Sulzfeld
C57BL/6J Mäuse, männlich, ApoE -/-	Charles River Wega, Sulzfeld
Sprague-Dawley Ratten, männlich	Charles River Wega, Sulzfeld

3.1.3 Zellkultur-Materialien

Boyden-Kammern	BD biosciences, Heidelberg
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Eppendorf-Küvetten	Greiner bio-one, Essen
Eppendorf-Röhrchen	Greiner bio-one, Essen
15 ml Falkons	Cell-Star, Greiner bio-one, Essen
50 ml Falkons	Cell-Star, Greiner bio-one, Essen
6-Loch-Platten	Renner, Darmstadt
24-Loch-Platten	Renner, Darmstadt
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Präzisionswischtücher	Kimtech, Kimberly Clark, Forchheim
Petrischalen 10 cm Ø	TPP, Trasadingen Switzerland
Skalpell	Einmal-Skalpell, Braun, Melsungen
25 cm ² Zellkulturflaschen	Cell-Star, Greiner bio-one, Essen
Zellkultur-Kammern	Chamber Slides Lab Tek, Nalge Nunc, Hereford, UK
Zellkultur-Platten	Cell Culture Slides, Nalge Nunc, Hereford, UK
Zell-Schaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zitrat-Monovetten	Sarstedt, München

3.1.4 Lösungen, Nährmedien und Puffer

Die verwendeten Lösungen, Nährmedien und Puffer wurden wie folgt angesetzt:

Nährmedium für primäre Monozyten und monozytäre THP-1-Zellen: RPMI-1640 wurde supplementiert mit 10 % FBS, 2 mM L-Glutamine, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,5 mM β -Merkaptoethanol.

Nährmedium für glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC): DMEM wurde angesetzt mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 80 μ g/ml Gentamycin.

Nährmedium für humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC): EGM wurden 0,5 % BBE, 0,1 % hEGF, 0,1 % Hydrokortison, 2 % FBS und 0,1 % GA-1000 zugesetzt.

Fixierer zur durchflusszytometrischen Oberflächenbestimmung von primären Monozyten: 1 x PBS wurde versetzt mit 1 % Formaldehyd.

FACS-Puffer zur Apoptosemessungen von VSMC in der Durchflusszytometrie: Der Inkubations-Puffer wurde nach Angaben des Herstellers Roche aus dem Annexin V Fluos Staining Kit wie folgt zusammengesetzt: 1 ml Inkubations-Medium wurden supplementiert mit 2 % Annexin V und 2 % Propidium Iodide.

Block-Puffer zur Apoptosemessung von VSMC in der Durchflusszytometrie: FACS-Puffer wurden 5 % FKS und 0,5 % BSA zugesetzt.

Wasch-Puffer zur CD 14 Oberflächenbestimmung primärer Monozyten in der Durchflusszytometrie: 1x PBS wurde versetzt mit 1 % FBS.

Block-Puffer zur CD 14 Oberflächenbestimmung primärer Monozyten in der Durchflusszytometrie: FACS-Puffer wurde versetzt mit 10 % humanem Serum.

Lyse-Puffer für Western Blotting: 150 mM NaCl wurden versetzt mit 50 mM Tris HCl, 1 % Triton X 100, 1 mM Orthovanadat, 2 μ M Microcystein und einer Tablette Proteinase-Inhibitor complete mini bei einem pH von 7,6.

Elektrophorese-Puffer für Western Blotting: 10x TGS wurde mit sterilem H₂O₂ auf 1x TGS verdünnt.

Transfer-Puffer für Western Blotting: 800 ml H₂O wurden mit 200 ml Methanol vermischt. Dem Gemisch wurden 5,8 g Tris Base, 29 g Glycerine und 1 g SDS zugegeben.

Block-Puffer für Western Blotting zur Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper: TBS-Tween wurde zur Inkubation der Nitrozellulose-Membran mit primärem Antikörper angesetzt mit 5 % Milchpulver-Anteil, zur Inkubation mit sekundärem Antikörper mit 1 % Milchpulver-Anteil.

TBS-Tween: TBS wurden 0,1 % Tween zugesetzt.

Kinase-Puffer zur Messung der ILK-Expression und Kinase-Aktivität in VSMC: 150 mM NaCl wurden supplementiert mit 25 mM Tris HCL, 5 mM β -Glyzerolphosphat, 2 mM Dithiothreitol, 0,1 mM Orthovanadat und 10 mM MgCl₂ bei einem pH von 7,5.

Inkubations-Puffer zur Messung der Kinase-Aktivität in VSMC: Kinase-Puffer (wie beschrieben) wurde versetzt mit 200 μ M ATP und 1 μ g GSK-3 Substrat-Peptid (GSK-3 Fusionsprotein).

Block-Puffer zur Aktin-Zytoskelett-Färbung monozytärer THP-1-Zellen mit F-Aktin Rhodamin Phalloidin: 1x PBS wurde versetzt mit 5 % BSA und 0,2 % Triton X 100.

Fixierer zur immunhistochemischen Färbung von VSMC-spezifischem α -Smooth-Muscle-Aktin für die immunhistochemischen Charakterisierung von VSMC: Es wurde eine 1:1 Lösung aus Aceton und Ethanol angesetzt.

Block-Puffer zur immunhistochemischen Färbung von VSMC-spezifischem α -Smooth-Muscle-Aktin für die immunhistochemischen Charakterisierung von VSMC: BSA wurde auf eine 1 %-ige Lösung verdünnt.

Peroxidase-Substrat zur immunhistochemischen Färbung von VSMC-spezifischem α -Smooth-Muscle-Aktin für die immunhistochemische Charakterisierung von VSMC: Besteht aus 0,32 mmol/l Aminoethylcarbazol, 0,0002 % H_2O_2 in 50 mmol/l Tris HCl pH 7,3.

Block-Puffer zum immunhistochemischen Nachweis von ILK und α -Smooth-Muscle-Aktin in atherosklerotischen Gefäßwandabschnitten von Aortenschnitten (VSMC-Immunhistochemie): 1x PBS wurde supplementiert mit 5 % BSA und 0,2 % Triton X 100.

3.1.5 Geräte und Software

Nachfolgende Geräte und Software wurden eingesetzt:

Acrylküvetten	Sarstedt, München
Blotting-Kammer	BioRad Miniprotean, BioRad, München
Durchflusszytometer	BD FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophorese-Kammer	BioRad Miniprotean, BioRad, München
Entwicklerkassette	Agfa Cera 10, Agfa Köln
Film-Entwickler	Agfa Curix 60, Agfa, Köln
Fluoreszenz-Mikroskop	Nikon Eclipse E 6000, Nikon, Düsseldorf
Flusskammer	Parallel-Plate Flow Chamber, Immunetics, Cambridge, MA
Photofilm	Hyperfilm, Amersham Bioscience, Braunschweig
Neubauer-Zählkammer	Sarstedt, München
Photometer	Spectrophotometer 530, Beckman, Fullerton, CA
Software Computer-Densitometrie	LabWorks Analysis Software, UVP, Cambridge, UK
Software FACS-Analysen	CellQuest Pro, BD bioscience, Heidelberg
Software Fluoreszenz-Mikroskopie	Lucia Cytogenetics Software, LIM, Prag, Tschechei
Szintillations-Zähler	Berthold Luminat LB 9501, Berthold, Bad Wildbad
Transfektions-Gerät	Amaya Nucleofactor 1, Amaya Biosystems, Köln
Zytospin-Zentrifuge	Shandon Cytospin 2, Shandon Lipshaw, Pittsburgh, PA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellisolierung und Zellkultur

3.2.1.1 Isolierung primärer mononukleärer Zellen

Primäre Monozyten aus peripherem Blut gesunder Spender wurden mittels Ficoll-Hypaque Zentrifugation isoliert und aufgereinigt. Venöses Blut wurde in sterile 5 ml Zitrat-Röhrchen abgenommen. Das Blut wurde unter sterilen Bedingungen im Verhältnis 1: 1 mit 1x PBS verdünnt. In sterile 50 ml Falkons wurde jeweils 15 ml Ficoll-Lösung vorgelegt. Auf die Ficoll-Lösung wurden vorsichtig jeweils 25 ml der Mischung aus Blut und 1x PBS aufgeschichtet, so dass sich zwei Phasen bildeten. Die befüllten Falkons wurden bei 2400 rpm (1000 G) für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Aus dem mehrschichtigen Zentrifugat wurde die Schicht mononukleärer Zellen heraus pipettiert, in 50 ml Falkons überführt, mit 1x PBS auf 50 ml Volumen aufgefüllt und bei 2400 rpm (1000 G) für 10 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das gewonnene Pellet wurde mit 50 ml 1x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in RPMI-Nährmedium resuspendiert und gezählt.

3.2.1.2 Bead-Aufreinigung primärer Monozyten

Die Aufreinigung primärer Monozyten aus den mononukleären Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Die Methode der Bead-Aufreinigung dient der Verringerung nicht-monozytärer Zellen in der zuvor gewonnenen Zellsuspension. Nicht-monozytären Zellen werden über monoklonale, Magnet-konjugierte Oberflächen-Antikörper gekennzeichnet und mit Hilfe eines Magnetfeldes aus der Zellsuspension isoliert. Zunächst wurden die im Ficoll-Hypaque-Verfahren gewonnenen Zellen gezählt, in 1x PBS gewaschen, für 5 Minuten bei 1000 rpm (200 G) zentrifugiert und pro 10^7 Zellen in 100 μ l Block-Reagenz plus 100 μ l Hapten-Antikörper-Cocktail resuspendiert. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 8° Celsius inkubiert. In einem zweiten Durchgang wurden die Zellen erneut in 1x PBS gewaschen, zentrifugiert und ein zweites Mal in einer Mischung aus Block-Reagenz und Hapten-Antikörper-Cocktail resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubationszeit bei 8° Celsius wurde das Gemisch mit 1 ml 1x PBS verdünnt. Die Zellsuspension wurde in einem 15 ml Falcon an einer Magnetsäule angebracht, so dass die magnetisch gekennzeichneten nicht-monozytären Zellen im Vorbeifließen heraus gefiltert wurden. Die verbliebenen, negativ selektierten, monozytären Zellen wurden in ein frisches Falcon überführt und in Nährmedium kultiviert. In stichprobenartig durchgeführten FACS-Analysen zur Bestimmung der CD-Oberflächen-Eigenschaften konnte nachgewiesen werden, dass die Reinheit der durch das Ficoll-Hypaque-Verfahren mit anschließender Bead-Aufreinigung gewonnen primären Monozyten über 92 % betrug.

3.2.1.3 Isolierung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)

VSMC wurden aus thorakalen Aorten von männlichen, 6-10 Wochen alten Sprague-Dawley-Ratten durch enzymatische Dispersion gewonnen. Hierzu wurden die Aorten unter sterilen Bedingungen entnommen und in 1x PBS, supplementiert mit 100 U/ml Penicillin und 40 μ g/ml Tobramycin, gebracht. Die Aorten wurden anschließend von Bindegewebsresten gesäubert und in einer Enzymlösung für 30 Minuten bei 37° Celsius im Inkubator equilibriert. Nach einer zweiten Säuberung von übrigen Bindegewebsresten wurden die Aorten in ca. 2 mm große Stücke geschnitten und in neue Enzymlösung gegeben. In einer Inkubation bei 37° Celsius im Wasserbad erfolgte die Dispersion bis zur Einzelzellsuspension. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1000 rpm (200 G) zentrifugiert, in VSMC-Nährmedium resuspendiert und in 10 ml Nährmedium in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser ausgesät.

3.2.1.4 Immunhistochemische Charakterisierung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Methode der Wahl zur immunhistochemischen Bestimmung von VSMC ist der Nachweis des VSMC-spezifischen α -Smooth-Muscle-Aktins. Hierzu wurden die durch enzymatische Dispersion gewonnen VSMC auf Objektträgern ausgesät und inkubiert, bis ein konfluenten Zellrasen gewachsen war. Die Zellrasen wurden in einem 1:1 Gemisch aus Ethanol und Aceton für 5 Minuten bei 4° Celsius fixiert, mit 1 %-igem BSA geblockt und mit einem monoklonalen, 1: 200 mit 1x PBS verdünnten α -Smooth-Muscle-Aktin-Antikörper inkubiert. Nach Zugabe von Biotin-konjugiertem Anti-Kaninchen-IgG in einer 1x PBS Verdünnung von 1: 500 als sekundärem Antikörper wurden die Zellrasen für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Objektträger mit 1x PBS ohne Antikörper behandelt. Die Anfärbung von α -Smooth-Muscle-Aktin erfolgte durch Komplexbildung von Biotin-konjugierter Peroxidase mit Streptavidin und Biotin. Streptavidin, welches mehrere Bindungsstellen und eine hohe Affinität zu Biotin besitzt, wird hierzu im Überschuss zugegeben. Nach Komplexbildung mit einem Biotin-konjugiertem zweiten Antikörper wird durch Zugabe eines Peroxidase-Substrates eine chemische Reaktion in Gang gesetzt, deren Produkt ein wasserunlöslicher roter Farbstoff ist. Dieser Farbstoff markiert das Vorhandensein des VSMC-spezifischen α -Smooth-Muscle-Aktins. Die lichtmikroskopische Charakterisierung der VSMC erfolgte nach Kernfärbung mit Hämatoxylin und Einbettung in Glyceringelatine.

3.2.1.5 Zellkultur primärer Monozyten und monozytärer THP-1-Zellen

Primäre Monozyten wurden aus peripherem Blut wie oben beschrieben gewonnen. Humane, monozytäre THP-1-Zellen wurden von American Type Culture Collection bezogen. Sowohl primäre Monozyten als auch monozytäre THP-1-Zellen wurden in RPMI-1640 Nährmedium versetzt mit 10 % FBS, 2 mM L-Glutamine, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,5 mM β -Mercaptoethanol in 25 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Monozytäre THP-1-Zellen und primäre Monozyten wurden in einer 5 %-igen CO₂ Atmosphäre bei 37° Celsius in Kultur gebracht. Das jeweils verwendete Medium wurde unter sterilen Bedingungen alle zwei bis drei Tage gewechselt. Hierzu wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1000 rpm (200 G) zentrifugiert, der Überstand entfernt, das Pellet in frischem Nährmedium resuspendiert und die Zellen gezählt. Anschließend wurden die Zellen mit entsprechender Menge Nährmedium in einer maximalen Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml Nährmedium in frische 25 cm² Kulturflaschen überführt. THP-1 wurden bei 37° Celsius für 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationskurven 17 β -Östradiol (0; 0,01; 0,1; 1 μ M) behandelt. Bei Bedarf erfolgte eine Vorbehandlung der Zellen mit 1 μ M ICI 182.780 für 24 Stunden, mit 20 μ M NBD-Peptid für 60 Minuten, mit 10 μ g/ml HP 2.1 für 10 Minuten bei 4° Celsius, mit 1 μ M Cytochalasin D für 30 Minuten, mit 300 U/ml PEG-SOD für 60 Minuten, oder mit 10 μ M NAC für 30 Minuten.

3.2.1.6 Zellkultur glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Die Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) wurde in einem Nährmedium aus DMEM mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 80 μ g/ml Gentamycin vorgenommen. VSMC wurden in einer 5 %-igen CO₂ Atmosphäre bei 37° Celsius in Kultur gebracht. Das VSMC-Nährmedium wurde unter sterilen Bedingungen alle 2 Tage gewechselt. Die Zelllinien wuchsen, bis sie einen konfluenten Zellrasen bildeten und wurden etwa alle fünf Tage durch Trypsinierung subkultiviert. Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen der Passagen 7 – 10 verwendet. 24 Stunden vor Messungen von ILK-Expression und ILK-Aktivität sowie 24 Stunden vor Durchführung von Proliferation- und Migration-Versuchen wurden die Zellen je nach Bedarf mit 1 μ M Atorvastatin oder 1 μ M Angiotensin II behandelt. Um die Spezifität der Wirkstoffe nachzuweisen, wurden die Zellen in einigen Versuchsreihen gleichzeitig mit den jeweiligen Antagonisten der Wirkstoffe (200 μ M Mevalonat als Antagonist von Atorvastatin, bzw. 10 μ M Losartan als Antagonist von Angiotensin II) behandelt.

3.2.1.7 Zellkultur humaner Endothelzellen aus Nabelschnur-Venen (HUVEC)

Humane Endothelzellen aus Nabelschnur-Venen (HUVEC) wurden in EGM-Nährmedium in Kultur gebracht. Hierzu wurde eine 500 ml Flasche EGM supplementiert mit 2 ml BBE, 0,5 ml hEGF, 0,5 ml Hydrokortison, 10 ml FBS und 0,5 ml GA-1000. Die Zellen wurden in einer 5 %-igen CO₂ Atmosphäre bei 37° Celsius kultiviert. Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen alle zwei Tage gewechselt. HUVEC wurden herangezüchtet bis ein konfluenter Zellrasen gewachsen war. Bei Bedarf wurden HUVEC passagiert. Es sind ausschließlich Zellen der Passagen 2 – 5 verwendet worden. Für Experimente in der Flusskammer wurden die Zellen in speziellen 0,8 cm² großen Zellkultur-Kammern (Chamber Slides Lab Tek, Nalge Nunc) mit Fibronectin beschichteten Gewebekultur-Platten-Böden (Polystyrene Cell Culture Slides, Nalge Nunc) ausgesät. Zunächst wurden die Kammern unter sterilen Bedingungen vorsichtig und möglichst mittig auf die Gewebekultur-Platten aufgesetzt. Ohne die Position der Kammern durch Kontakt zu verändern, wurden die Kammern mit frisch angerührtem, flüssigem Agarose-Gel fixiert. Nach Erhärten des Agarose-Gels wurden die Gewebekultur-Platten in sterile Petrischalen gelegt. Zur Fibronectin-Beschichtung der Böden wurden 1,5 ml 1x PBS mit 60 µl Fibronectin angesetzt. Hiervon wurden je 100 µl in die Kammern gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37° Celsius wurde das Fibronectin-versetzte 1x PBS abgesaugt. HUVEC wurden in einer Zelldichte von 2500 Zellen/cm² in jeweils 400 µl frischem EGM in die Kammern ausgesät und über einen Zeitraum von 5 – 9 Tagen zu einem kontinuierlichen Zellrasen herangezüchtet. Für Experimente in der Flusskammer wurden ausschließlich Zellen der Passagen 2 – 5 verwendet. HUVEC wurden vor Versuchsdurchführung mit 10 ng/ml TNF α für 4 Stunden bei 37° Celsius aktiviert.

3.2.2 Transfektion

3.2.2.1 Transfektion monozytärer THP- 1-Zellen mit Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) cDNA Plasmiden

Es wurden jeweils 5×10^5 Zellen mit je 1 μg Kontroll-Plasmid (GFP), konstitutiv aktivem Rac1L61 Plasmid und dominant-negativem Rac1N17 Plasmid mit einem Cell-Line Nucleofactor Kit V der Firma Amaxa nach Gebrauchsanweisung des Herstellers transfiziert.

Zunächst wurden die Zellen aus den Kulturflaschen in Falkons überführt, bei 1000 rpm (200 G) für 5 Minuten zentrifugiert, in 1 ml Nährmedium resuspendiert und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Um pro Kondition 5×10^5 Zellen zu erhalten, wurde die jeweils errechnete Menge in Medium resuspendierter Zellen in neue Falkons überführt und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 100 μl Amaxa Nucleofactor Lösung V resuspendiert, zusammen mit den entsprechenden Plasmiden in Amaxa Transfektionsküvetten überführt und im Amaxa Gerät mit dem Programm V-01 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit Amaxa Transfektionsküvetten in mit je 1 ml Medium befüllte und im Inkubator bei 37° Celsius vorgewärmte 6-Loch-Platten überführt und für bis zu 48 Stunden im Inkubator bei 37° Celsius equilibriert.

3.2.2.2 Transfektion glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) mit Integrin-Linked Kinase (ILK) cDNA Plasmiden

Es wurden jeweils 5×10^5 Zellen mit je $1 \mu\text{g}$ Wild-Typ ILK (ILK-WT), dominant-negativem ILK (ILK-DN) sowie einem Kontroll-Plasmid mit einem Cell-Line Nucleofactor Kit 4837 der Firma Amaxa nach Gebrauchsanweisung des Herstellers transfiziert. Hierzu wurden VSMC der Passagen 8-10 verwendet, die zu einem maximal 80 %-ig konfluenten Zellrasen gewachsen waren. Das Nährmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die VSMC mit Trypsin für 5 Minuten bei 37° Celsius gelöst und das Trypsin mit gleicher Menge VSMC-Nährmedium antagonisiert. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Abspülen und Pipettieren in Falkons überführt und für 3 Minuten bei 1000 rpm (200 G) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die verbliebenen Pellets in VSMC-Nährmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Pro Kondition wurden 5×10^5 Zellen ausgezählt, die berechnete Menge Zellsuspension wurde in neue Falkons überführt und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden in je $100 \mu\text{l}$ Amaxa Nucleofactor Lösung resuspendiert, zusammen mit je $1 \mu\text{g}$ Plasmid für Wild-Typ ILK (WT-ILK), dominant-negativem ILK (ILK-DN) sowie $1 \mu\text{g}$ Kontroll-Plasmid in Amaxa Transfektionsküvetten überführt und im Amaxa Nucleofactor Gerät mit dem Programm U-25 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit Amaxa Transfektions-Pipetten in mit VSMC Nährmedium befüllten, bei 37° Celsius vorgewärmten 6-Loch-Platten überführt und für bis zu 48 Stunden im Inkubator bei 37° Celsius equilibriert.

3.2.3 Durchflusszytometrie (Fluoreszenz aktiviertes Zell-Sortier-System, FACS)

3.2.3.1 CD14 Oberflächenbestimmung primärer Monozyten

Nach Bead-Aufreinigung primärer Monozyten wurden die CD14 Oberflächen-Eigenschaften der isolierten Zellen untersucht. Die Monozyten wurden zunächst in einem Wasch-Puffer gewaschen und für 10 Minuten mit FACS-Puffer geblockt. Hiernach erfolgt die Inkubation mit einem Fluoreszenz-markierten primären Antikörper sowie einer Isotypen-Kontrolle für 30 Minuten. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die primären Monozyten in 1x PBS versetzt mit 1% Formaldehyd fixiert und für weitere 20 Minuten mit einer gebrauchsfertigen FACS-Lösung (FACS lysis solution, Becton Dickinson) nach Angaben des Herstellers inkubiert. Die Messungen wurden mit einem Becton Dickinson FACS Set und CellQuest Pro Software durchgeführt.

3.2.3.2 Apoptosemessung transfizierter glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Zur Ermittlung der Apoptoseraten und zur Differenzierung apoptotischer Zellen von nekrotischen Zellen wurden VSMC 24 Stunden nach Transfektion mit jeweils 1 µg Wild-Typ ILK (WT-ILK), dominant-negativem ILK (DN-ILK) sowie einem Kontroll-Plasmid per Annexin V Propidium Iodide (BD biosciences, Heidelberg) FACS Analyse nach Angaben des Herstellers gemessen. VSMC wurden abtrypsiniert, mit Medium antagonisiert und bei 1000 rpm (200 G) für 10 Minuten zentrifugiert. Pellets wurden mit 100 µl FACS Inkubationspuffer für 10 Minuten im Dunklen inkubiert. Die Messungen wurden mit einem Becton Dickinson FACS Set und CellQuest Pro Software durchgeführt.

3.2.4 Messung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) im L-012 Assay

Die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen durch Monozyten wurde mittels L-012 Chemilumineszenz-Verfahren analysiert. Zuvor wurden monozytäre THP-1-Zellen wie beschrieben mit 1 µg Kontroll-Plasmid (GFP), konstitutiv-aktivem Rac1L61 cDNA Plasmid und dominant-negativem Rac1N17 cDNA Plasmid transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. L-012 ist ein Luminol-Derivat mit hoher Sensitivität für reaktive Sauerstoffradikale (ROS) ohne eigenes Redox-Potential. Je 10^6 Monozyten pro Kondition wurden für 24 Stunden gehungert, in je 200 µl Nährmedium resuspendiert und für 10 Minuten bei 37° Celsius equilibriert. Ein Teil der Zellen wurde mit SDF-1 α (100 nM, 30 Sekunden) stimuliert. Die Aktivierung wurde durch Zugabe von 10 ml eiskaltem 1x PBS gestoppt. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm (250 G) und 4° Celsius für 5 Minuten zentrifugiert. Die verbliebenen Pellets wurden in 0,5 mM L-012 resuspendiert. Nach 15-minütiger Reaktionszeit im Dunklen wurden serielle Messungen im 1-Minuten-Intervall mit einem Szintillations-Zähler (Berthold Luminat) durchgeführt. Die Freisetzung der reaktiven Sauerstoffradikale wurde ermittelt als relative Chemilumineszenz in Prozent, verglichen mit der gemessenen Chemilumineszenz der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.2.5 Biochemische Assays

3.2.5.1 Messung SDF-1 α -getriggelter Aktivierung von Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) in monozytären THP-1-Zellen (GST-PAK Pull-Down Assay)

Durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blotting erfolgte die Messung der SDF-1 α -getriggerten Aktivierung von Rac1 GTPase. Der Versuch wurde mit Hilfe eines Rac1 GST-PAK Pull-Down Assay Kits der Firma Upstate nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Pro Kondition wurden 10^7 monozytäre THP-1-Zellen über 24 Stunden gehungert für unterschiedliche Inkubationszeiten (30 Sekunden, 60 Sekunden, 180 Sekunden) mit 100 nM SDF-1 α aktiviert. Die Aktivierungsreaktion wurde gestoppt durch Zusatz von eiskaltem MLB-Puffer. Die Zellen wurden lysiert und ihr Lysat wurde für 60 Minuten bei 4° Celsius mit 5-10 $\mu\text{g/ml}$ des Agarose-gebundenen Glutathion-S-Transferase Fusionsproteins (GST), welches eine Rac1-Bindungsstelle des humanen PAK1 (PAK-CRIB Domäne) enthält, inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschvorgang mit MLB wurden die Zell-Lysate für 5 Minuten in Laemmli-Puffer gekocht. Die immunreaktive Rac1 GTPase bildet mit PAK1-GST einen Immunkomplex. Die in diesem Immunkomplex gebundene Rac1 GTPase wurde nach Inkubation mit einem Anti-Rac1 Antikörper im Western-Blotting quantifiziert.

Protein-Isolation

Um die Proteinexpression zu bestimmen, wurden die aktivierten THP-1-Zellen durch Zugabe von MLB-Puffer, wie oben beschrieben, lysiert. Die Zellen wurden auf Eis gestellt und für 10 Minuten in regelmäßigen Abständen gevortext. Anschließend erfolgte die Protein-Analyse nach der Bradford-Methode.

Protein-Analyse nach Bradford

Der Proteingehalt der Zell-Lysate wurde durch die kolorimetrische Bradford-Methode analysiert. Zunächst wurde eine Eichkurve erstellt, indem in weiteren 9 Analyse-Röhrchen in aufsteigender Menge BSA als Standard vorgelegt (0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 30 µl BSA) und mit sterilem H₂O₂ auf ein Volumen von jeweils 800 µl aufgefüllt wurde. Allen Analyse-Röhrchen wurde 200 µl Bradford-Reagenz zugegeben. Die Messungen wurden im Photometer im Spektrum von 595 nm in Reihenfolge nach aufsteigendem BSA Gehalt durchgeführt. In speziellen Analyse-Röhrchen wurde je 10 µl Zell-Lysat vorgelegt, anschließend wurde mit 790 µl sterilem H₂O auf 800 µl Volumen aufgefüllt und 200 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Reagens) zugegeben. Die Messung wurde im Spektrophotometer bei 595 nm durchgeführt. Die Messwerte wurden zur Berechnung der benötigten Menge an Proteingehalt im Zell-Lysat übernommen.

Inkubation mit Bradford-Reagenz / Rac1/cdc42 Assay

Die lysierten Zellen wurden nach Proteinanalyse mit 10 µg Bradford-Reagenz (Rac1/cdc42 Assay Reagenz) pro ml Zell-Lysat nach Angaben des Herstellers, Bio-Rad, München, bei 4 ° Celsius für 60 Minuten inkubiert.

Aufbereitung der Agarose-gebundenen PAK-1 PBD

Die Agarose-gebundenen PAK-1 PBD wurden kurz bei 14000 rpm (10000 G) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die verbliebenen Pellets in MLB gewaschen. Die Pellets wurden in 2x Laemmli-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten gekocht.

Gelelektrophorese

Die Analyse der Rac1-Expression wurde mit SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Hierzu wurden die 12 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gele mit jeweils 25 µg Proteingehalt der lysierten THP-1-Zellen geladen. Der Durchlauf der Gele erfolgte bei 80 Volt für 10 Minuten im Sammelgel, bzw. 120 Volt für 80 Minuten im Trenngel.

Protein-Transfer

Die Proteine wurden aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Hierzu wurden die Gele bei 400 mA für 2 Stunden bei 4°C in Transfer-Puffer auf Membranen geblottet.

Antikörper-Inkubation

Zur Untersuchung der SDF-1 α -getriggerten Aktivierung von Rac1 GTPase in THP-1-Zellen in den auf die Nitrozellulose-Membran übertragenen Proteinen wurden die Membranen zunächst für 30 Minuten in Block-Puffer geblockt und über Nacht bei 4° Celsius mit einem polyclonalem Anti-Rac1 Antikörper in Block-Puffer (5 % Milchpulver-Anteil) im Verhältnis von 1: 1000 inkubiert. Vor Zugabe des sekundären Antikörpers wurden die Membranen in TBS-Tween für 20 Minuten gewaschen. Der sekundäre Anti-Maus Antikörper wurde im Verhältnis 1: 4000 mit Block-Puffer (1 % Milchpulver-Anteil) verdünnt, hiermit wurden die Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Entwicklung und Auswertung

Die Membranen wurden nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper mit TBS-Tween gewaschen, sorgfältig mit Präzisionswischtüchern getrocknet und anschließend für 1 Minute im Dunkeln in ECL getränkt. Die Membranen wurden in Entwicklerkassetten eingelegt und auf Hyperfilm in der Dunkelkammer mit Belichtungszeiten von 10 Sekunden bis 5 Minuten entwickelt. Die entwickelten Protein-Banden wurden computer-densitometrisch quantifiziert.

3.2.5.2 Messung der Expression der Integrin-linked Kinase (ILK) in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blotting erfolgte die quantitative Proteinanalyse zur Bestimmung von ILK-Expression in VSMC. Nach Transfektion mit Wild-Typ ILK (ILK-WT), dominant-negativem ILK (ILK-DN) und einem Kontroll-Plasmid wurden die VSMC je nach Bedarf mit 1 μ M Atorvastatin oder 1 μ M Angiotensin II behandelt und für 24 Stunden inkubiert. Das durch anschließende Zell-Lyse gewonnene Gesamtprotein wurde zur Separation der unterschiedlichen Proteingrößen gel-elektrophoretisch aufgetrennt, vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Blotting) und mit einem spezifischen, gegen das gesuchte Protein gerichteten Antikörper inkubiert.

Durch Inkubation mit einem sekundären, Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper wurden die gesuchten Proteine sichtbar gemacht. Die Nitrozellulose-Membranen wurden in Entwickler eingelegt und mit unterschiedlichen Belichtungszeiten von 5 Sekunden bis 10 Minute auf Hyperfilm entwickelt.

Protein-Isolation

Um die Proteinexpression bestimmen zu können, wurden die transfizierten VSMC zunächst mit Lyse-Puffer lysiert. Hierzu wurden die nach Transfektion für 24 Stunden inkubierten VSMC auf Eis gestellt, das Nährmedium wurde vorsichtig abpipetiert und in jeweilige Falkons überführt. Der Zellrasen wurde mit eiskaltem 1x PBS gewaschen, das 1x PBS wurde ebenfalls in die jeweiligen Falkons überführt. Um die adhärenen Zellen zu lösen und zu lysieren, wurde auf jeden Zellrasen 200 μ l Lyse-Puffer gegeben, die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Schalen gelöst und in die 1,5 ml Eppendorf Küvetten auf Eis überführt. Abpipetiertes Nährmedium und 1x PBS wurde für 5 Minuten bei 1000 rpm (200 G) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das verbliebene Pellet wurde mit ca. 100 μ l des Zell-Lysates resuspendiert und vollständig in die jeweilige Eppendorf Küvette überführt. Alle Küvetten wurden auf Eis gestellt und für 10 Minuten in regelmäßigen Abständen gevortext. Anschließend wurden die lysierten Zellen bei 14000 rpm (10000 G) für 10 Minuten in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Küvetten überführt und bei 95° Celsius für 10 Minuten gekocht.

Protein-Analyse nach Bradford

Der Proteingehalt der Zell-Lysate wurde mit Hilfe der kolorimetrischen Bradford-Methode, wie bereits beschrieben (S. 42, Protein-Analyse nach Bradford) bestimmt. Mit den Messwerten wurden die zur Bestimmung von ILK-Expression und Kinase-Aktivität in VSMC benötigten Mengen an Proteingehalt im Zell-Lysat ermittelt.

Gelelektrophorese

Die Analyse der ILK-Expression wurde mit SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Hierzu wurden die 12 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gele mit jeweils 25 µg Proteingehalt der lysierten VSMC sowie zwei unterschiedlichen Molekulargewichts-Markern geladen. Der Durchlauf der Gele erfolgte in Elektrophorese-Puffer für 10 Minuten bei 80 Volt im Sammelgel, bzw. für 80 Minuten bei 120 Volt im Trenngel.

Protein-Transfer

Die Proteine wurden aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Hierzu wurden die Gele bei 400 mA für 2 Stunden bei 4°C in Transfer-Puffer auf Membranen geblottet.

Antikörper-Inkubation

Zur Untersuchung der ILK-Expression in den auf die Nitrozellulose-Membran übertragenen Proteinen wurden die Membranen zunächst für 30 Minuten in Block-Puffer geblockt und über Nacht bei 4° Celsius mit einem polyklonalem Anti-ILK Antikörper in Block-Puffer (5 % Milchpulver-Anteil) im Verhältnis von 1: 1000 inkubiert. Vor Zugabe des sekundären Antikörpers wurden die Membranen in 1x TBS-Tween für 20 Minuten gewaschen. Der sekundäre Anti-Kaninchen Antikörper wurde im Verhältnis 1: 4000 mit Block-Puffer (1 % Milchpulver-Anteil) verdünnt, hiermit wurden die Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Entwicklung und Auswertung

Die Membranen wurden nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper mit 1x TBS-Tween gewaschen, sorgfältig Präzisionswischtüchern getrocknet und anschließend für 1 Minute im Dunkeln in ECL getränkt. Die Membranen wurden in Entwicklerkassetten eingelegt und Hyperfilm in der Dunkelkammer mit Belichtungszeiten von 10 Sekunden bis 5 Minuten entwickelt. Die entwickelten Protein-Banden wurden computer-densitometrisch quantifiziert.

3.2.5.3 Messung der Aktivität der Integrin-linked Kinase (ILK) in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) (Kinase-Assay)

Die quantitative Proteinanalyse zur Bestimmung der ILK-Aktivität in transfizierten VSMC erfolgte im Kinase-Assay mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blotting. Die Messung der Kinase-Aktivität wurde 24 Stunden nach Transfektion und Behandlung der VSMC mit 1 μ M Atorvastatin und 1 μ M Angiotensin II, wie oben beschrieben, durchgeführt.

Immunpräzipitation und Protein-Isolation

Die Pellets der transfizierten VSMC wurden nach der wie bereits beschrieben durchgeführten Zell-Lyse mit einem polyklonalen Anti-ILK-Antikörper und Protein A Beads über Nacht bei 4° Celsius inkubiert. Die präzipitierten Immunkomplexe wurden jeweils zweimal mit Lyse-Puffer und Kinase-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation in Kinase-Puffer, versetzt mit 200 μ M ATP, 1 μ g GSK-3 Substrat-Peptid für 30 Minuten bei 30° Celsius. Nach Zugabe von SDS-Sample-Puffer wurden die Proben für 5 Minuten bei 100° Celsius gekocht und abgekühlt.

Protein-Analyse nach Bradford, Gelelektrophorese, Protein-Transfer

Die Protein-Analyse nach Bradford, die Gelelektrophorese und der Protein-Transfer erfolgten wie oben beschrieben.

Antikörper-Inkubation

Zur Bestimmung der Kinase-Aktivität der Proteine wurden die Membranen zunächst für 30 Minuten in Block-Puffer geblockt und über Nacht bei 4° Celsius mit Phospho-GSK-3 β als primärem Antikörper im Verhältnis von 1: 1000 in Block-Puffer mit 5 % Milchanteil inkubiert. Vor Zugabe des sekundären Antikörpers wurden die Membranen in 1x TBS-Tween für 20 Minuten gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde ebenfalls Anti-Kaninchen Antikörper im Verhältnis 1: 4000 mit Block-Puffer (1 % Milchpulver-Anteil) verdünnt, hiermit wurden die Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Entwicklung und Auswertung

Entwicklung und Auswertung wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

3.2.6 Funktionelle Assays

3.2.6.1 F-Aktin Phalloidin-Färbung von Aktin-Zytoskelett-Strukturen

Die Substanz F-Aktin Phalloidin dient der Anfärbung zytoplasmatischer Aktin-Zytoskelett-Strukturen und zeigt im hier beschriebenen Versuch die morphologischen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts transfizierter und mit SDF-1 α aktivierter monozytärer Zellen an. Nach der bereits beschriebenen Transfektion monozytärer THP-1-Zellen mit den cDNA Plasmiden GFP, Rac1L61 und Rac1N17 wurden die Zellen zunächst für 10 Minuten bei 37° Celsius equilibriert und je zur Hälfte mit 100 nM SDF-1 α für 30 Sekunden bei 37° Celsius inkubiert. Die Aktivierungsreaktion wurde durch Zugabe von 15 ml eiskaltem 1x PBS gestoppt. Die behandelten Zellen wurden für 5 Minuten bei 1000 rpm (200 G) und 4° Celsius zentrifugiert und in 1x PBS resuspendiert. Mit Hilfe des Zytospin-Verfahrens wurden die nicht-adhäsiven monozytären THP-1-Zellen durch Zentrifugation (5 Minuten bei 1000 rpm (200 G)) auf Objektträger aufgebracht. Die fixierten Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und mit Block-Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschvorgang mit 1x PBS wurden die Zellen mit F-Aktin Phalloidin in Block-Puffer für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang mit 1x PBS wurden die Zellen mit DAPI im abgedunkelten Raum gefärbt, eingedeckt und für 6 – 12 Stunden bei 8° Celsius erneut inkubiert. Die zellmorphologischen Veränderungen wurden anschließend unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht und fotografiert.

3.2.6.2 Adhäsions-Versuch in der Flusskammer

Adhäsions-Interaktionen zwischen monozytären und endothelialen Zellen wurden in einer laminaren Flusskammer (Parallel-Plate Flow Chamber, Immunetics, Cambridge, MA) unter physiologischen Flussbedingungen untersucht. Der spezielle Aufbau der Flusskammer erlaubt es, Zell-Zell-Adhäsionen und Zell-Zell-Interaktionen *in vivo* in Echtzeit zu analysieren (Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2). Der zuvor auf Gewebekultur-Platten kultivierte endotheliale Zellrasen wird auf die O-förmigen Dichtungen der Flusskammer gesetzt. Eine angeschlossene Wasserpumpe erzeugt durch Unterdruck einen luftdichten Abschluss zwischen Flusskammer und Zellrasen. Durch das erzeugte Vakuum werden die suspendierten Zellen über den Zellrasen gepumpt. Adhäsions-Interaktionen sind in Auflichtmikroskopie mit angeschlossener Video-Kamera quantifizierbar. Monozytäre THP-1-Zellen wurden mit je 1 µg Kontroll-Plasmid (GFP), konstitutiv-aktivem Rac1L61 cDNA Plasmid dominant-negativem Rac1N17 cDNA Plasmid transfiziert und je nach Versuchsablauf mit aufsteigender Konzentration von 17β-Östradiol (0; 0,01; 0,1; 1 µM) für 24 Stunden, mit 1µM ICI 182.780 für 24 Stunden, mit 20 µM NBD-Peptid für 60 Minuten, mit 10 µg/ml HP 2.1 für 10 Minuten bei 4° Celsius, mit 1 µM Cytochalasin D für 30 Minuten, mit 300 U/ml PEG-SOD für 60 Minuten oder mit 10 µM NAC für 30 Minuten vorbehandelt. HUVEC wurden in speziellen Zellkultur-Kammern (Chamber Slides Lab Tek, Nalge Nunc) mit Fibronectin beschichteten Gewebekultur-Platten-Böden (Polystyrene Cell Culture Slides, Nalge Nunc) ausgesät. Zur Versuchsdurchführung wurden die Zellkultur-Kammern von den Gewebekultur-Platten gelöst und mit dem Zellrasen nach innen mittig auf die Gummiringe der Flusskammer aufgesetzt.

Die vorbehandelten THP-1-Zellen wurden zu Versuchsbeginn auf eine Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml verdünnt, in ein in die Flusskammer mündendes Reservoir überführt und dort mit verschiedenen SDF-1α Konzentrationen (0,1 bis 1000 nM) behandelt. Unter Flussbedingungen wurden die Zellen mit Scherkräften von 2 dyn/cm^2 und einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,78 ml/Min. durch die Flusskammer hindurch perfundiert. Die feste Adhäsion (definiert als eine Adhäsions-Dauer von mehr als 3 Sekunden) der durchfließenden Monozyten wurde ab einer Minute vor bis einer Minute nach Zugabe von SDF-1α auf Videoband aufgezeichnet und quantitativ ausgewertet.

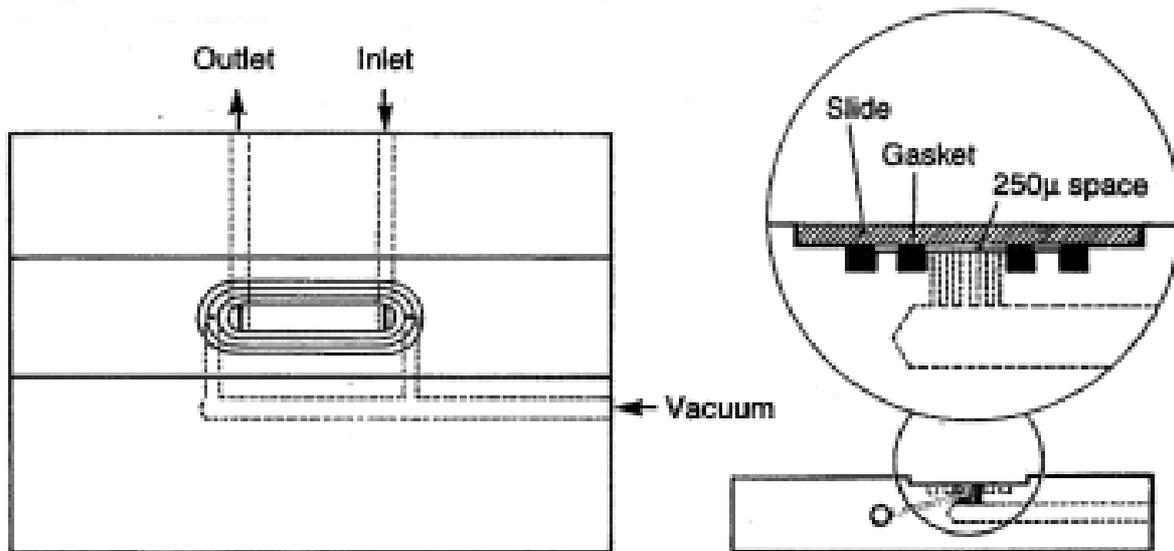


Abbildung 3-1: Schema-Zeichnung der laminaren Flusskammer (Parallel-Plate Flow Chamber, Immunetics, Cambridge, MA).

Der auf Gewebe-Kultur-Platten gezüchtete endotheliale Zellrasen wird auf die O-förmigen Dichtungsringe (Gasket) der Flusskammer gesetzt. Über eine angeschlossene Wasserpumpe wird Unterdruck (Vakuum) erzeugt, der einen luftdichten Abschluss zwischen Flusskammer und Zellrasen herstellt. Durch die Ein- und Ausstrombahn (Inlet und Outlet) werden die suspendierten THP-1 im 250 µm Spalt mit Scherkräften von 2 dyn/cm^2 über den Zellrasen gepumpt.

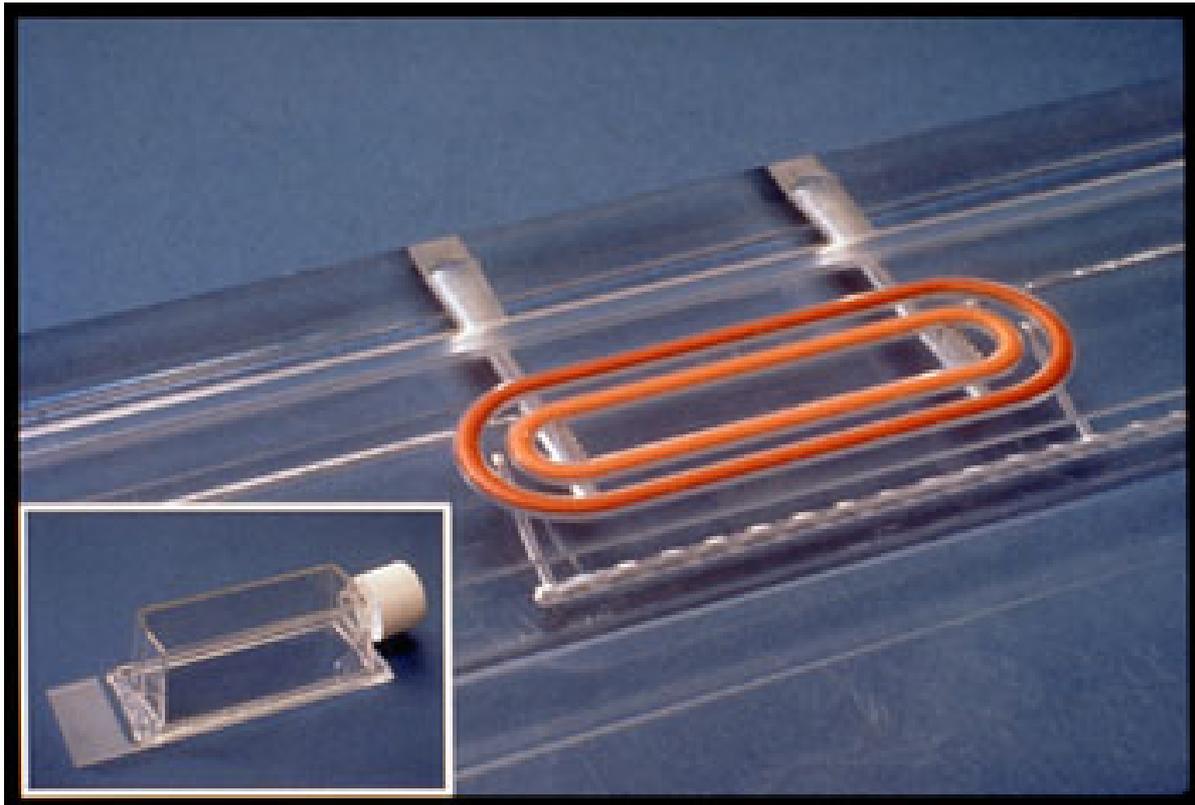


Abbildung 3-2: **Photografische Darstellung der laminaren Flusskammer (Parallel-Plate Flow Chamber, Immunetics, Cambridge, MA (großes Bild) und der Zellkultur-Kammer (kleines Bild)).**

Großes Bild: Im Plexiglas sind Ein- und Ausstrombahn (Inlet und Outlet) und der Anschluss für die Wasserpumpe erkennbar. Auf dem Plexiglas liegen die O-förmigen Dichtungsringe der laminaren Flusskammer.

Kleines Bild: exemplarische Darstellung einer Zellkultur-Kammer zur Anzucht eines endothelialen Zellrasens mit HUVEC zur Versuchsdurchführung von Adhäsionsversuchen in der laminaren Flusskammer. Zu Versuchsbeginn wird die Zellkulturflasche von dem Gewebekultur-Platten-Boden gelöst. Die Gewebekultur-Platte wird mit dem Zellrasen nach innen mittig auf die Gummidichtungen der Flusskammer aufgesetzt und dort durch Erzeugung des Unterdrucks fixiert.

3.2.6.3 Messung der Migrationsrate glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)

VSMC-Migrations-Versuche sollten Aufschluss über ein von ILK abhängiges, durch Transfektion mit Wild-Typ und dominant-negativem ILK beeinflussbares Migrationsverhalten der VSMC geben. VSMC-Migrations-Versuche wurden 24 Stunden nach VSMC-Transfektion und Behandlung mit 1 μ M Atorvastatin, 1 μ M Angiotensin II, 200 μ M Mevalonat und 10 μ M Losartan in Boyden-Kammern mit HTS Fluoroblock Filtern und einer Porengröße von 8 μ M vorgenommen. Zunächst wurden 24-Loch-Platten mit 10 nM SDF-1 α in je 500 μ l Nährmedium befüllt, anschließend wurden die Boyden-Kammern in die Loch-Platten eingesetzt. Die transfizierten VSMC wurden mit 1x PBS gewaschen, abtrypsiniert und gezählt. Es wurden je 1×10^4 VSMC auf die Filter in den Boyden-Kammern pipettiert. Zur Migration wurden die Zellen für 24 Stunden im Inkubator bei 37° Celsius inkubiert. Die Migration wurde durch dreimaliges gründliches Waschen der Filter in 1x PBS gestoppt. Die Filter wurden vorsichtig mit einem Skalpell aus ihrer Halterung heraus geschnitten und mit der Unterseite nach oben auf Objektträger gebracht. Die durch die Poren migrierten Zellen auf der Unterseite der Filter wurden mit je einem Tropfen DAPI unter Deckplättchen eingedeckt. Die eingedeckten Filter verblieben für mindestens 6 Stunden bei 8° Celsius im Kühlschrank. Nach ausreichender Färbezeit wurden die migrierten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop mit Lucia Software quantifiziert.

3.2.6.4 Messung der Proliferationsrate glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Um den Einfluss der ILK auf die Proliferationsrate von VSMC zu untersuchen, wurden VSMC nach Transfektion und Behandlung mit 1 μ M Atorvastatin, 1 μ M Angiotensin II, 200 μ M Mevalonat und 10 μ M Losartan in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellen wurden abtrypsiniert, mit gleichen Mengen Nährmedium antagonisiert, zentrifugiert und in gleichen Volumina resuspendiert. Zur Zell-Zählung wurden aus jeder Resuspension 8 μ l entnommen und in der Neubauer-Zählkammer unter Auflicht-Mikroskopie ausgezählt.

3.2.6.5 Messung der Apoptoserate glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Die Messung der Apoptoserate von VSMC wurde 48 Stunden nach der Transfektion unter Verwendung eines Annexin V Fluos Staining Kits der Firma Roche im durchflusszytometrischen Fluoreszenz aktiviertem Zell-Sortier-System (FACS) Verfahren durchgeführt. Dieses durchflusszytometrische Verfahren ermöglicht simultane Messungen mehrerer physikalischer Zell-Charakteristika. Hierzu zählt die Messung der relativen Fluoreszenzintensität Fluoreszenz-Antikörper markierter Zellen. Zur Markierung von VSMC mit apoptotischen Eigenschaften wurden Annexin V und Propidium Jodid als Fluoreszenz-Antikörper verwendet. Die spezifische Bindung der Antikörper wird durch Apoptose-bedingte Veränderungen der Zelloberfläche ermöglicht. Im frühen Apoptose-Stadium transloziert das Protein Phosphatidyl-Serin von der inneren auf die äußere Plasmamembran-Seite und wird auf der Zelloberfläche erkennbar. Diese Markierung dient Makrophagen zur selektiven Erkennung apoptotischer Zellen und schützt den Organismus vor Entzündungsreaktionen, welche in der Regel reaktiv nach Erkennung nekrotischer Zellen in Gang gesetzt werden. Nekrotische Zellen exprimieren aufgrund des Verlustes ihrer Membran-Integrität neben anderen Bestandteilen des Zell-Innen ebenfalls Phosphatidyl-Serin. Annexin V ist ein fluoreszierendes, Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidyl-Serin. Annexin V bindet Phosphatidyl-Serin unselektiv und kann die Differenzierung zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen nicht gewährleisten. Um apoptotische Zellen von nekrotischen Zellen differenzieren zu können, wurde neben Annexin V Propidium Jodid zugegeben. Propidium Jodid bindet spezifisch DNA-Bestandteile aus dem Zell-Innen nekrotischer Zellen und dient somit als selektiver Marker nekrotischer Zellen. Zur Versuchsvorbereitung wurde der Inkubations-Puffer nach Angaben des Herstellers angesetzt. Das Nährmedium der transfizierten VSMC wurde in jeweilige Falkons abpipetiert und der Zellrasen wurde mit 1x PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die VSMC vorsichtig abtrypsiniert, mit VSMC-Nährmedium antagonisiert und in die jeweiligen Falkons überführt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 100 μl Inkubations-Puffer resuspendiert und für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die FACS-Messung der Apoptoserate der transfizierten VSMC wurde anschließend im Durchflusszytometer durchgeführt. Zur Ergebnis-Auswertung wurde ein FACS Set von Becton Dickinson und eine Software von CellQuest Pro benutzt.

3.2.7 Tierversuche und Immunhistochemie

3.2.7.1 Tierversuche

Alle Tierversuche wurden der lokalen Tierschutz-Kommission der Universität des Saarlandes vorgelegt und von dieser genehmigt. Zur Untersuchung der Rolle von ILK in VSMC bei der Entstehung von Atherosklerose wurden drei Gruppen unterschiedlich behandelter Mäuse analysiert: Die erste Gruppe bestand aus acht Monate alten, männlichen C57/BL6 Mäusen, die für 24 Tage mit 20 mg/kg Körpergewicht Rosuvastatin behandelt wurden. Die Kontrollgruppe bestand aus acht Monate alten, männlichen C57/BL6 Mäusen, denen ein entsprechendes Mengen-Äquivalent an Kochsalz zugeführt wurde. Die dritte Gruppe, männliche C57BL/J6 ApoE ^{-/-} Mäuse, wurden für 7 Wochen mit einer cholesterinreichen Western-Typ Diät mit einem Anteil von 21 % Fett, 19,5 % Casein und 1,25 % Cholesterol gefüttert.

3.2.7.2 Immunhistochemische Färbung von Aortenschnitten

Die immunhistochemische Färbung von thorakalen Aortenschnitten diente dem Nachweis der Anreicherung von ILK sowie der Vermehrung von glatten Gefäßmuskelzellen in atherosklerotisch veränderten Gefäßwandabschnitten. Hierzu wurden die Schnitte der thorakalen Aorten für 30 Minuten in 3,7 %-igem Formaldehyd fixiert und anschließend dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die Schnitte wurden für 30 Minuten bei 21° Celsius mit Block-Puffer geblockt und permeabilisiert, nachfolgend mit 1: 50 verdünnten primären Antikörpern (Anti-ILK, Kaninchen, polyklonal und Anti- α -Smooth-Muscle Aktin, Maus, monoklonal) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit 1x PBS gewaschen und mit 1: 50 verdünnten sekundären Antikörpern (Anti-Kaninchen, Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) und Anti-Maus, Tetramethyl-Rhodamin (TRITC)) für 1 Stunde im Dunklen inkubiert. Nach einem letzten Waschvorgang wurden die Aortenschnitte mit DAPI und einem Deckplättchen auf Objektträgern eingedeckt und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop mit Hilfe der Lucia Software analysiert.

3.2.8 Statistische Analyse

Stetige Größen zwischen einzelnen Gruppen werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Nach vorheriger Prüfung auf Normalverteilung wurden die Gruppen mittels gepaartem bzw. ungepaartem T-Tests verglichen. Bei Vorhandensein mehrerer Gruppen wurden stetige Variablen mittels Newman-Keuls-Test untersucht. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0.05$.

4. Ergebnisse

4.1 17 β -Östradiol hemmt die Monozyten-Adhäsion unter Fluss-Bedingungen

Die Effekte von 17 β -Östradiol auf die Adhäsion primärer Monozyten wurden unter physiologischen Flussbedingungen in der laminaren Flusskammer (Parallel-Plate Flow Chamber, Immunetics, Cambridge, MA) mit Scherkräften von 2 dyn/cm² untersucht. Der endotheliale Zellrasen wurde zuvor für 4 Stunden mit 10 ng/ml TNF α vorbehandelt. Per definitionem waren anhaftende über 3 Sekunden stationär verbleibende Zellen fest adhären und wurden vor und nach Zugabe von 100 nM SDF-1 α quantifiziert. Die basale Monozyten-Adhäsion wurde der durch Vorbehandlung mit dem Chemokin SDF-1 α getriggerten Adhäsion gegenübergestellt. Die Wahl des Chemokins SDF-1 α wurde unter dem Aspekt getroffen, dass SDF-1 α sowohl stark in atherosklerotischen Plaques exprimiert wird als auch eine potente Wirkung auf die Adhäsion zirkulierender Monozyten besitzt [43 - 45]. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass 17 β -Östradiol über Herabregulierung endothelialer Adhäsionsmoleküle einen indirekten Effekt auf die Adhäsion von Monozyten ausübt [54, 55]. Im Gegensatz hierzu wurde in der vorgelegten Arbeit der direkte Effekt von 17 β -Östradiol auf die Adhäsion von Monozyten untersucht. Der Einfluss von 17 β -Östradiol auf das Adhäsions-Verhalten von monozytären Zellen wurde nach Behandlung mit verschiedenen 17 β -Östradiol-Konzentrationen analysiert. Es zeigte sich eine Dosis-abhängige signifikante Minderung der Monozyten-Adhäsion mit zwei Maxima bei Konzentrationen von 100 nM und 1 μ M (s. Abbildung 4-1). Um die Wirkungsweise von 17 β -Östradiol zu analysieren, wurden die Adhäsions-Eigenschaften an Zellen untersucht, die sowohl mit 17 β -Östradiol als auch mit dem Östrogen-Rezeptor-Antagonisten ICI.182.780 behandelt wurden. Der Adhäsions-hemmende Effekt von Östrogen wurde durch Rezeptor-Blockade vollständig aufgehoben. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die Hemmung der Monozyten-Adhäsion durch 17 β -Östradiol spezifisch durch den Östrogen-Rezeptor vermittelt wird.

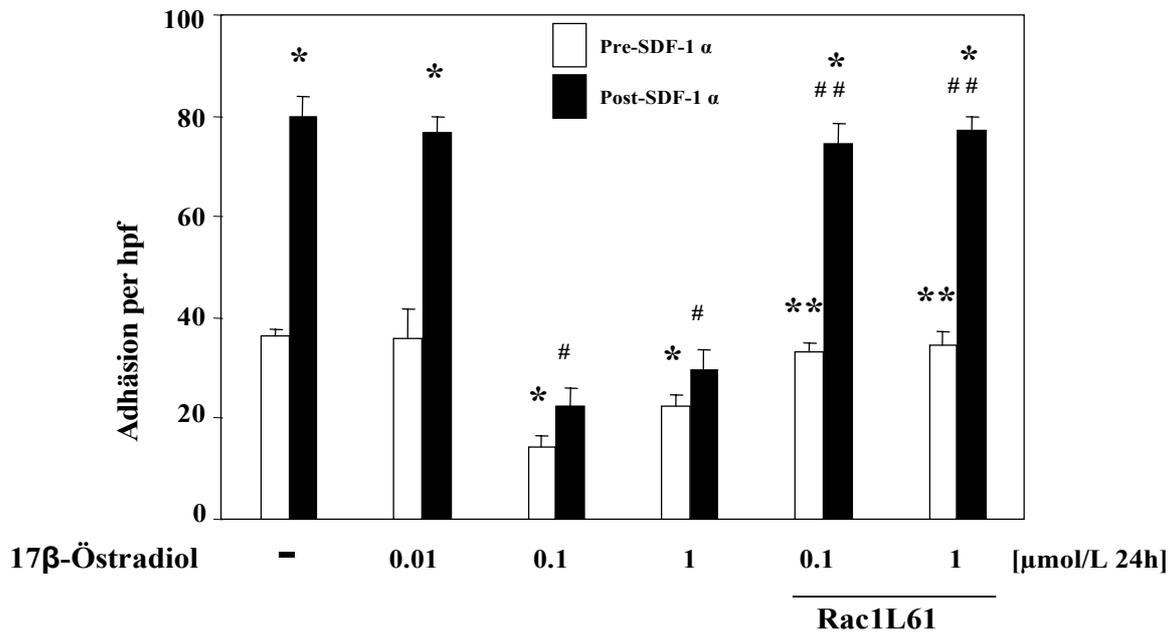


Abbildung 4-1 17β-Östradiol hemmt die Adhäsion monozytärer THP-1-Zellen unter Flussbedingungen durch Herabregulation der monozytären Rac1 GTPase.

Endotheliale Zellrasen wurden 4 Stunden vor Versuchsdurchführung mit 10 ng/ml TNFα inkubiert. Untransfizierte Zellen oder mit konstitutiv-aktivem Rac1 transfizierte Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen 17β-Östradiol für 24 Stunden behandelt. Die feste Adhäsion der Zellen wurde jeweils 30-60 Sekunden vor und nach Zugabe von 100 nm SDF-1α quantifiziert. Es zeigt sich zum einen, dass die Monozyten-Adhäsion unter Vorbehandlung mit 17β-Östradiol gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe signifikant reduziert ist, zum anderen, dass eine Transfektion mit konstitutiv-aktivem Rac1L61 die Adhäsions-hemmende Eigenschaft von 17β-Östradiol aufhebt.

(n = 3, *p < 0.01 vs. unstimulierte Kontrolle, #p < 0.01 vs. SDF-1α-stimulierte Kontrolle, **p < 0.01 vs. unstimulierte 17β-Östradiol-vorbehandelte Zellen (0,1 und 1 μM), ##p < 0.01 vs. SDF-1α-stimulierte 17β-Östradiol-vorbehandelte Zellen (0,1 und 1 μM)).

4.2 17 β -Östradiol hemmt die Monozyten-Adhäsion durch Herabregulation der monozytären Rac1 Guanosintri-phosphatase (GTPase)

Wie in früheren Studien bereits gezeigt, reguliert 17 β -Östradiol die Funktionen in anderen Zellpopulationen durch Modulation von Rac1 Guanosintri-phosphatase (GTPase) [53]. Daher wurde untersucht, ob die monozytäre Rac1 GTPase eine funktionelle Bedeutung bei der durch 17 β -Östradiol-vermittelten Hemmung der Monozyten-Adhäsion hat. Nach Transfektion mit konstitutiv-aktivem Rac1L61 zeigt sich eine deutliche Minderung der Adhäsions-Hemmung durch 17 β -Östradiol. In einem weiteren Versuchsansatz wurde die molekulare Grundlage der 17 β -Östradiol vermittelten Adhäsions-Hemmung untersucht. Hierzu wurden GST-PAK Pull-Down Assays mit 17 β -Östradiol vorbehandelter monozytärer THP-1-Zellen durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass 17 β -Östradiol die Protein-Expression der Aktivität von monozytärer Rac1 GTPase innerhalb von 24 Stunden bis zu 46,6 % mindert (Abbildung 4-2 und Abbildung 4-3).

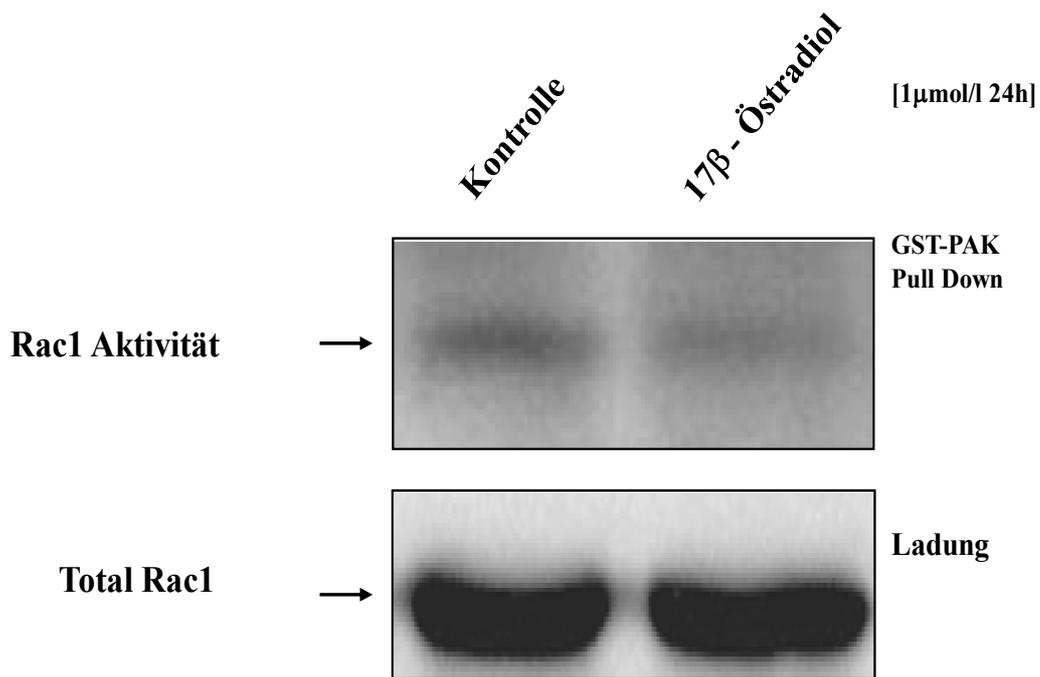


Abbildung 4-2: 17β-Östradiol hemmt die Aktivität der monozytären Rac1 GTPase (GST-PAK Pull-Down Assay).

Repräsentative Darstellung eines GST-PAK Pull-Down Assays (n=3).

Monozytäre THP-1 wurden für 24 Stunden mit 1μmol/l 17β-Östradiol behandelt. Die Aktivität der Rac1 GTPase zeigt sich im GST-PAK Pull-Down Assay bei 17β-Östradiol-behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontroll-Gruppe deutlich vermindert. Behandlung mit 17β-Östradiol hemmt signifikant die Aktivität der Rac1 GTPase.

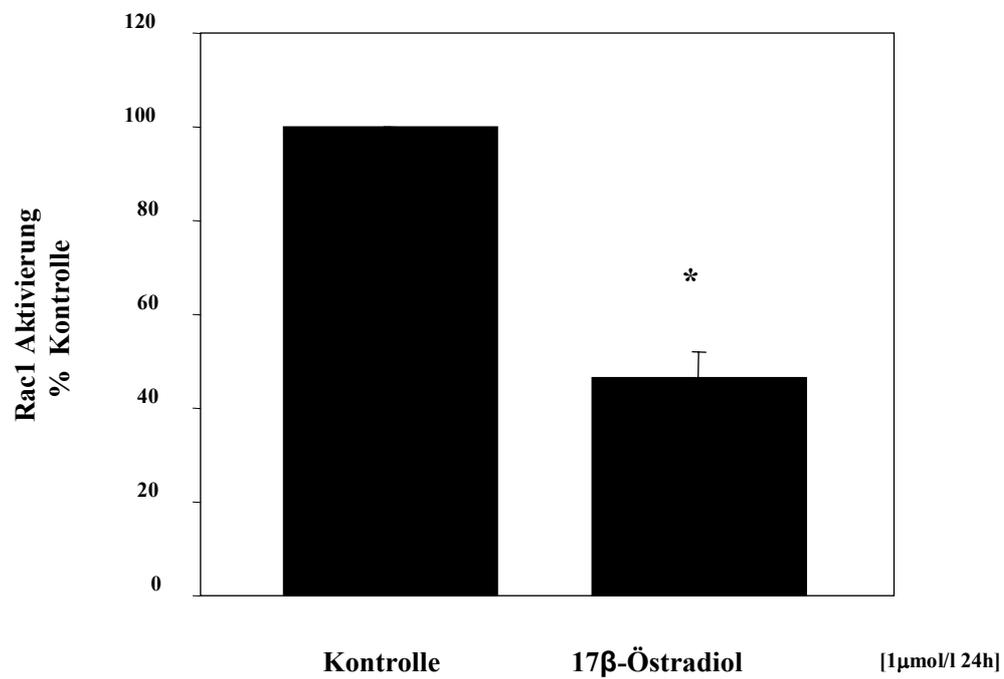


Abbildung 4-3: 17β-Östradiol hemmt die Aktivität der monozytären Rac1 GTPase.
Computer-densitometrische Auswertung der Rac1-Aktivität im Western Blot (n = 3, *p < 0.01 vs. Kontrolle).

4.3 Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) wird durch SDF-1 α aktiviert und vermittelt die Adhäsion von Monozyten unter Flussbedingungen

Die Rolle der monozytären Rac1 GTPase bei der Chemokin-getriggerten Monozyten-Adhäsion wurde in der laminaren Flusskammer und mittels GST-PAK Pull-Down Assays analysiert. Monozytäre THP-1-Zellen wurden mit konstitutiv-aktivem Rac1L61, dominant-negativem Rac1N17 oder einem Kontroll-Plasmid transfiziert und nach 24-stündiger Inkubationszeit mit einer Scherkraft von 2.0 dyn/cm² über den endothelialen Zellrasen perfundiert. Der Zellrasen wurde zuvor für 4 Stunden mit 10 ng/ml TNF α vorbehandelt. Die nach 3 Sekunden stationär verbleibenden, per definitionem fest adhärierenden Zellen wurden vor und nach Zugabe von 100 nM SDF-1 α quantifiziert. Es zeigt sich, dass mit dominant-negativem Rac1 transfizierte Zellen über deutlich schwächere adhäsive Eigenschaften verfügen als die Kontrollgruppe oder die mit konstitutiv-aktivem Rac1 transfizierten Zellen (s. Abbildung 4-4, weiße Balken). Zugabe von SDF-1 α verstärkte die Adhäsion der transfizierten THP-1 und zeigt bei mit konstitutiv-aktivem Rac1L61 transfizierten Zellen einen synergistischen Effekt (s. Abbildung 4-4, schwarze Balken). Umgekehrt konnten die Adhäsionseigenschaften von Zellen, die mit dominant-negativem Rac1N17 transfiziert wurden, auch durch Stimulation mit SDF-1 α nicht verstärkt werden. Mittels GST-PAK Pull-Down Assays konnte nachgewiesen werden, dass die monozytäre Rac1 GTPase durch SDF-1 α aktiviert wird (s. Abbildung 4-5). Monozytäre THP-1 wurden für unterschiedliche Inkubationszeiten (0, 30, 60, 180 Sekunden) mit 100 nmol SDF-1 α behandelt. Die Aktivität der Rac1 GTPase nimmt innerhalb der ersten 30 Sekunden zu und mündet in einem Aktivitätsmaximum bei 30 Sekunden. Die Aktivität verringert sich bereits nach 60 Sekunden und erreicht nach 180 Sekunden nahezu den Wert der unbehandelten Kontroll-Gruppe. Bedeutend bei diesen Ergebnissen ist, dass sich die Aktivierung der monozytären Rac1 GTPase durch SDF-1 α in demselben Zeitraum wie die durch SDF-1 α -vermittelte Monozyten-Adhäsion abspielt.

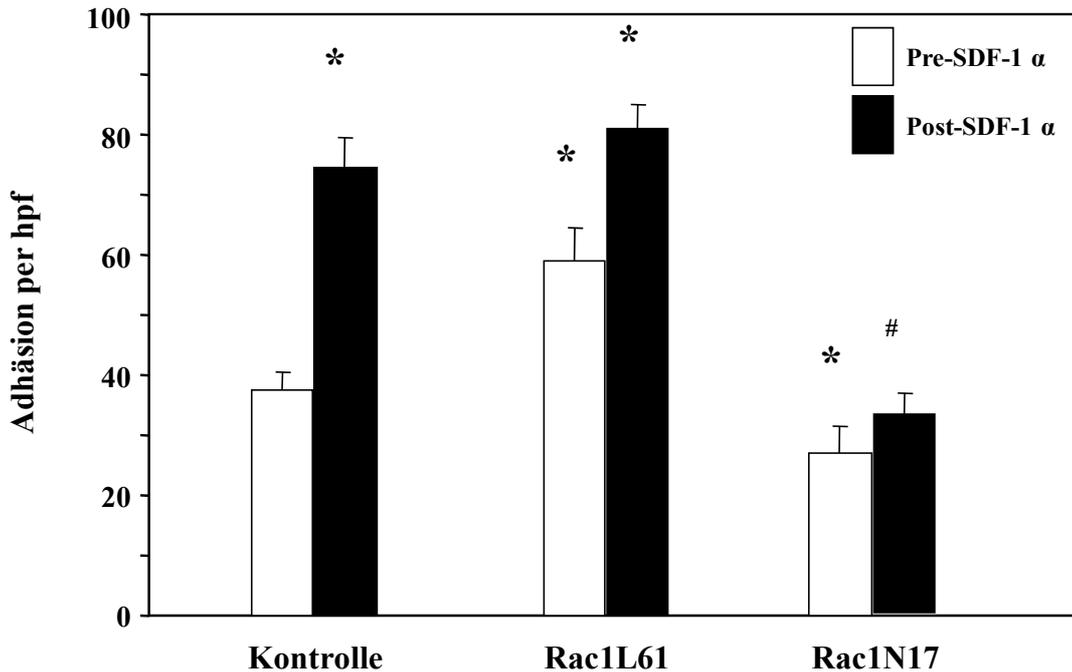


Abbildung 4-4: Rac1 vermittelt die Adhäsion monozytärer THP-1-Zellen unter Flussbedingungen.

Monozytäre THP-1 wurden mit konstitutiv-aktivem Rac1L61, dominant-negativem Rac1N17 oder einem Kontroll-Plasmid transfiziert. Zur Untersuchung von adhäsiven Interaktionen zwischen Endothelzellen und monozytären THP-1-Zellen wurde der endotheliale Zellrasen mit 10 ng/ml TNF α für 4 Stunden bei 37 °C vorbehandelt. Die transfizierten THP-1-Zellen wurden nach 24-stündiger Equibrilierung mit einer Scherkraft von 2.0 dyn/cm² über den Zellrasen perfundiert. Die feste Adhäsion der THP-1-Zellen wurde jeweils 30–60 Sekunden vor und nach Zugabe von 100 nM SDF-1 α quantifiziert. Es zeigt sich, dass mit dominant-negativem Rac1 transfizierte Zellen über deutlich schwächere adhäsive Eigenschaften verfügen als die Kontrollgruppe oder die mit konstitutiv-aktivem Rac1 transfizierten Zellen (weiße Balken). Auch durch zusätzliche Behandlung mit SDF-1 α konnten die Adhäsionseigenschaften der Rac1N17-transfizierten THP-1 nicht signifikant verbessert werden (schwarze Balken). Die Adhäsion monozytärer THP-1-Zellen ist somit Rac1-abhängig.

(n = 3 für jede Kondition, *p < 0.01 vs. unstimulierte Kontrolle, #p < 0.01 vs. stimulierte Kontrolle und Rac1L61, alle anderen p = n.s. gegeneinander).

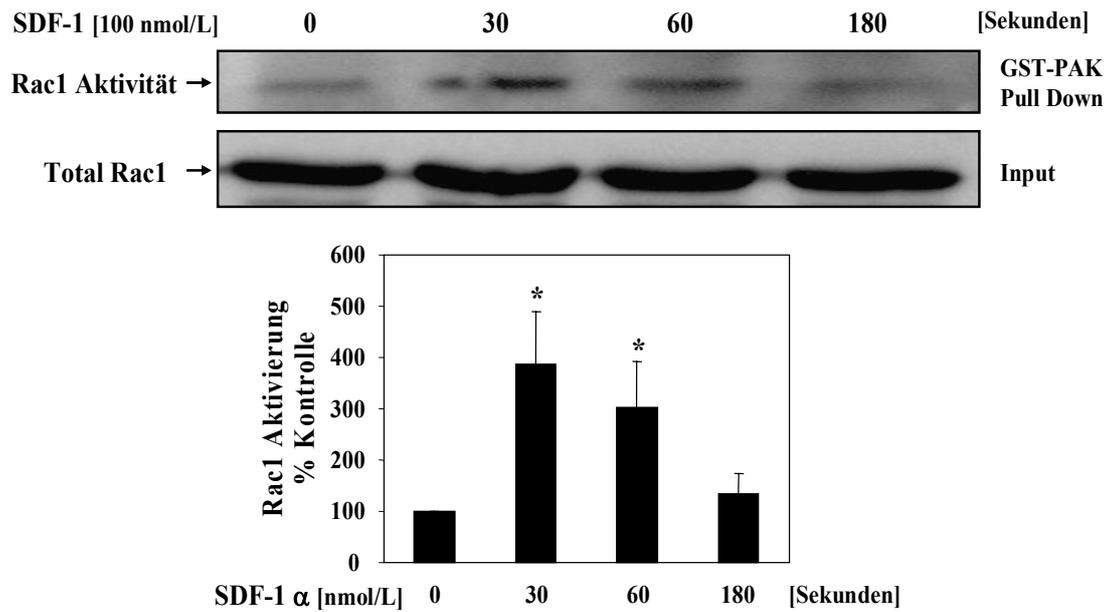


Abbildung 4-5: Die Rac1-Aktivität in monozytären THP-1-Zellen wird zeitabhängig von SDF-1 α getriggert (GST-PAK Pull-Down Assay).

Monozytäre THP-1-Zellen wurden mit 100 nM SDF-1 α mit verschiedenen Inkubationszeiten behandelt. Die Aktivierung von Rac1 in THP-1-Zellen wurde mittels GST-PAK Pull-Down Assay bestimmt. Als Ladekontrolle wurde Total Rac1 bestimmt (untere Banden).

Die Aktivierung von Rac1 in THP-1-Zellen wird durch SDF-1 α getriggert und zeigt ein Aktivitäts-Maximum bei der Inkubationsdauer von 30 Sekunden.

(n = 3, *p < 0.02 vs. unstimulierte Kontrolle). Total Rac = Lade-Kontrolle.

4.4 Mechanismus der Rac1-vermittelten Monozyten-Adhäsion

Nachfolgend wurde der zugrunde liegende Signalweg untersucht, über den die Rac1 GTPase die Adhäsion von Monozyten triggert. Im Hinblick auf die in unterschiedlichen Zellpopulationen durch Rac1 vermittelten Mechanismen, wurden die Untersuchungen ausgerichtet auf die Rolle der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und die Modulation von Aktin-Zytoskelett-Strukturen bei der Rac1-vermittelter Monozyten-Adhäsion. Nach Transfektion mit konstitutiv-aktivem Rac1L61 zeigt sich im Vergleich zur mit dominant-negativem Rac1N17 transfizierten Gruppe eine deutliche Steigerung der Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) (s. Abbildung 4-6, weiße Balken). Zugabe von 100 nM SDF-1 α für 30 Sekunden verstärkt die ROS-Freisetzung auch bei Kontroll-transfizierten Zellen, wohingegen die ROS-Freisetzung in der mit dominant-negativem Rac1N17 transfizierten Gruppe weiterhin stagniert (s. Abbildung 4-6, schwarze Balken). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden anschließend Färbungen des Aktin-Zytoskeletts mit F-Aktin Phalloidin durchgeführt. Monozytäre THP-1-Zellen wurden transfiziert mit konstitutiv-aktivem Rac1L61, dominant-negativem Rac1N17 sowie einem Kontroll-Plasmid. Ein Teil der Zellen wurde mit SDF-1 α und Cytochalasin D behandelt, im Zytospin-Verfahren auf Objektträger aufgebracht und mit F-Aktin Phalloidin angefärbt. Mit Kontroll-Plasmiden transfizierte monozytäre THP-1-Zellen zeigen eine runde Zelloberfläche mit perinukleärer Ansammlung von Aktin (s. Abbildung 4-7). Nach Zugabe von SDF-1 α bilden diese Zellen Pseudopodien-artige Aktin-Zytoskelett-Strukturen (Lamellipodien) an ihrer Zelloberfläche aus. Die Modulation der Zellmorphologie zeigt sich bei mit konstitutiv-aktivem Rac1L61 transfizierten Zellen bereits vor Stimulation mit SDF-1 α . Nach Zugabe von SDF-1 α prägen sich die Aktin-Zytoskelett-Strukturen noch deutlicher aus. Im Gegensatz hierzu ist bei Zellen, die mit dominant-negativem Rac1N17 transfiziert wurden weder unbehandelt, noch unter Zugabe von SDF-1 α , eine Veränderungen der Zellmorphologie erkennbar. Um sicherzustellen, dass es sich bei den zellmorphologischen Veränderungen um eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts handelt, wurden monozytäre THP-1-Zellen in einem weiteren Versuch mit Cytochalasin D, einem Hemmstoff der Aktin-Polymerisation, vorbehandelt. Vorbehandlung mit Cytochalasin D konnte das Auftreten der zellmorphologischen Veränderungen unter SDF-1 α vollständig verhindern (s. Abbildung 4-7).

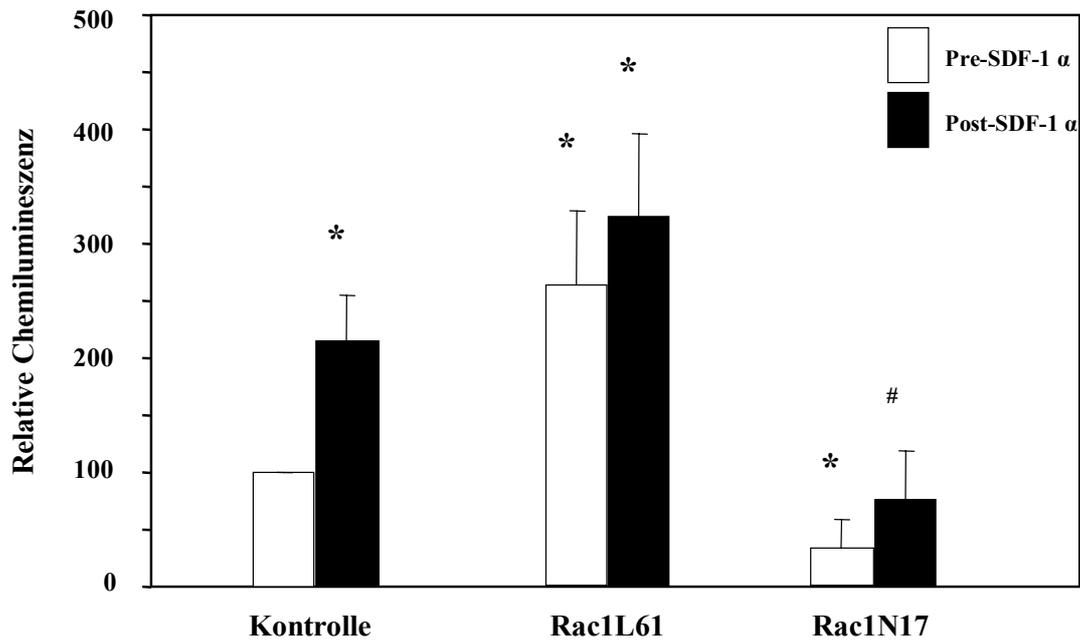


Abbildung 4-6: Die ROS-Freisetzung ist Rac1-abhängig (L-012 Assay).

Nach Transfektion monozytärer THP-1 mit konstitutiv-aktivem Rac1L61, dominant-negativem Rac1N17 und einem Kontroll-Plasmid erfolgte die Bestimmung der Freisetzung des reaktiven Sauerstoffradikales (ROS) Superoxid im L-012 Chemilumineszenz-Verfahren. Bei THP-1-Zellen, die mit dominant-negativem Rac1 transfiziert wurden, zeigt sich eine verminderte Freisetzung von ROS (weißer Balken), die auch durch Vorbehandlung mit SDF-1 α nicht aufzuheben ist (schwarzer Balken).

(n = 3 für jede Kondition, *p < 0.01 vs. unstimulierte Kontrolle, #p < 0.01 vs. stimulierte Kontrolle und Rac1L61, alle anderen p = n.s. gegeneinander).

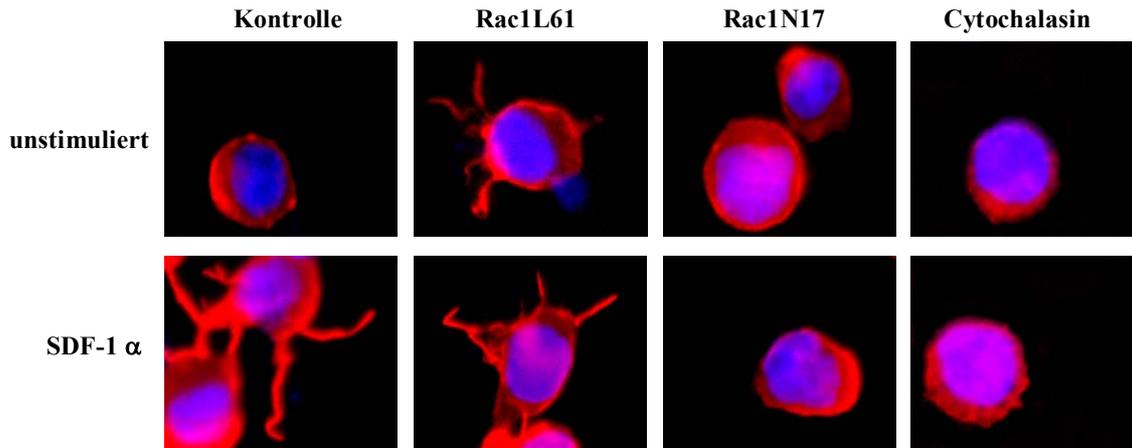


Abbildung 4-7: Rac1 induziert basale und SDF-1 α -getriggerte Freisetzung von ROS und die Ausbildung Pseudopodien-artiger Veränderungen von Aktin-Zytoskelett-Strukturen (Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen).

Monozytäre THP-1-Zellen wurden transfiziert mit konstitutiv-aktivem Rac1, dominant-negativem Rac1 sowie einem Kontroll-Plasmid. Ein Teil der Zellen wurde mit SDF-1 α und Cytochalasin D behandelt, im Zytospin-Verfahren auf Objektträger aufgebracht und mit F-Aktin Phalloidin angefärbt.

Mit Kontroll-Plasmid oder dominant-negativem Rac1 transfizierte Zellen zeigen eine runde Zellmorphologie mit glatter Oberfläche. Nach Behandlung mit SDF-1 α bilden die mit Kontroll-Plasmid transfizierten Zellen Pseudopodien-artige Aktin-Zytoskelett-Strukturen an ihrer Zelloberfläche aus. Diese Veränderung bleibt bei Zellen, die mit dominant-negativem Rac1 transfiziert wurden, unter Basalbedingungen und auch nach Behandlung mit SDF-1 α aus. Die Modulation der Zell-Morphologie zeigt sich bei THP-1-Zellen, die mit konstitutiv-aktivem Rac1 transfiziert wurden, schon ohne Stimulation mit SDF-1 α . Durch zusätzlich Behandlung mit SDF-1 α erscheint die Zytoskelett-Morphologie noch stärker verändert. Vorbehandlung mit Cytochalasin D konnte die SDF-1 α getriggerten Zell-morphologischen Modulationen verhindern.

Um die funktionelle Relevanz der Rac1-abhängigen Freisetzung von ROS und die Modulation von Aktin-Zytoskelett-Strukturen bei der Rac1-induzierten Monozyten-Adhäsion zu untersuchen, wurden mit einem Kontroll-Plasmid und konstitutiv-aktivem Rac1L61 transfizierte THP-1-Zellen mit biochemischen Inhibitoren behandelt. In THP-1-Zellen, die mit Kontroll-Plasmiden transfiziert wurden, konnte die Freisetzung von ROS sowohl durch Zugabe von NAC, einem unspezifischen Antioxidans und Radikalfänger, als auch durch Behandlung mit PEG-SOD, einem spezifischen Superoxid-Radikalfänger, vermindert werden (unbehandelte Kontrolle 100 ± 0 %, SDF-1 α $261,2 \pm 31,8$ %, SDF-1 α /NAC $103,7 \pm 9,3$ %, SDF-1 α /PEG-SOD $105,0 \pm 10$ %, $p < 0,002$). Auf die Zell-Adhäsion hatten weder NAC noch PEG-SOD Einfluss. Im Gegensatz hierzu zeigte die Vorbehandlung mit Cytochalasin D einen hemmenden Effekt auf den SDF-1 α -vermittelten Anstieg der Zell-Adhäsion bei Kontroll-transfizierten monozytären THP-1-Zellen (s. Abbildung 4-8). Bei THP-1-Zellen, die mit konstitutiv-aktivem Rac1L61 transfiziert wurden, konnte sowohl eine vermehrte, Rac1-abhängige Freisetzung von ROS, als auch eine stärkere, ebenfalls Rac1-abhängige Zell-Adhäsion nachgewiesen werden (unbehandelte Kontrolle $298,2 \pm 63,2$ %, SDF-1 α $356,8 \pm 78,6$ %, SDF-1 α /NAC $106,0 \pm 17,1$ %, SDF-1 α /PEG-SOD $107,7 \pm 12,2$ %, $p < 0,001$). Auch bei mit konstitutiv-aktivem Rac1L61 transfizierten Zellen konnte die Adhäsion ausschließlich durch Behandlung mit Cytochalasin D vermindert werden, die Behandlung mit NAC und PEG-SOD blieben auch hier ohne Effekt.

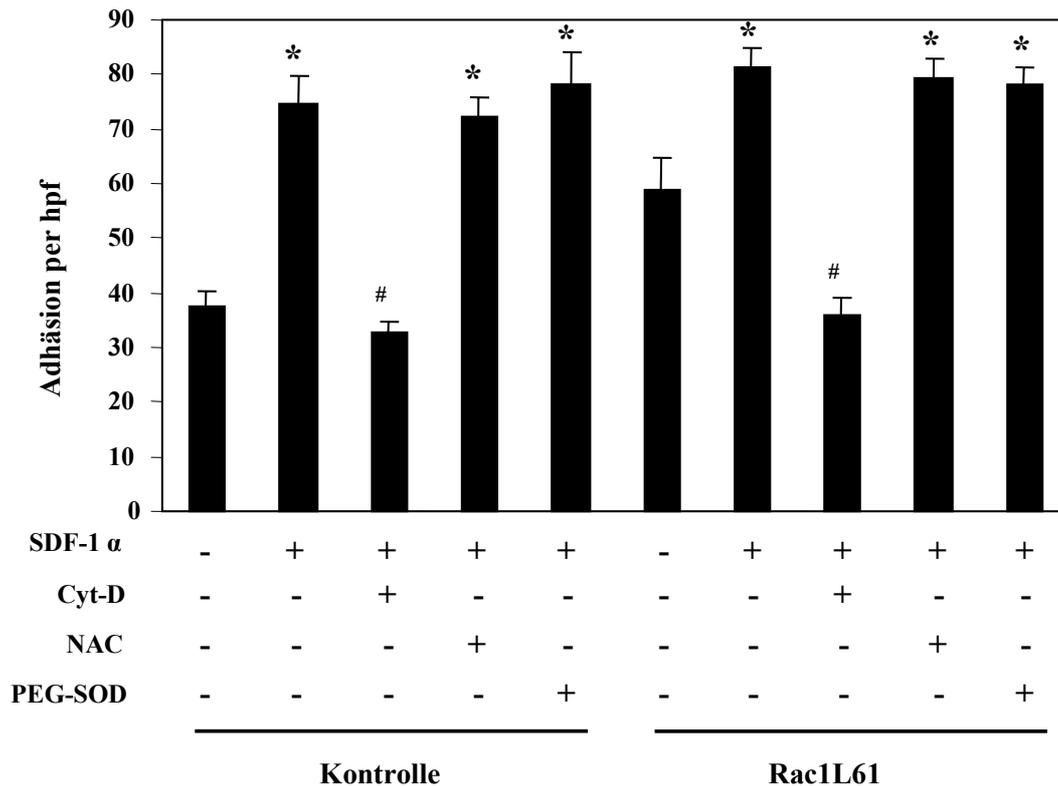


Abbildung 4-8: Die Rac1 GTPase induziert durch Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts eine ROS-unabhängige Adhäsion von monozytären THP-1-Zellen.

Monozytäre THP-1-Zellen wurden mit konstitutiv-aktivem Rac1L61 oder einem Kontroll-Plasmid transfiziert und mit Cytochalasin D (Cyt-D), N-Acetyl-Cystein (NAC), Polyethylenglykol-Superoxide-Dismutase (PEG-SOD) vorbehandelt. Der endotheliale Zellrasen wurde für 4 Stunden mit 10 ng/ml TNF α vorbehandelt. THP-1-Zellen wurden mit Scherkraft von 2.0 dyn/cm² durch die Flusskammer perfundiert. Die per definitionem nach 3 Sekunden einsetzende feste Adhäsion wurde 30 – 60 Sekunden vor und nach Zugabe von 100 nM SDF-1 α quantifiziert.

In mit Kontroll-Plasmiden transfizierten Zellen konnte die Freisetzung von ROS durch NAC (unspezifisches Antioxidans, unspezifischer Radikalfänger) und durch PEG-SOD (spezifischer Superoxid-Radikalfänger) vermindert werden. NAC und PEG-SOD haben jedoch keinen Einfluss auf die Zell-Adhäsion. Die Vorbehandlung mit dem Aktin-Zytoskelett-Hemmer Cytochalasin D konnte den SDF-1 α vermittelten Anstieg der Zell-Adhäsion verringern.

Bei mit konstitutiv-aktivem Rac1 transfizierten THP-1-Zellen wurde eine vermehrte, Rac1-abhängige Freisetzung von ROS und eine stärkere, Rac1-abhängige Zell-Adhäsion nachgewiesen. Durch Behandlung mit Cytochalasin D konnte die Zell-Adhäsion vermindert werden.

Die Zell-Adhäsion ist sowohl bei Zellen, die mit Kontroll-Plasmid transfiziert wurden, als auch bei THP-1-Zellen, die mit aktivem Rac1 transfiziert wurden, durch Hemmung der Aktin-Zytoskelett-Strukturen mit Cytochalasin D zu vermindern. Eine Hemmung der Freisetzung von ROS durch NAC oder PEG-SOD hat keinen modulatoreischen Einfluss auf das adhäsive Verhalten von THP-1-Zellen.

(n = 3 für jede Kondition, *p < 0.01 vs. unstimulierte Zellen, #p < 0.01 vs. stimulierte Zellen, alle anderen p = n.s. gegeneinander).

4.5 Die Integrin-Linked Kinase (ILK) vermittelt die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Um die Modulationswege der ILK in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) zu untersuchen, wurden VSMC mit cDNA Konstrukten für Wild-Typ ILK und dominant-negative ILK sowie einem Kontroll-Plasmid transfiziert. Der Einfluß von ILK auf die Apoptoserate von VSMC wurde mittels Messung im Fluoreszenz-aktivierten Zell-Sortier-System (FACS) nach Annexin V Färbung analysiert. Der Apoptose-Peak zeigt sich in den durchgeführten Messungen ILK-unabhängig bei allen transfizierten VSMC gleich hoch (s. Abbildung 4-9). Weder die Aktivierung noch die Hemmung von ILK in VSMC hatten einen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate der Zellen. Im Gegensatz hierzu zeigten sich bei VSMC, die mit Wild-Typ ILK cDNA Plasmiden transfiziert wurden, signifikant erhöhte Migrations- und Proliferationsraten. VSMC, die mit dominant-negativem ILK transfiziert wurden, wiesen demgegenüber deutlich verringerte Migrations- und Proliferationsraten auf (s. Abbildung 4-11 und Abbildung 4-12). Die für die Migrationsrate optimale SDF-1 α -Konzentration wurde in Vorversuchen ermittelt (Abbildung 4-10).

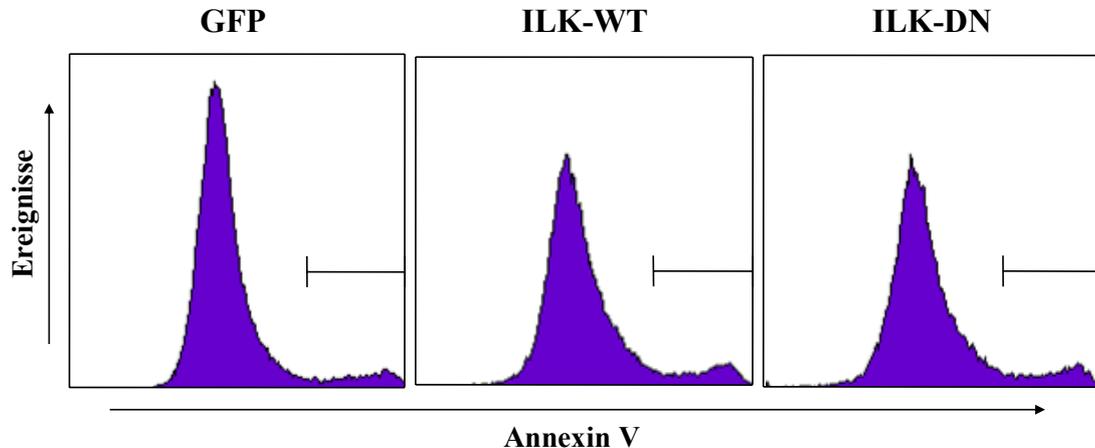


Abbildung 4-9: Die ILK hat in VSMC keinen Einfluss auf die Apoptoserate (FACS-Auswertung).

VSMC wurden nach Transfektion mit jeweils 1 μ g Kontroll-Plasmid, Wild-Typ ILK (WT) oder dominant-negativer ILK (DN) für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch gemessen.

Der Apoptose-Peak zeigt sich in den durchgeführten Messungen ILK-unabhängig bei allen transfizierten VSMC gleich hoch.

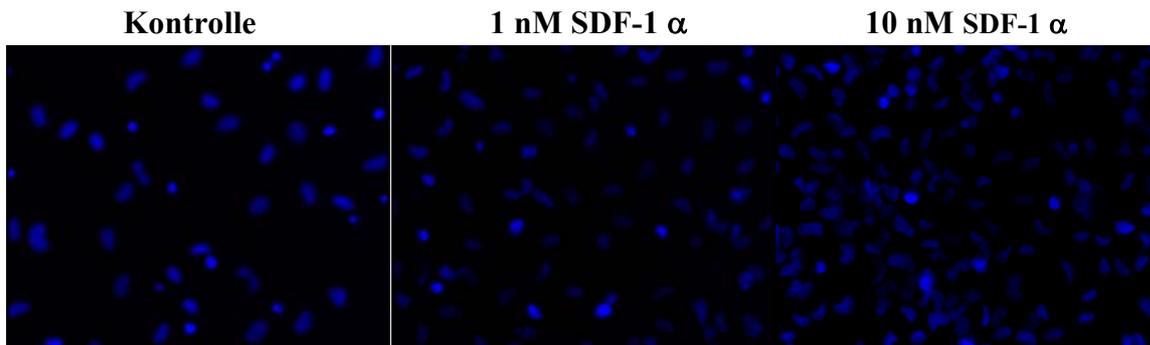


Abbildung 4-10: Die optimale SDF-1 α Konzentration wurde in Vorversuchen ermittelt. Die VSMC-Migrationsrate korreliert mit der Höhe der SDF-1 α Konzentration (Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen).

In die Schalen einer 24-Loch-Platte wurden verschiedene Konzentrationen von SDF-1 α (0, 1 nM, 10 nM) gegeben. Die Boyden-Kammern wurden mit jeweils 1×10^4 VSMC befüllt und in die Schalen eingesetzt. Nach einer Migrationsdauer von 24 Stunden wurden die Filter der Boyden-Kammern mit DAPI eingedeckt und die migrierten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop mit Lucia Software quantifiziert.

Die Aufnahmen mit dem Fluoreszenz-Mikroskop zeigen eine Konzentrations-abhängige VSMC-Migration, die mit steigender SDF-1 α Konzentration zunimmt (10 nM > 1 nM > 0 nM).

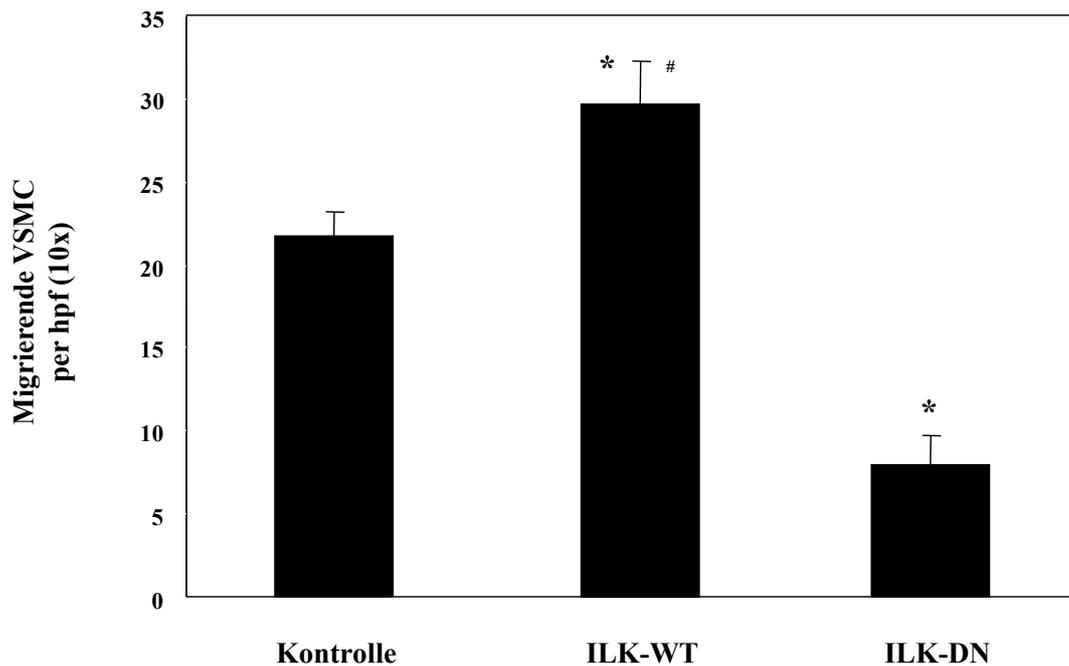


Abbildung 4-11: Die ILK fördert in VSMC die Migration (Migrations-Versuch).

Mit jeweils 1 µg Kontroll-Plasmid, Wild-Typ ILK (WT) oder dominant-negativer ILK (DN) transfizierte VSMC wurden nach Transfektion für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden je 1×10^4 VSMC in Boyden-Kammern ausgesät. Als chemotaktischer Lockstoff wurde 10 nM SDF-1 α in 24-Loch-Platten unter den Boyden-Kammern zugegeben. Die Migrationsdauer betrug 24 Stunden.

Mit Wild-Typ (WT) ILK transfizierte VSMC zeigen gegenüber mit Kontroll-Plasmid oder dominant-negativer (DN) ILK transfizierten VSMC einen signifikanten Anstieg der Migrationsrate. Die Transfektion mit dominant-negativer ILK zeigt darüber hinaus eine signifikante Hemmung des Migrationsverhaltens.

(n = 3 für jede Kondition, *p < 0.01 vs. Kontrolle, *#p < 0.01 vs. dominant-negativer ILK und Kontrolle).

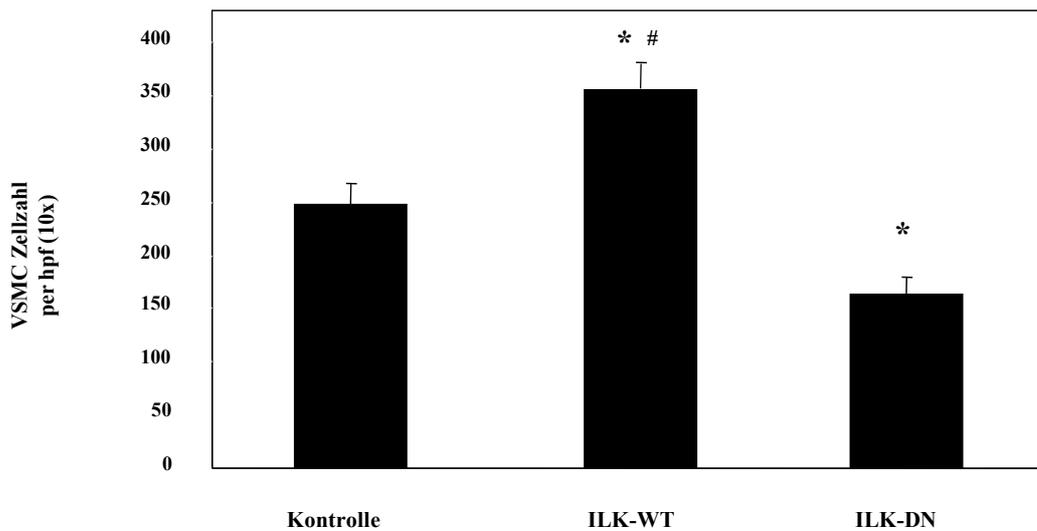


Abbildung 4-12: Die ILK fördert in VSMC die Proliferation (Zell-Zählung).

Mit jeweils 1 µg Kontroll-Plasmid, Wild-Typ (WT) ILK oder dominant-negativer (DN) ILK transfizierte VSMC wurden nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden abtrypsiniert, in gleichen Mengen Medium resuspendiert und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Unter Transfektion mit Wild-Typ ILK zeigt sich gegenüber den mit Kontroll-Plasmid und dominant-negativer ILK transfizierten Zellen eine signifikant erhöhte Proliferationsrate. Transfektion mit dominant-negativer ILK hemmt signifikant die Proliferation von VSMC.

(n = 3 für jede Kondition, *p < 0.01 vs. Kontrolle, *#p < 0.01 vs. dominant-negativer ILK und Kontrolle).

4.6 Regulation der Integrin-Linked Kinase (ILK) durch Angiotensin II und 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA) Reduktase-Hemmer (Statin)

Die Protein-Expression der ILK und die ILK-Aktivität wurden in VSMC nach Behandlung mit pro- und anti-atherogenen Wirkstoffen untersucht. Nach Inkubation mit der pro-atherogenen Substanz Angiotensin II konnte ein signifikanter, progressiver Anstieg der ILK-Protein-Expression über einen Zeitraum von 6 bis zu 24 Stunden (s. Abbildung 4-13). Angiotensin II konnte die Kinase-Aktivität nach 6 h signifikant steigern mit einem Plateau-effekt bis 24 Stunden (s. Abbildung 4-14). Die Behandlung mit dem anti-atherogenen Wirkstoff Atorvastatin konnte sowohl die Protein-Expression der ILK als auch die Kinase-Aktivität über einen Zeitraum von 24 Stunden signifikant vermindern (s. Abbildung 4-15).

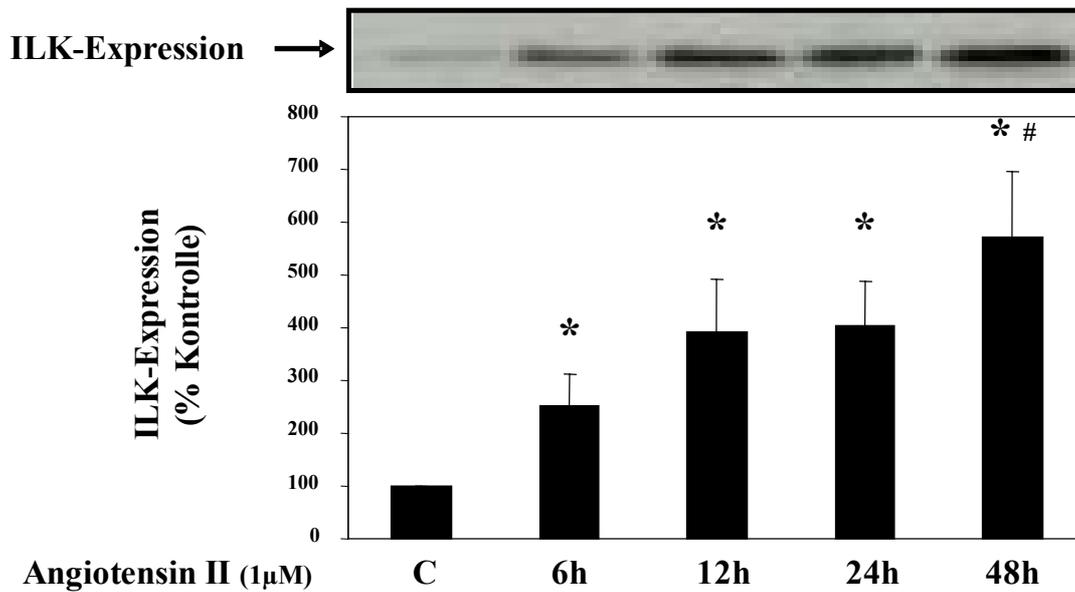


Abbildung 4-13: Angiotensin II fördert die ILK-Expression zeitabhängig (Western Blot).

VSMC wurden über unterschiedliche Inkubationszeiten (0, 6, 12, und 24 Stunden) mit 1 µM Angiotensin II inkubiert.

Zur Bestimmung der ILK-Expression wurden Lysate mittels Western Blots mit einem ILK-Antikörper untersucht.

Die Messung der ILK-Expression erfolgte nach Western-Blotting durch computerdensitometrische Auswertung der Proteinbanden.

Angiotensin II bewirkt eine zeitabhängige Zunahme der ILK-Expression mit einem Plateau nach 12-24 h (24 Stunden = 12 Stunden > 6 Stunden > 0 Stunden).

(n=3 für jede Kondition, *p < 0.02 vs. Kontrolle (C), #p < 0.02 vs. VSMC behandelt mit Angiotensin II für 6 Stunden).

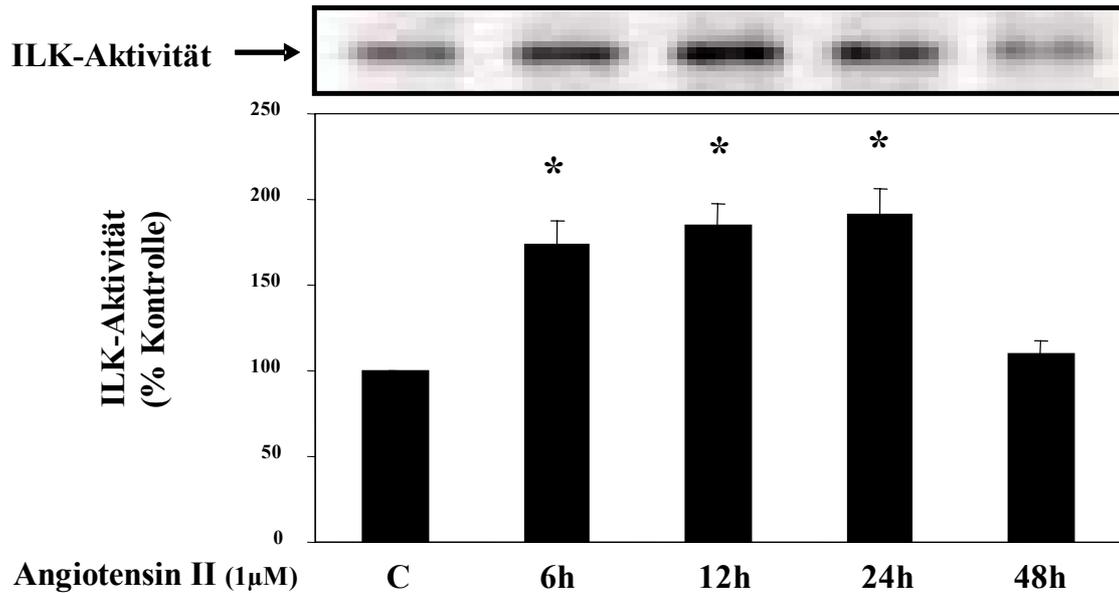


Abbildung 4-14: Angiotensin II fördert die ILK-Aktivität zeitabhängig (Kinase Assay).

VSMC wurden über unterschiedliche Inkubationszeiten (0, 6, 12, 24 und 48 Stunden) mit 1 µM Angiotensin II inkubiert.

Zur Bestimmung der ILK-Aktivität wurden immunpräzipitierte Zellen mit GSK-3 Substrat Peptid inkubiert. Die Analyse der GSK-3β-Phosphorylierung wurde anschließend per Western Blot durchgeführt.

Die Messung der ILK-Aktivität erfolgte nach Western-Blotting durch computer-densitometrische Auswertung der Proteinbanden.

Angiotensin II fördert die ILK-Aktivität zeitabhängig mit einem Aktivitäts-Maximum und Plateau zwischen 6 bis 24 Stunden Inkubationsdauer.

(n=3 für jede Kondition, *p < 0.02 vs. Kontrolle (C), #p < 0.02 vs. VSMC behandelt mit Angiotensin II für 6 Stunden).

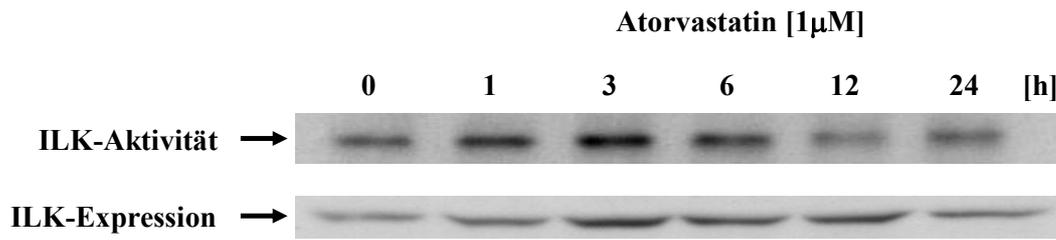


Abbildung 4-15: Statine hemmen ILK-Expression und ILK-Aktivität zeitabhängig (Western Blot).

Statin-induzierte Effekte auf Integrin-Linked Kinase (ILK) in VSMC im Zeitverlauf.

Die Statin-induzierte Hemmung von ILK-Aktivität und ILK-Expression ist zeitabhängig und zeigt ein Maximum der ILK-Aktivität bei 3 Stunden, sowie zwei Maxima der ILK-Expression bei 3 Stunden sowie 12 Stunden.

4.7 Die Integrin-Linked Kinase (ILK) vermittelt Angiotensin II- und 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA) Reduktase-Hemmer (Statin) -induzierte Effekte auf die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Im folgenden Versuchsaufbau wurde analysiert, ob die spezifischen Wirkungen von Angiotensin II und Atorvastatin auf die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) durch die Integrin-Linked Kinase (ILK) vermittelt werden. In funktionellen Assays konnte nachgewiesen werden, dass Statine die Expression und Aktivität der ILK hemmen (Abbildung 4-16). Ferner zeigte sich, dass die Vorbehandlung mit Angiotensin II einen synergistischen Effekt auf die SDF-1 α -getriggerte Migration und Proliferation von VSMC hat (s. Abbildung 4-17 und Abbildung 4-18). Dieser Effekt konnte durch gleichzeitige Behandlung mit dem Angiotensin II-Rezeptor-Antagonisten Losartan aufgehoben werden. In Zellen, die mit ILK Wild-Typ cDNA Plasmiden transfiziert wurden, zeigt sich ein durch Angiotensin II induzierter Anstieg von Migration und Proliferation. Im Gegensatz hierzu wurde die Wirkung von Angiotensin II in VSMC, welche mit dominant-negativen ILK cDNA Plasmiden transfiziert wurden, vollständig aufgehoben. Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung von Angiotensin II auf Migration und Proliferation durch die ILK vermittelt wird. Eine Vorbehandlung mit Atorvastatin oder die Transfektion mit dominant-negativer ILK wiesen eine equipotente Hemmung von Migration und Proliferation auf (s. Abbildung 4-17 und Abbildung 4-18). Die Behandlung mit Atorvastatin bewirkte eine signifikante Herabregulation von ILK-Expression und Kinase-Aktivität. Die Statin-induzierte Hemmung konnte durch Behandlung mit dem Statin-Gegenspieler Mevalonat aufgehoben werden. Gleiches zeigte sich nach Transfektion von Zellen mit Wild-Typ ILK cDNA. In VSMC, die ILK-WT überexprimierten, wurde die Atorvastatin-bedingte Hemmung der Migration und Proliferation aufgehoben. Transfektion mit dominant-negativer ILK und nachfolgende Atorvastatin-Inkubation zeigten einen synergistischen Effekt auf die Hemmung der VSMC-Migration und VSMC-Proliferation. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass Statine ihre Wirkungen auf VSMC auch über andere, bisher unbekannte Signalwege erzeugen.

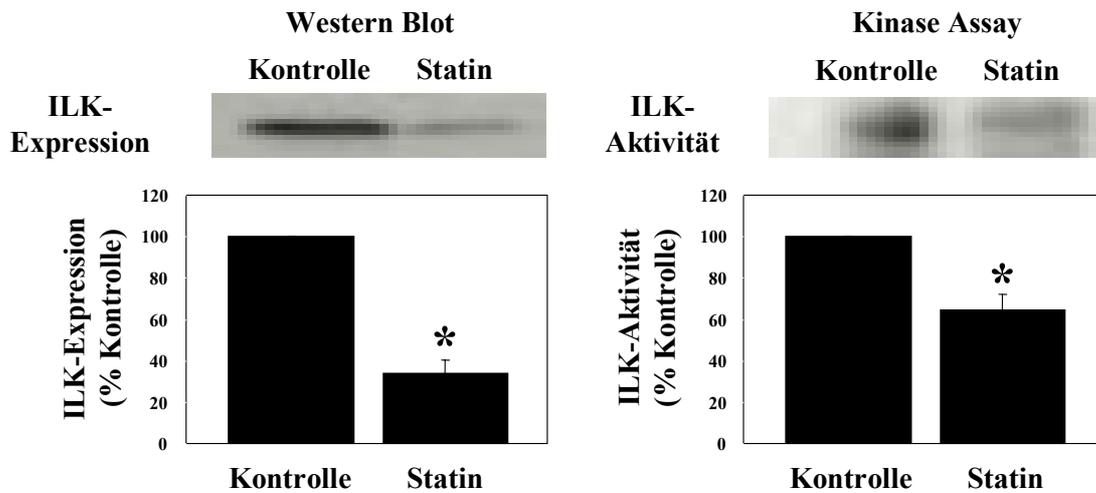


Abbildung 4-16: Statine hemmen die Expression und Aktivität der ILK (Western Blot und Kinase-Assay).

VSMC wurden für 24 Stunden mit 1 μ M Atorvastatin behandelt, lysiert und die Proteine in der SDS-PAGE Elektrophorese aufgetrennt. Nach Western Blotting wurde die Dichte der Proteinbanden computer-densitometrisch bestimmt.

Die ILK-Expression und die ILK-Aktivität werden in VSMC durch Behandlung mit Atorvastatin signifikant gemindert.

(n=3, *p < 0.02 vs. Kontrolle beim Kinase-Assay, p* < 0.01 bei der ILK-Expression).

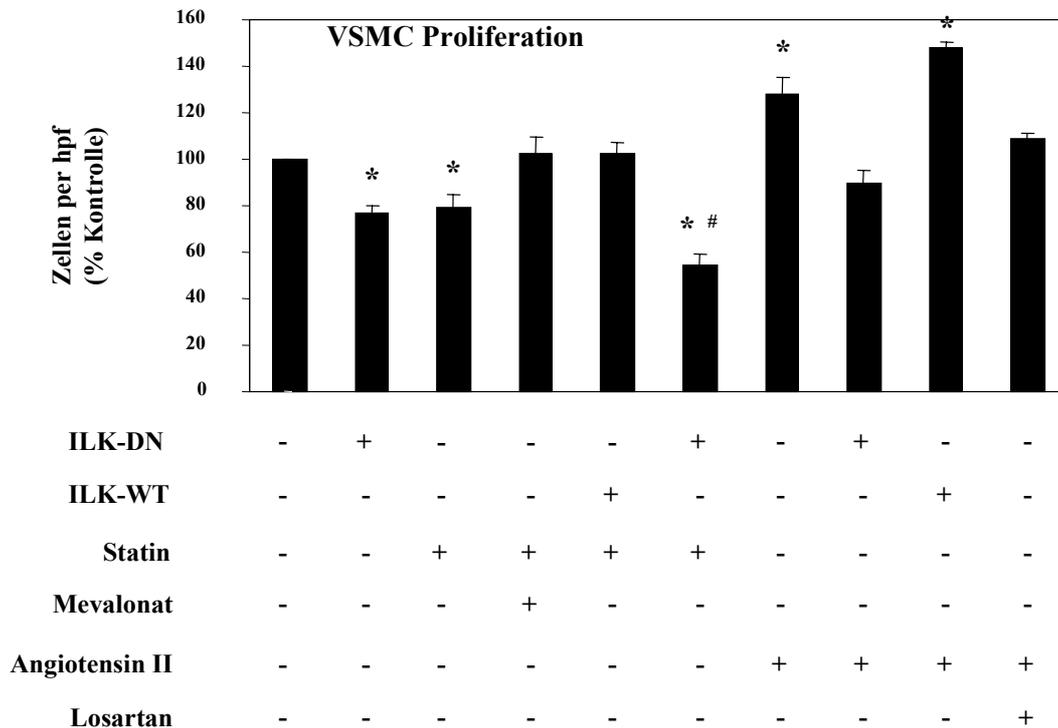


Abbildung 4-17: Statine hemmen die VSMC-Proliferation, Angiotensin II fördert die VSMC-Proliferation auf einem ILK-abhängigen Signalweg.

VSMC wurden transfiziert und für 24 Stunden mit 1µM Atorvastatin oder 1 µM Angiotensin II inkubiert. Um die Spezifität von Atorvastatin und Angiotensin II nachzuweisen, wurden die Zellen mit den jeweiligen Antagonisten der Wirkstoffe (200 µM Mevalonat als Antagonist von Atorvastatin, bzw. 10 µM Losartan als Antagonist von Angiotensin II) behandelt. Die Messung der Proliferationsrate wurde 48 Stunden nach Transfektion vorgenommen. Hierzu wurden die VSMC abtrypsiniert, in gleichen Mengen Medium resuspendiert und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Behandlung mit Atorvastatin oder Transfektion mit dominant-negativer ILK (DN-ILK) zeigen vergleichbare, signifikante Hemmungen der Proliferationsrate gegenüber der Kontrollgruppe. Zusätzliche Behandlung mit Atorvastatin nach Transfektion mit dominant-negativem ILK bewirkt eine stärkere Proliferationshemmung. Die Wirkung ist Statin-spezifisch und durch Behandlung mit Mevalonat hemmbar.

Behandlung mit Angiotensin II verstärkt die ILK-Expression und fördert die Kinase-Aktivität.

Transfektion mit Wild-Typ ILK (WT-ILK) wirkt Proliferations-fördernd. Zusätzliche Behandlung der mit Wild-Typ ILK transfizierten Zellen mit Angiotensin II zeigt einen synergistischen, Proliferations-fördernden Effekt. Die Wirkung auf die Proliferation ist Angiotensin II-spezifisch und durch Losartan hemmbar.

(n=3 für jede Kondition, *p < 0.03 vs. Kontrolle, #p < 0.01 vs. VSMC mit dominant-negativem ILK transfiziert oder VSMC mit Atorvastatin behandelt).

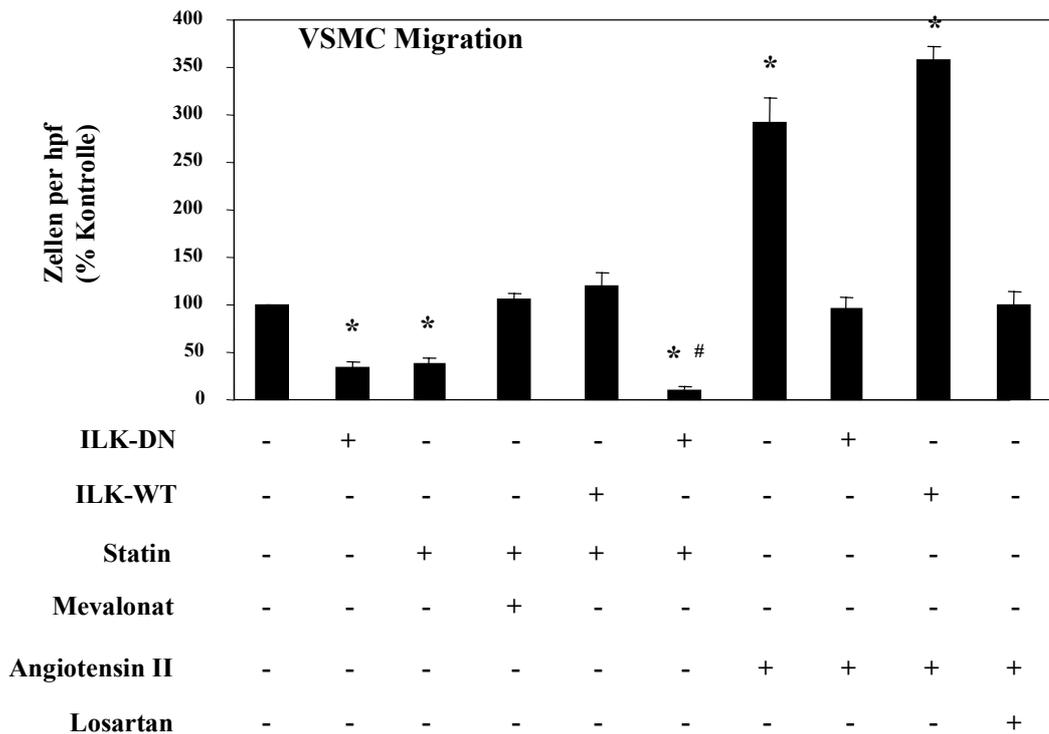


Abbildung 4-18: Statine hemmen die VSMC-Migration, Angiotensin II fördert die VSMC-Migration (Migrations-Versuch) auf einem ILK-abhängigen Signalweg.

VSMC wurden transfiziert und für 24 Stunden mit 1µM Atorvastatin oder 1 µM Angiotensin II inkubiert. Um die Spezifität von Atorvastatin und Angiotensin II nachzuweisen, wurden die Zellen mit den jeweiligen Antagonisten der Wirkstoffe (200 µM Mevalonat als Antagonist von Atorvastatin, bzw. 10 µM Losartan als Antagonist von Angiotensin II) behandelt. Der Migrations-Versuch wurde 48 Stunden nach Transfektion durchgeführt. Es wurden jeweils 1×10^4 VSMC pro Kondition in Boyden-Kammern ausgesät. Als chemotaktischer Lockstoff wurde 10 nM SDF-1 α in 24-Loch-Platten unter den Boyden-Kammern zugegeben. Nach einer Migrationsdauer von 24 Stunden wurden die Filter der Boyden-Kammern mit DAPI eingedeckt und die migrierten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop mit Lucia Software quantifiziert.

Nach Behandlung mit Atorvastatin oder Transfektion mit dominant-negativer ILK (DN-ILK) zeigt sich eine signifikante Hemmung der Migrationsrate. Behandlung mit Atorvastatin nach Transfektion mit dominant-negativem ILK bewirkt eine stärkere Migrations-Hemmung. Die Wirkung ist durch Mevalonat hemmbar und daher Statin-spezifisch. Behandlung mit Angiotensin II oder Transfektion mit Wild-Typ ILK (WT-ILK) wirken Migrations-fördernd. Zusätzliche Behandlung der mit Wild-Typ ILK transfizierten Zellen mit Angiotensin II zeigt einen synergistischen, Migrations-fördernden Effekt. Die Wirkung auf die VSMC-Migration ist Angiotensin II-spezifisch und durch den Angiotensin II-Antagonisten Losartan auf einem ILK-abhängigen Signalweg hemmbar.

(n=3 für jede Kondition, *p < 0.03 vs. Kontrolle, #p < 0.01 vs. VSMC mit dominant-negativem ILK transfiziert oder VSMC mit Atorvastatin behandelt).

4.8 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA) Reduktase-Hemmer (Statin) vermittelte Regulation der Integrin-Linked Kinase (ILK) in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) in vivo

Zum Nachweis der potentiellen Rolle von ILK in VSMC in vivo bei der Atherosklerose wurden Schnitte von Maus-Aorten von drei verschiedenen Populationen (Rosuvastatin-behandelte Mäuse, atherosklerotische ApoE ^{-/-} Mäuse, gesunde, unbehandelte Mäuse als Kontrollgruppe) immun-histochemisch gefärbt und untersucht. Nach Inkubation der Aortenschnitte mit primären (Anti-ILK Kaninchen und Anti- α -Smooth-Muscle Aktin Maus) und sekundären (Anti-Kaninchen Fluoreszein-Isothiocyant [FITC] und Anti-Maus Tetramethyl-Rhodamin [TRITC]) Antikörpern, sowie Anfärbung mit DAPI, wurden die Aortenschnitte Fluoreszenz-mikroskopisch analysiert und fotografiert. In gefärbten Aortenschnitten gesunder Mäuse zeigt die Co-Lokalisation von ILK mit VSMC, dass ILK in vivo in VSMC exprimiert wird. In atherosklerotisch veränderten Gefäßen findet sich im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine deutliche Mehranreicherung des grünen, für ILK spezifischen FITC-Fluoreszenz-Farbstoffes. In gleicher Lokalisation findet sich außerdem eine stärkere Anfärbung mit rotem, für VSMC spezifischen TRITC-Fluoreszenz-Farbstoffs. Im Vergleich hierzu zeigt sich bei Aortenschnitten von Mäusen aus der gesunden Kontrollgruppe eine wesentlich schwächere Anreicherung. Bei Statin-behandelten Mäusen ist die Anreicherung des grünen Fluoreszenz-Farbstoffes für ILK deutlich vermindert. Die Expression von Anti- α -Smooth-Muscle Aktin zeigt sich hingegen nach Statin-Behandlung unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies deutet auf eine durch die Statin-Behandlung induzierte Herabregulation von ILK in VSMC hin. Zusammenfassend zeigt sich, dass in vivo ILK in VSMC in atherosklerotisch veränderten Gefäßwandabschnitten vermehrt, nach Statin-Behandlung hingegen vermindert exprimiert wird (Abbildung 4-19).

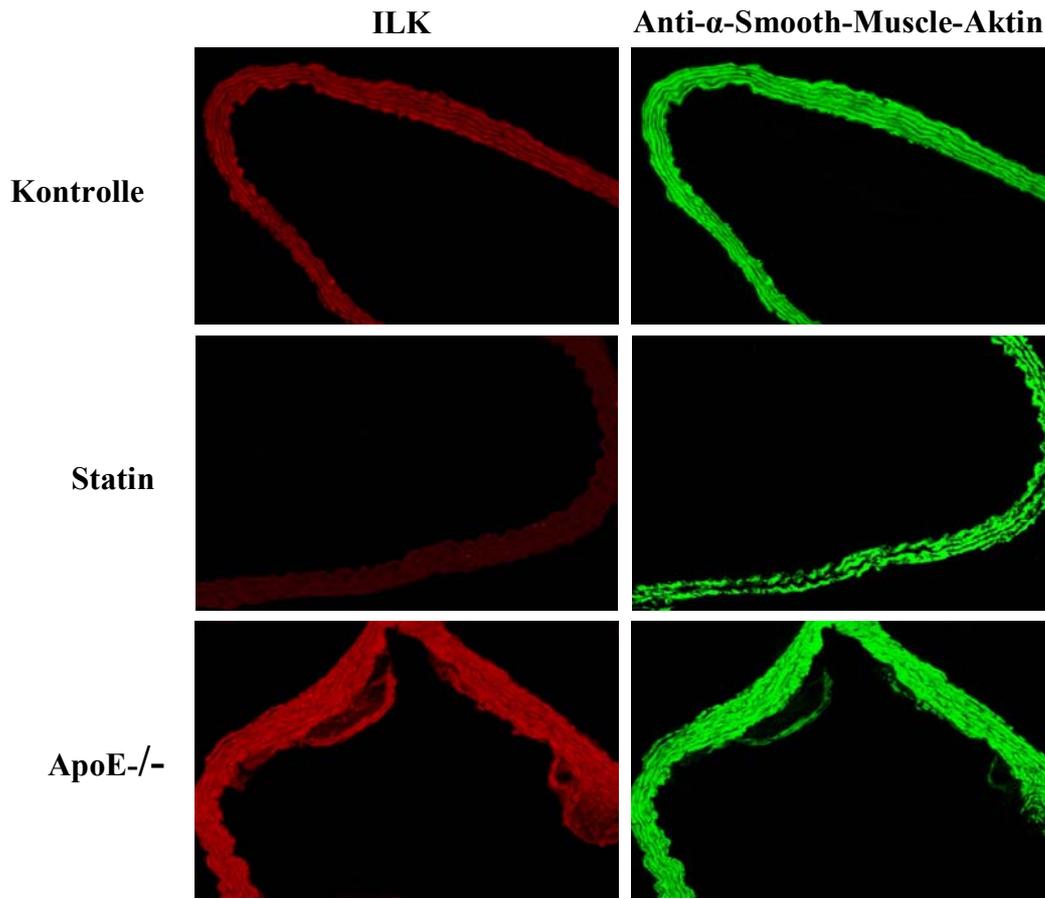


Abbildung 4-19: Anreicherung von ILK und VSMC in atherosklerotisch geschädigten Gefäßwänden im Vergleich (Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen).

Immunhistochemische Färbungen thorakaler Aortenschnitte zeigen eine deutliche Anreicherung von ILK und eine Vermehrung von VSMC in atherosklerotisch veränderten Gefäßwandabschnitten (Kontrolle vs. Statin vs. ApoE^{-/-}).

Rot = Anti- α -Smooth-Muscle (Tetramethyl-Rhodamin (TRITC))

Grün = Anti-ILK (Fluorescein-Isothiocyanat (FITC))

C57BL/6J Mäuse wurden mit 20 mg/kg Körpergewicht Rosuvastatin für 24 Tage behandelt. C57BL/6J ApoE^{-/-} Mäuse wurden für 7 Wochen mit einer Western-Type Diät behandelt. Die Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Nach Reinigung, Blockung und Permeabilisierung der Aortenschnitte erfolgte die Inkubation mit 1:50 verdünnten primären Antikörpern (Anti-ILK Kaninchen und Anti- α -Smooth-Muscle Aktin Maus) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach Reinigung erfolgte die Inkubation mit 1:50 verdünnten sekundären Antikörpern (Anti-Kaninchen Fluorescein-Isothiocyanat [FITC] und Anti-Maus Tetramethyl-Rhodamin [TRITC]) für 1 Stunde im Dunklen bei Raumtemperatur. Nach Eindecken mit DAPI wurden die gefärbten Schnitte unter dem Fluoreszenz-Mikroskop mit Hilfe von Lucia Software analysiert.

Bei atherosklerotischen ApoE^{-/-} Mäusen zeigt sich eine deutliche Anreicherung des grünen Fluoreszenz-Farbstoffes für ILK und des roten Fluoreszenz-Farbstoffes für VSMC. Hierbei handelt es sich um eine Vermehrung von ILK und eine Vermehrung von VSMC in atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden. Bei Statin-behandelten Mäusen ist die Anreicherung des grünen Fluoreszenz-Farbstoffes für ILK und des roten Fluoreszenz-Farbstoffes für VSMC deutlich vermindert. Dementsprechend geringer ist der ILK- und VSMC-Anteil in den angefärbten Aortenschnitten. Behandlung mit Statinen bewirkt eine ILK-abhängige Hemmung der VSMC-Anreicherung in atherosklerotisch veränderten Gefäßwandabschnitten.

5. Diskussion

5.1 Die Bedeutung der monozytären Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) in Monozyten für die Pathogenese der Atherosklerose

Diese Arbeit konnte nachweisen, dass die Rac1 Guanosintriphosphatase (GTPase) in monozytären THP-1-Zellen durch SDF-1 α aktivierbar und durch Östrogen hemmbar ist. Es zeigte sich, dass die Adhäsion zirkulierender Monozyten durch die Rac1 GTPase induziert und durch die Modulation des Aktin-Zytoskeletts vermittelt wird. Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) zeigte sich abhängig von Rac1. Die für die Monozyten-Adhäsion wesentlichen morphologischen und funktionellen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts sind durch SDF-1 α getriggert und Rac1-abhängig, jedoch unabhängig von der Freisetzung von ROS.

Die kardiovaskulär-protective Wirkung von Östrogenen ist als so genannter „Östrogen-Schutz“ bekannt. Ausreichend hohe Östrogen-Spiegel vermögen das Auftreten kardiovaskulärer Krankheiten bei prä-menopausalen Frauen heraus zu zögern. Zu einem vermehrten Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen kommt es bei Frauen erst nach post-menopausal-bedingtem Absinken des endogenen Östrogen-Spiegels. Das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen kann post-menopausal durch exogene Östrogen-Zufuhr im Rahmen einer Östrogen-Substitutions-Therapie gesenkt werden und beweist die Kausalität zwischen Mangel an Östrogen und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen [50, 68, 69]. Der den kardiovaskulär-protectiven Effekten zugrunde liegende Mechanismus der Östrogene konnte bisher nicht hinreichend aufgedeckt werden.

Die Rekrutierung zirkulierender Monozyten aus dem Gefäßlumen in die Media degenerativ veränderter Gefäßwände hinein kann über vielfältige Signalkaskaden erfolgen und ist einer der ersten, wesentlichen Schritte im Verlauf des atherosklerotischen Entzündungsprozesses [36, 37, 70, 71]. Östrogene hemmen diesen ersten Schritt des Entzündungsprozesses durch eine direkte Wirkung auf die Adhäsion im Blut zirkulierender Monozyten [72]. Dies ergänzt die Ergebnisse anderer Studien, in denen gezeigt wurde, dass Östrogene die Zell-Adhäsion indirekt durch Hemmung der Expression von Adhäsions-Molekülen an der Endothel-Oberfläche beeinflussen [54, 55]. In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass Östrogene die Aktivität der Rac1 GTPase in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) hemmen [53].

In der vorgelegten Arbeit wird gezeigt, dass Östrogene die Aktivität der Rac1 GTPase auch in Monozyten herabregulieren.

Dem zugrunde liegend konnte in der laminaren Flusskammer unter physiologischen Strömungsverhältnissen nachgewiesen werden, dass die Monozyten-Adhäsion von Rac1 abhängig ist [72]. Die vorgelegten Daten zeigen die Rac1 GTPase in einer Schlüsselrolle bei der Monozyten-Adhäsion, die als erster, wesentlicher Schritt der Monozyten-Rekrutierung im Ablauf des Entzündungsprozesses der Atherogenese stattfindet. Die Adhäsion und Migration im Blut zirkulierender Zellen wird durch unterschiedlichste Signalwege moduliert [27, 36 – 38] und ist in ihrer Ausprägung von der Freisetzung spezialisierter Chemokine abhängig. Aufgrund ihrer Spezialisierung besitzen Chemokine die Fähigkeit bestimmte Zellfunktionen, wie Chemotaxis, Zell-Adhäsion und Zell-Migration selektiv zu modulieren. Chemokine modulieren Leukozyten-Funktionen über unterschiedliche intrazelluläre Signalwege, wie beispielsweise über den Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-K) Signalweg und die verschiedenen Signalwege der Subtypen der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAP-K) [27, 36 – 39]. Die vorgelegte Arbeit stellt die Rac1 GTPase als einen weiteren, intrazellulären Mediator der Chemokin-getriggerten Monozyten-Adhäsion dar.

Die Rolle der Rac1 GTPase bei der Monozyten-Migration wird unterschiedlich beurteilt. In einigen Studien wurde gezeigt, dass die Rac1 GTPase ein wichtiger Regulator für die Monozyten-Adhäsion und Monozyten-Migration ist [41]. In anderen Studien konnte hingegen nachgewiesen werden, dass auch Rac1-defiziente Zellen zur Migration fähig sind und die Monozyten-Migration somit unabhängig von Rac1 stattfinden kann [47]. Entsprechend den hier vorgelegten Ergebnissen ist die Rac1 GTPase für die Adhäsion von Monozyten essentiell [72]. Die Rac1 GTPase hat einen direkten modulatorischen Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett von Monozyten. In Anwesenheit von Rac1 GTPase bilden zirkulierende Monozyten Pseudopodien-artige Ausstülpungen an ihrer Zelloberfläche aus (Lamellipodien), die eine quantitativ vermehrte Zell-Adhäsion vermitteln [72]. Die Adhäsion von Monozyten wird, entgegen den Ergebnissen anderer Studien, nicht getriggert durch die Rac1-abhängige Freisetzung von ROS, sondern ist direkt abhängig von der Aktivität von Rac1 GTPase, welche durch SDF-1 α induzierbar ist und auf einem schnellen Signalweg aus der Zelle hinaus innerhalb von wenigen Sekunden vermittelt wird [40 – 42, 48, 72]. Die Rac1 GTPase wird auch in anderen Blutzellen durch Chemokine wie SDF-1 α aktiviert. Die Aktivierung der Rac1 GTPase zeigte sich dort als langsamer Prozess über Minuten bis Stunden [40 – 42]. In den durchgeführten Versu-

chen zeigte sich hingegen eine rasche Aktivierung der Rac1 GTPase schon wenige Sekunden nach Zugabe von SDF-1 α .

Im zeitlichen Ablauf zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen der kurzfristigen Aktivierung der Rac1 GTPase und der schnellen SDF-1 α -getriggerten Monozyten-Adhäsion.

Die Adhäsion von Monozyten ist auf direktem Weg durch Östrogen hemmbar [72]. Die vorgelegten Ergebnisse ergänzen solche aus vorangegangenen Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass Östrogene die Expression von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche des Gefäßendothels über einen direkten Wirkmechanismus hemmen [54, 55, 73, 74]. In Monozyten bewirkt Östrogen eine Herabregulierung der Aktivität von Rac1 GTPase und konsekutiv eine quantitativ verminderte Monozyten-Adhäsion.

Nach den Ergebnissen der durchgeführten Versuche stellt sich Rac1 GTPase als ein weiterer intrazellulärer Mediator der Chemokin-getriggerten Monozyten-Adhäsion dar und kann als möglicher Ansatz in die Suche nach neuen anti-inflammatorischen und anti-atherosklerotischen Therapieoptionen einbezogen werden.

5.2 Die Bedeutung der glattmuskulären Integrin-Linked Kinase (ILK) in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) für die Pathogenese der Atherosklerose

Anhand der Versuchsergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass die Integrin-Linked Kinase (ILK) in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) die Migration und Proliferation der VSMC erhöht, jedoch keinen Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen hat. Nach Inkubation mit Angiotensin II konnten ILK-Proteinexpression und ILK-Aktivität gesteigert werden. Migration und Proliferation der Zellen wurde durch eine direkte Wirkung von Angiotensin II auf die ILK verstärkt. Behandlung der VSMC mit Atorvastatin verminderte die ILK-Wirkung in Abhängigkeit von der ILK-Aktivität. Atorvastatin-behandelte Zellen zeigten deutlich geringere Proliferations- und Migrationsraten. In vivo wurde das Vorkommen von ILK in Aorten gesunder Wild-Typ Mäuse mit dem Vorkommen von ILK in Atherosklerose-kranken ApoE ^{-/-} Mäusen mit und ohne Statin-Behandlung verglichen. Unter Statin-Behandlung zeigte sich ein deutlich vermindertes Vorkommen von ILK, entgegengesetzt hierzu zeigte sich in Aorten von ApoE ^{-/-} Mäusen ein stark erhöhtes Vorkommen von ILK.

In vorangegangenen Studien wurden unterschiedliche Effekte von ILK näher differenziert. Es wurde nachgewiesen, dass ILK in unterschiedlichen Zelltypen eine Vielzahl verschiedener funktioneller Effekte bewirkt [75]. So zeigte sich, dass ILK zwar auf die Apoptoserate von Endothelzellen und T-Zellen Einfluss nimmt, jedoch keine Wirkung auf die Apoptoserate monozytärer Zellen hat [27, 29, 30]. ILK-defiziente Fibroblasten und Chondrozyten zeigen verminderte Proliferationsraten, während die Proliferationsrate ILK-defizienter T-Zellen unverändert bleibt. Die Migrationsrate ILK-defizienter T-Zellen steigt hingegen an [28, 76 - 78]. Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass ILK in VSMC die Proliferation und Migration von VSMC steigert, jedoch keinen Einfluss auf die Apoptoserate der Zellen hat [46]. Möglicherweise erklären sich diese von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlichen ILK-Effekte durch Aktivierung verschiedener Signalwege und Interaktionen zwischen Adaptor- und Effektor-Molekülen von ILK-Domänen [75]. Der genaue zugrunde liegende Mechanismus dieser unterschiedlichen ILK-Effekte ist bisher nicht bekannt.

Ergebnisse großer klinischer Studien konnten beweisen, dass die medikamentöse Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) sowie die medikamentöse Senkung der Blutfettwerte mittels HMG-CoA-Reduktase-Hemmern (Statinen) Überlebensraten Atherosklerose-kranker Patienten signifikant verbesserten [56, 58, 79].

Angiotensin II ist der Hauptregulator des RAAS und trägt durch Stimulation von Proliferation und Migration der VSMC wesentlich zur Entstehung und Aufrechterhaltung atherosklerotischer Läsionen bei [80 – 82]. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit bestätigen diese Erkenntnisse und weisen der ILK darüber hinaus eine entscheidende Rolle als bedeutender Regulator der Angiotensin II-vermittelten VSMC-Proliferation und VSMC-Migration zu [46]. Die Wirkung von Angiotensin II auf VSMC kommt durch Angiotensin II Typ-1-Rezeptor-abhängige Aktivierung des NADP(H)-Oxidase Systems und der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zustande [31, 82]. Rac1 gehört zur Familie der Guanosintriphosphatasen (GTPasen) und besitzt eine wichtige Funktion bei der Aktivierung des NADP(H)-Oxidase Systems. In ILK-defizienten Zellen zeigte sich die Rac1-Aktivität auch nach Stimulation durch Chemokine signifikant vermindert [30]. In Zusammenhang gebracht deuten diese beiden Teilaspekte darauf hin, dass sowohl die Angiotensin II-vermittelte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen als auch die VSMC-Migration und VSMC-Proliferation von einer ILK-vermittelten Rac1-Regulierung abhängen könnten.

Neben ihren Cholesterin-senkenden Eigenschaften besitzen Statine hemmenden Einfluß auf VSMC-Proliferation und VSMC-Migration [46, 83 – 85]. Die hier vorgelegten Daten weisen nach, dass Statine als potente Gegenspieler der ILK ihre Wirkung über eine Verminderung der ILK-Aktivität auf VSMC-Migration und VSMC-Proliferation ausüben [46]. Zusätzliche Statin-Behandlung von VSMC, die zuvor mit dominant-negativen ILK cDNA Plasmiden transfiziert wurden, zeigte einen synergistischen, hemmenden Einfluß auf Zell-Proliferation und Zell-Migration [46]. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass es neben den bekannten noch andere Statin-getriggerte, auf die Zell-Funktion inhibierend wirkende Signalwege geben könnte. Als mögliche Signalwege kommen Matrix-Metalloproteinasen, Chemokine, sowie der Phosphoinositol 3-Kinase-Signalweg und die extrazellulären Kinase-Signalkaskaden in Frage [86 – 89]. Die Untersuchung dieser möglichen Signalwege sollte in nachfolgenden Studien vorgenommen werden.

In dieser Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass atherosklerotische Gefäßwandveränderungen in vivo mit einer Mehranreicherung von ILK korreliert sind [46]. In atherosklerotischen Läsionen thorakaler Aorten von ApoE -/- Mäusen wurde im Vergleich zu Aorten gesunder Mäuse eine deutlich stärkere Anreicherung von ILK nachgewiesen.

Nach Behandlung mit Statinen zeigte sich eine deutlich verminderte Anreicherung von ILK in atherosklerotischen Läsionen. Diese Ergebnisse weisen die ILK als potentielles Zielmolekül für die durch Statine vermittelte Inhibition der Atherogenese aus.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit, dass die ILK ein Mediator von VSMC-Proliferation und VSMC-Migration ist, der eine zentrale Rolle bei Angiotensin II- und Statin-induzierten Effekten einnimmt und sich als neuer Ansatzpunkt in der Atherosklerose-Prävention und -Therapie anbietet.

6. Literaturverzeichnis

- [1] World Health Organization. The World Health Report 1997. Geneva: World Health Organization 1997.
- [2] American Heart Association. 2001 heart and stroke statistical update. Dallas: American Heart Association: 2000; Centers for Disease Control and Prevention. Achievements in public health. 1900-1999: Decline in deaths from heart disease and stroke-United States, 1900-1999. Hyattsville: U.S.Dept.of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 1999. p. 649-56.
- [3] Bang OY, Kim JW, Lee JH, Lee MA, Lee PH, Joo IS, Huh K. Association of the metabolic syndrome with intracranial atherosclerotic stroke. *Neurology* 2005; 65: 296-8.
- [4] Lithell H. Pathogenesis and prevalence of atherosclerosis in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 1994; 7: 2S-6S.
- [5] Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD, Culebras A, DeGraba TJ, Gorelick PB, Guyton JR, Hart RG, Howard G, Kelly-Hayes M, Nixon JV, Sacco RL; American Heart Association; American Stroke Association Stroke Council. Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 2006; 113: e873-923.
- [6] Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115 – 26.
- [7] Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation* 1994; 90: 583-612.
- [8] Glass CK, Witzum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001; 104: 503-16.
- [9] Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 2000; 247: 349-58.
- [10] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-74.
- [11] Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115 – 26.
- [12] Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis part I. *Circulation* 2004; 110: 2066-71.
- [13] Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis part II. *Circulation* 2004; 110: 1868-73.

- [14] Tegos TJ, Kalodiki E, Sabetai MM, Nicolaides AN. The genesis of atherosclerosis and risk factors. *Angiology* 2001; 52: 89-98.
- [15] O'Connor S, Taylor C, Campbell LA, Epstein S, Libby P. Potential infectious etiologies of atherosclerosis: a multifactorial perspective. *Emerg Infect Dis* 2001 7:780-8.
- [16] Yusuf S, Hawke S, Output S, Danes T, Avenue A, Lamas F, McQueen M, Buda A, Pays P, Viragos J, Lashing L; INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (The INTERHEART study). *Lancet* 2004; 364: 937-52.
- [17] Mendis S, Abegunde D, Yusuf S, Ebrahim S, Shaper G, Ghannem H, Shengelia B. WHO study on Prevention of REcurrences of Myocardial Infarction and StrokeE (WHO-PREMISE). *Bull World Health Organ* 2005. 83: 820-9.
- [18] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233-41.
- [19] Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005; 111: 3481-88.
- [20] Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92: 657-71.
- [21] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001; 104: 503-16.
- [22] Ross R, Faggiotto A, Bowen-Pope D, Raines E. The role of endothelial injury and platelet and macrophage interactions in atherosclerosis. *Circulation* 1984; 70: III77-82.
- [23] Luster AD. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-45.
- [24] Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610-21.
- [25] Raines EW, Rosenfield ME, Ross R. The role of macrophages. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol.1 Philadelphia: Lippincott-Raven 1996: 539-55.
- [26] Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 1996; 379: 91-96.
- [27] Friedrich EB, Sinha S, Li L, Dehar S, Force T, RosenzweigA, Gerstzen RE. Role of integrin-linked kinase in leukocyte recruitment. *J Biol Chem* 2002; 277: 16371-5.
- [28] Grashoff C, Aszodi A, Sakai T, Hunziker EB, Fässler R. Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep* 2003; 4: 432-438.
- [29] Friedrich EB, Liu E, Sinha S, Cook S, Milstone DS, MacRae CA, Mariotti M, Kuhlen-cordt PJ, Force T, Rosenzweig A, St.Arnaud R, Dedhar S, Gerstzen RE. Integrin-linked

- Kinase regulates endothelial cell survival and vascular development. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 8134-44.
- [30] Liu E, Sinha S, Williams C, Cyrille M, Heller E, Snapper SB, Georgopoulos K, St-Arnaud R, Force T, Dedhar S, Gerszten RE. Targeted deletion of Integrin-linked Kinase reveals a role in T-cell chemotaxis and survival. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1145-55.
- [31] Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 247-58.
- [32] Chandra A, Angle N. Vascular endothelial growth factor stimulates a novel calcium-signaling pathway in vsmc. *Surgery* 2005; 138: 780-7.
- [33] Menshikov M, Plekhanova O, Cai H, Chalupsky K, Parfyonova Y, Bashtrikov P, Tkachuk V, Berk BC. Urokinase plasminogen activator stimulates vsmc proliferation via redox-dependent pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:801-7.
- [34] Gimborne MA Jr. Vascular endothelium. Hemodynamic forces and atherogenesis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1-5.
- [35] Rainger GE, Nash GB. Cellular pathology of Atherosclerosis: Smooth muscle cells prime cocultured endothelial cells for enhanced leukocyte adhesion. *Circ Res* 2001; 88: 615-22.
- [36] Gerstzen RE, Friedrich EB, Matsui T, Hung RR, Li L Force T, Rosenzweig A. Role of phosphoinositide 3-kinase in monocyte recruitment under flow conditions. *J Biol Chem* 2001; 276: 26846-51.
- [37] Friedrich EB, Tager AM, Liu E, Petterson A, Owman C, Munn L, Luster AD, Gerstzen RE. Mechanisms of leukotriene B4-triggered monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1761-7.
- [38] Ashida N, Arai H, Yamasaki M, Kita T. Distinct signaling pathways for MCP-1 dependent Integrin activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 2001; 276: 16555-60.
- [39] Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E. Rapid leucocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev* 2002; 186: 37-46.
- [40] Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004; 116: 167-79.
- [41] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signal from front to back. *Science* 2003; 302: 1704-9.

- [42] Gregg D, Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ. Rac regulates cardiovascular superoxide through diverse molecular interactions: more than a binary GTP switch. *Am J Physiol* 2003; 285: C723-C724.
- [43] Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The Stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2000; 86: 131-8.
- [44] Grabovsky V, Feigelson S, Chen C, Bleijs DA, Peled A, Cinnamon G. Subsecond induction of alpha-4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp Med* 2000; 192: 495-505.
- [45] Chan JR, Hyduk SJ, Cybulsky MI. Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha-4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *J Exp Med* 2001; 193: 1149-58.
- [46] Friedrich EB, Clever YP, Wassmann S, Werner N, Böhm M, Nickenig G. Role of integrin-linked kinase in vascular smooth muscle cells: regulation by statins and angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 349: 883-9.
- [47] Wells CM, Walmsley M, Ooi S, Tybulewicz V, Ridley AJ. Rac1 deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *J Cell Sci* 2004; 117: 1259-68.
- [48] Chuang KP, Huang YF, Hsu YL, Liu HS, Chen HC, Shieh CC. Ligation of lymphocyte function-associated antigen-1 on monocytes decreases very late antigen-4-mediated adhesion through a reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood* 2004; 104: 4046 - 53.
- [49] Cho HJ, Youn SW, Cheon SI, Kim TY, Hur J, Zhang SY, Lee SP, Park KW, Lee MM, Choi YS, Park YB, Kim HS. Regulation of endothelial cell and endothelial progenitor cell survival and vasculogenesis by integrin-linked kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 1154-60.
- [50] Mendelsohn ME, Karas RH. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *New Engl J Med* 1999; 340: 18-26.
- [51] Demissie S, Cupples LA, Shearman AM, Gruenthal KM, Peter I, Schmid CH, Karas RH, Housman DE, Mendelsohn ME, Ordovas JM. Estrogen receptor-alpha variants are associated with lipoprotein size distribution and particle levels in women: The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2006; 185: 210-218.

- [52] Nathan L, Chaudhuri G. Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 477-515.
- [53] Laufs U, Adam O, Strehlow K, Wassmann S, Konkol C, Laufs K, Schmidt W, Böhm M, Nickenig G. Down-regulation of rac-1 GTPase by estrogen. *J Biol Chem*. 2002; 278: 5956-62.
- [54] Mikkola TS, St Clair RW. Estradiol reduces basal and cytokine induced monocyte adhesion to endothelial cells. *Maturitas* 2002; 41: 313-9.
- [55] Mori M, Tsukahara F, Yoshioka T, Irie K, Ohta H. Suppression by 17 β -Estradiol of monocyte adhesion to endothelial cells is mediated by estrogen receptors. *Life Sci* 2004; 75: 599-609.
- [56] Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Baseline serum cholesterol and treatment effect in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1995; 345: 1274-1275.
- [57] The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med* 1998; 339: 1349-1357.
- [58] Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333: 1301-7.
- [59] Wassmann S, Faul A, Hennen B, Scheller B, Böhm M, Nickenig G. Rapid effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition on coronary endothelial function. *Circ Res* 2003; 93: 98-103.
- [60] Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1509-11.
- [61] Laufs U, Wassmann S, Hilgers S, Ribaldo N, Böhm M, Nickenig G. Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of Atorvastatin in healthy, normocholesterolemic men. *Am J Cardiol* 2001; 88: 1306-7.
- [62] Werner N, Nickenig G, Laufs U. Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol* 2002; 97: 105-116.

- [63] Negoro N, Kanayama Y, Haraguchi M, Umetani N, Nishimura M, Konishi Y, Iwai J, Okamura M, Inoue T, Takeda T. Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in VSMC in vivo. An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy. *J Clin Invest* 1995; 95: 1140-1150.
- [64] Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer CA, Gehrke SG, Schmidt J, Kranzhofer A, Katus HA, Kranzhofer R. Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner. *J Vasc Res* 2005; 42: 415-23.
- [65] Figueroa JE, Vijayagopal P. Angiotensin II stimulates synthesis of vascular smooth muscle cell proteoglycans with enhanced low density lipoprotein binding properties. *Atherosclerosis* 2002; 162: 261-8.
- [66] Wolf SC, Sauter G, Risler T, Brehm BR. Effects of combined endothelin and angiotensin II antagonism on growth factor-induced proliferation of vascular smooth muscle cells isolated from uremic rats. *Ren Fail* 2005; 27: 465-74.
- [67] Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998; 83: 952-9.
- [68] Grodstein F, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Spreizer FE, Stampfer MJ, A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann Intern Med* 2000; 133: 933-41.
- [69] Mendelsohn ME. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol* 2002; 89: 12E-18E.
- [70] Sotiriou SN, Orlova VV, Al-Fakhri N, Ihanus E, Economopoulou M, Isermann B, Bdeir K, Nawroth PP, Preissner KT, Gahmberg CG, Koschinsky ML, Chavakis T. Lipoprotein a in atherosclerotic plaques recruits inflammatory cells through interaction with Mac-1 integrin. *FASEB J* 2006; 20: 559-61.
- [71] Harokopakis E, Albzreh MH, Martin MH, Hajishengallis G. TLR2 transmodulates monocyte adhesion and transmigration via Rac1- and PI3K-mediated inside-out signaling in response to porphyromonas gingivalis fimbriae. *J Immunol* 2006; 176: 7645-56.
- [72] Friedrich EB, Clever YP, Wassmann S, Hess C, Nickenig G. 17Beta-estradiol inhibits monocyte adhesion via down-regulation of Rac1 GTPase. *J Mol Cell Cardiol* 2006 40: 87-95.
- [73] Mineo C, Shaul PW. Circulating cardiovascular disease risk factors and signaling in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 31-41.

- [74] Sumino H, Ichikawa S, Kasama S, Takahashi T, Kumakura H, Takayama Y, Kanda T, Kurabayashi M. Different effects of oral conjugated estrogen and transdermal estradiol on arterial stiffness and vascular inflammatory markers in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2006; 189: 436-42.
- [75] Legate KR, Montanez E, Kudlacek O, Fassler R. ILK, PINCH and p115: the TIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 20-31.
- [76] Goessler UR, Bieback K, Bugert P, Heller T, Sadick H, Hormann K, Riedel F. In vitro analysis of integrin expression during chondrogenic differentiation of chondrocytes upon differentiation in cell culture. *Int J Mol Med* 2006; 17: 301-7.
- [77] Nho RS, Xia H, Kahm J, Kleidon J, Diebold D, Henke CA. Role of integrin-linked kinase in regulating phosphorylation of Akt and fibroblast survival in type I collagen matrices through a viability signalling pathway. *J Biol Chem* 2005; 280: 26630-9.
- [78] Sakai T, Li S, Docheva D, Grashoff C, Sakai K, Kostka G, Braun A, Pfeifer A, Yurchenco PD, Fassler R. Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev* 2003; 17: 926-40.
- [79] Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342: 145-53.
- [80] Mahadevan VS, Campbell M, McKeown PP, Bayraktutan U. Internal mammary artery smooth muscle cells resist migration and possesses high antioxidant capacity. *Cardiovasc Res* 2006; 72: 60-8.
- [81] Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Müller K, Konkol C, Sauer H, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol* 2001; 50: 646-54.
- [82] Nickenig G, Harrison DG. The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 2002; 105: 393-6.
- [83] Wu L, Zhao L, Zheng Q, Shang F, Wang X, Wang L, Lang B. Simvastatin attenuates hypertrophic responses induced by cardiotrophin-1 via JAK-STAT pathway in cultured cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 2006; 284: 65-71.
- [84] Sutherland AJ, Nataatmadja MI, Walker PJ, Cuttle L, Garlick RB, West MJ. Vascular remodelling in the internal mammary artery graft and association with in situ endothelin-1 and receptor expression. *Circulation* 2006; 113: 1180-8.

- [85] Corpataux JM, Naik J, Porter KE, London NJ. The effect of six different statins on the proliferation, migration and invasion of human smooth muscle cells. *J Surg Res* 2005; 129:52-56
- [86] Li G, Oparil S, Sanders JM, Zhang L, Dai M, Chen LB, Conway SJ, McNamara CA, Sarembock IJ. Phosphatidylinositol-3-kinase signaling mediates vascular smooth muscle cell expression of periostin in vivo and in vitro. *Atherosclerosis* 2006; 188: 292-300.
- [87] Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 614-24.
- [88] Haque NS, Fallon JT, Pan JJ, Taubman MB, Harpel PC. Chemokine receptor-8 (CCR8) mediates human vascular smooth muscle cell chemotaxis and metalloproteinase-2 secretion. *Blood* 2004; 103: 1296-1304.
- [89] Campbell M, Allen WE, Sawyer C, Vanhaesebroeck B, Trimble ER. Glucose-potentiated chemotaxis in human vascular smooth muscle is dependent on cross-talk between the PI3K and MAPK signaling pathways. *Circ Res* 2004 95: 380-8.

7. Publikationen

- [1] Gensch C, Clever YP, Werner C, Hanhoun M, Böhm M, Laufs U. Regulation of endothelial progenitor cells by prostaglandin E1 via inhibition of apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42: 670-7
- [2] Friedrich EB, Clever YP, Wassmann S, Werner N, Böhm M, Nickenig G. Role of integrin-linked kinase in vascular smooth muscle cells: regulation by statins and angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349: 883-9
- [3] Clever YP, Gensch C, Werner C, Hanhoun M, Böhm M, Laufs U. Presentation Title: Prevention of Apoptosis in Endothelial Progenitor Cells Treated with the PPAR- γ Agonist Pioglitazone. *Circulation* 2006; 114 (Suppl.): II-176, 965
- [4] Clever YP, Gensch C, Werner C, Hanhoun M, Böhm M, Laufs U. The PPAR-y agonist pioglitazone prevents apoptosis of endothelial progenitor cells. *Eur Heart J* 2006; (abstract supplement), abstract P845
- [5] Gensch C, Clever YP, Werner C, Hanhoun M, Böhm M, Laufs U. The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis* 2006 Jul 27; [Epub ahead of print]
- [6] Friedrich EB, Clever YP, Wassmann S, Hess C, Nickenig G. 17Beta-estradiol inhibits monocyte adhesion via down-regulation of Rac1 GTPase. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 40: 87-95
- [7] Gensch C, Clever YP, Werner C, Laufs U. Der PPAR- γ Agonist Pioglitazon steigert Neoangiogenese und endotheliale Progenitorzellen. *Clin Res Cardiol* 2006; 95: Suppl 5, P1304
- [8] Friedrich EB, Clever YP, Nickenig G. Bedeutung der Integrin-Linked Kinase für Statin-vermittelte anti-atherosklerotische Effekte in glatten Gefäßmuskelzellen. *Z Kardiol* 2005; 94: Suppl 1, V769

8. Lebenslauf

Name Yvonne Patricia Clever
Geb. Datum 03. Januar 1976
Geb. Ort Remscheid
Familienstand verheiratet
Nationalität deutsch
Privatadresse Am Staden 31
66121 Saarbrücken
Tel.: 0681 / 93 56 67 2
e-Mail: Y.P.Clever@arcor.de

Schule / Berufsausbildung / Studium

06 / 1995 Abitur, Ernst-Moritz-Arndt Gymnasium , Remscheid
07 / 1995 – 01 / 1998 Ausbildung zur Bankkauffrau, Commerzbank AG, Remscheid-
Wuppertal
10 / 1998 – 09 / 2000 Studium der Rechtswissenschaften, Universität Bielefeld
10 / 2000 – 11 / 2006 Studium der Humanmedizin, Universität des Saarlandes
09 / 2002 Ärztliche Vorprüfung
09 / 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09 / 2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10 / 2005 – 10 / 2006 Praktisches Jahr, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
11 / 2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Labortätigkeit

10 / 2003 – 07 / 2005 Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. G. Nickenig, Innere
Medizin III, Universitätsklinikum des Saarlandes. Dissertations-
thema „Die Bedeutung der monozytären Rac1 GTPase und der
glattmuskulären Integrin-Linked Kinase für die Pathogenese der
Atherosklerose“.
Seit 09 / 2005 Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. med. U.
Laufs, Innere Medizin III, Universitätsklinikum des Saarlandes,
Themenbereich „Regulationsmechanismen und funktionelle Ei-
genschaften von Endothelialen Progenitor-Zellen (EPC) und de-
ren Apoptose“.