

Annika Kathrin Steingräber

**Bedeutung der Transkriptionsfaktoren CREB
und CREM für die vaskuläre Funktion**

2011

Biologie

**Bedeutung der Transkriptionsfaktoren CREB und
CREM für die vaskuläre Funktion**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Annika Kathrin Steingraber
aus Dortmund

2011

Dekan:	Prof. Dr. Christian Klämbt
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Frank Ulrich Müller
Zweite Gutachterin:	Prof. Dr. Eva Liebau
Tag der mündlichen Prüfung:	18.05.2011
Tag der Promotion:	03.06.2011

Für meine Eltern
Elke und Thomas Steingraber

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie von Blutgefäßen	1
1.2	Physiologie von Blutgefäßen	2
1.2.1	Kontraktion (Vasokonstriktion) von glatten Gefäßmuskelzellen	2
1.2.2	Relaxation (Vasodilatation) von glatten Gefäßmuskelzellen	4
1.3	Struktureller Umbau von Blutgefäßen und gefäßproliferative Erkrankungen	5
1.3.1	Molekulare Mechanismen der Neointima-Bildung	7
1.3.2	Pathogenese der Atherosklerose	10
1.4	Transkriptionsfaktoren der CREB/CREM/ATF-1-Familie	12
1.4.1	Physiologische Bedeutung von CREB und CREM	16
1.4.2	Bedeutung von CREB und CREM im Gefäßsystem	17
1.5	Ziel der Dissertation	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Tierlinien	20
2.1.1	Mäuse mit globaler Inaktivierung von CREM	20
2.1.2	Mäuse mit globaler Inaktivierung von CREM und Inaktivierung des Apolipoproteins E (ApoE)	21
2.1.3	Mäuse mit induzierter, glattmuskelzellspezifischer Inaktivierung von CREB	21
2.1.4	Mäuse mit induzierter, glattmuskelzellspezifischer Inaktivierung von CREB und Inaktivierung von ApoE	23
2.1.5	C57Black6 /6J Mäuse	23
2.1.6	Zucht und Haltung der Versuchstiere	23
2.2	Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1	Genotypisierung der Schwanzspitzenbiopsie mittels PCR	24
2.2.2	Nachweis des CREB Null-Allels	24
2.2.3	Puffer und Chemikalien	24
2.2.4	Plasmidpräparation	25

2.3 Zellkultur	25
2.3.1 Isolation und Kultivierung primärer vaskulärer Glattmuskelzellen (VSMCs) aus murinen Aorten	25
2.3.2 Zellzahlbestimmung und Aussaat von VSMCs	26
2.3.3 Fixierung adhärenter VSMCs	27
2.3.4 Nährmedien und Lösungen	27
2.4 Transiente Transfektion von primären VSMCs	28
2.4.1 Vorbereitung und Transfektion von VSMCs	28
2.4.2 Stimulation transfizierter VSMCs	28
2.4.3 Messung der Luciferase-Aktivität	29
2.4.4 Lösungen und Chemikalien	29
2.5 Immunhistologische Färbungen	30
2.5.1 Organpräparation und Herstellung histologischer Präparate	30
2.5.2 Immunhistologischer Proteinnachweis	31
2.5.3 Quantifizierung proliferierender VSMCs durch Nachweis von Ki67	33
2.5.4 Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Assay	34
2.5.5 Lösungen und Chemikalien	35
2.6 Ligation der Arteria carotis	36
2.6.1 Anästhesie, Analgesie und Nachsorge	36
2.6.2 Ligation der Arteria carotis und Sham-Operation	37
2.6.3 Anfertigung von Paraffinschnitten der A. carotis	38
2.6.4 Quantifizierung der Neointimabildung mittels Resorcin-Fuchsin nach Weigert und Kernechtrot-Färbung	39
2.6.5 Lösungen und Chemikalien	40
2.7 Untersuchungen der Genregulation mittels Mikroarray	40
2.7.1 RNA-Isolation aus kultivierten VSMCs	40
2.7.2 RNA-Illumina Mikroarray	41
2.7.3 Quantitative Real-Time PCR zur Validierung der Mikroarrays	41
2.8 Kontraktionsmessungen an Aortenringen (Mulvany)	42
2.8.1 Vorbereitung der Aorten für die Kontraktionsmessungen	43
2.8.2 Stimulation und Messung	43
2.8.3 Lösungen und Chemikalien	45

2.9 Atherogene Diät bei Mäusen mit Inaktivierung von CREM / CREB und Inaktivierung von ApoE	45
2.9.1 Analyse der Serumlipidspiegel (Cholesterin, Triglyzeride, HDL und LDL)	46
2.9.2 Quantifizierung atherosklerotischer Plaques mittels Oil-red-O- Färbung	46
2.9.3 Lösungen und Chemikalien	46
2.10 Statistische Auswertung	47
3 Funktion des Transkriptionsfaktors CREB	48
3.1 Nachweis der glattmuskelzellspezifischen CREB-Inaktivierung	48
3.2 Nachweis der CREB-Inaktivierung in der Primärkultur	50
3.3 Basale Proliferation und Apoptose in Aorten von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen	50
3.3.1 Basale Proliferation	50
3.3.2 Basale Apoptose	52
3.4 Kontraktionsmessungen an Aortenringen von gmCREB-KO und Kontroll- Mäusen	54
3.4.1 Kalium- und Phenylephrin-Kontraktion	54
3.4.2 Vasokonstriktion nach Stimulation mit Phenylephrin	56
3.4.3 Vasodilatation nach Stimulation mit Nitroprussid-Natrium	57
3.4.4 Vasodilatation nach Stimulation mit Carbachol	58
3.4.5 Vasodilatation nach Stimulation mit Isoprenalin	60
3.4.6 Vasodilatation nach Stimulation mit Forskolin	63
3.5 Untersuchungen zum Gefäßumbau („vaskuläres Remodeling“)	64
3.5.1 Ligation der Arteria carotis bei gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen	64
3.5.2 Atherosklerotische Plaquebildung bei gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen mit gleichzeitiger Inaktivierung von ApoE	67
4 Funktion des Transkriptionsfaktors CREM	71
4.1 Untersuchungen zum Gefäßumbau („vaskuläres Remodeling“)	71
4.1.1 Atherosklerotische Plaquebildung bei CREM-KO und WT-Mäusen mit gleichzeitiger Inaktivierung von ApoE	71

4.1.2	Ligation der Arteria carotis bei CREM-KO und WT-Mäusen	75
4.2	Isolation und Kultivierung primärer Glattmuskelzellen aus der Aorta	83
4.3	Apoptose und Proliferation in kultivierten VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen	84
4.3.1	Apoptose in VSMCs	84
4.3.2	Proliferation in VSMCs	86
4.4	Transiente Transfektion kultivierter VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen	88
4.4.1	Stimulation der cAMP-abhängigen Transkription	88
4.4.2	Stimulation der cGMP-abhängigen Transkription	89
4.4.3	Stimulation der NO-abhängigen Transkription	90
4.4.4	Stimulation der Wachstumsfaktor-abhängigen Transkription	91
4.5	Untersuchungen der Genregulation mittels RNA-Mikroarrays und quantitativer Real-Time PCR	92
5	Diskussion	97
5.1	Validierung der glattmuskelzellspezifischen Deletion von CREB in gmCREB-KO Mäusen	98
5.2	Untersuchungen an gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen	99
5.3	Untersuchungen an CREM-KO und WT-Mäusen	107
5.3.1	Bedeutung von CREM für die atherosklerotische Plaquebildung und die Pathophysiologie vaskulärer Erkrankungen	116
6	Zusammenfassung	119
7	Anhang	121
8	Literaturverzeichnis	130
	Danksagung	145
	Lebenslauf	147

Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro (1×10^{-6})
A	Arteria
Abb	Abbildung
ABHD1	α β hydrolase domain containing 1
ad	bis
AGTRAP	angiotensin II, type 1 receptor-associated protein
al	alii
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA (RM)	analysis of variance (repeated measures)
AP	Aktionspotenzial
ApoE	Apolipoprotein E
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin-Rezeptor-1
ATF-1	aktivierender Transkriptionsfaktor 1
ATP	Adenosintriphosphat
AC/AZ	Adenylatzyklase
Bcl-2	B-cell lymphoma
bp	Basenpaar
bZIP	Leuzin-Zipper-Dimerisationsdomäne
CACNA2D1	calcium channel voltage-dependent alpha2/delta subunit 1
CaMK	Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CARE	cAMP autoregulatory element
CBP	CREB binding protein
CDK	Zyclin-abhängige Kinase
cDNA	complementary DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cre	cyclization recombination
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
CREM	cAMP response element binding modulator

CXCL12	chemokine C-X-C motif ligand 12
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
DAG	Diazylglyzerol
DBD	DNA-Bindedomäne
dd	double distilled
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
ECM	extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EJP	exzitatorisches junctionales Potential
ER	endoplasmatisches Retikulum
ER	Östrogenrezeptor
ERDF	endothelial derived relaxin factor
ERK1/2	extracellular-signal regulated kinase 1/2
FKS	fötales Kälberserum
G	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
g	Erdbeschleunigung, $g = 9,80665 \text{ ms}^{-2}$
G _s	stimulierendes G-Protein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	high density lipoprotein
HZ	heterozygot
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
ICER	inducible cAMP response element repressor
IP ₃	Inositoltriphosphat
ISO	Isoprenalin
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer (KCl 4,7 mM)
KI	Konfidenz-Intervall
Ki67	nukleäres Protein, dient als Proliferationsmarker

KID	Kinase-induzierbare Domäne
KKHP	Krebs-Henseleit-Puffer (KCl 122,7 mM)
KO	Knockout
KWK	Konzentrationswirkungskurve
L	Liter
<i>LacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LDL	low density lipoprotein
loxP	locus of crossing over of P1
M	molar (mol/l)
m	Meter
m	milli (1×10^{-3})
MAC	minimale alveoläre Konzentration
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
mCyc	Cyclophilin
MEK-1	MAP Kinase / ERK Kinase-1
min	Minuten
MLCK	myosin-light-chain-kinase
MW	Mittelwert
mRNA	messenger RNA
n	nano (1×10^{-9})
N ₂ O	Distickstoffmonoxid (Lachgas)
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
p300	E1A binding protein p300, transkriptioneller Koaktivator
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PE	Phenylephrin
pH	potential hydrogenii
PIP ₂	Phosphatidyl-Inositolbisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C

PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PNRC2	proline-rich nuclear coactivator 2
PP-1/2	Proteinphosphatase-1 / 2
PRO	Propranolol
PTK	Protein-Tyrosinkinase
Ras	rat sarcoma, kleines G-Protein
Raf	rat fibrosarcoma
RhoA	Ras homolog gene family member A
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SEM	standard error of the mean
sham	schein = Schein-Ligation, Kontrolle zur Ligation
SMMHC	smooth muscle myosin heavy chain
SNAP	S-Nitroso-N-acetylpenicillamin
SNP	Nitroprussid-Natrium
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Taq	Thermus aquaticus
TGF- β 1	transforming growth factor β 1
TNF- α	tumor-necrosis factor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUNEL	Terminal Uridin Deoxynukleotdyl Transferase dUTP nick end labeling
Tween-20	Polyoxyethylen
U	unit (Enzymeinheit)
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
vs.	versus
VSMC	vascular smooth muscle cell
WT	Wildtyp
ZBTB38	zinc finger and BTB domain containig 38

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle der Transkriptionsfaktoren CREB (cAMP-response element binding protein) und CREM (cAMP response element binding modulator) im vaskulären System. Nach einem kurzen Überblick über die Anatomie und Physiologie von Blutgefäßen, werden zwei Beispiele gefäßproliferativer Erkrankungen in Verbindung mit dem Prozess des sog. vaskulären Remodelings näher charakterisiert. Anschließend werden der Stand der Forschung zur physiologischen Bedeutung von CREB und CREM dargestellt und die Zielsetzung dieser Arbeit definiert.

1.1 Anatomie von Blutgefäßen

Die Gefäßwand größerer Arterien besteht aus 3 verschiedenen Schichten (Abb. 1.1), der Intima (*Tunica intima*), der Media (*Tunica media*) und der Adventitia (*Tunica externa*)(Newby and Zaltsman 2000).

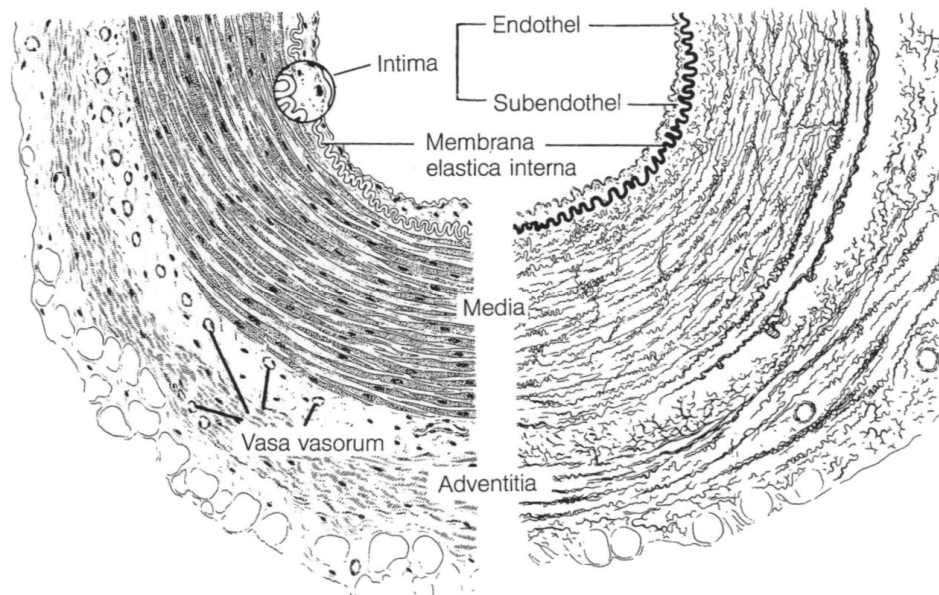


Abb. 1.1 Schematischer Querschnitt einer mittelgroßen humanen Arterie. Die Schichten Intima, Media und Adventitia sind durch elastische Membranen (*Membrana elastica interna* und *Membrana elastica externa* (nicht dargestellt)) voneinander abgegrenzt. Das Endothel und das Subendothel (bei Mäusen nicht vorhanden) bilden die innerste Gefäßschicht. Die Adventitia enthält kleine Blutgefäße, die *vasa vasorum*, die mit ihren Verzweigungen die Media mit Blut versorgen (verändert nach Junqueira und Carneiro 1971, *Histologia Basica*, Springer).

Die Intima besteht aus einem einschichtigen Endothel, dem *Stratum subendotheliale*, das die innere Oberfläche der Gefäße bildet. Es handelt sich dabei um multifunktionelle, epithelähnliche Zellen, die ein lockeres Bindegewebe bilden, das vereinzelt Glattmuskelzellen enthalten kann (Stary 1990, Timpl 1996). Die Endothelschicht ist die Hauptbarriere für Plasmaproteine und sezerniert neben Faktoren der Blutgerinnung, z.B. Thrombozyten-aktivierende Faktoren, auch viele vasoaktive Stoffe, z.B. Endotheline, Stickoxid und Prostazyklin. Die *Membrana elastica interna* gehört ebenfalls zur Intima und bildet die Grenze zur Media (Newby und Zaltsman 2000, Stevens 1997 Human Histology). Die Media ist die mittlere Gefäßwandschicht und besteht überwiegend aus ringförmig angeordneten glatten Muskelzellen, die durch speziell angeordnete elastische Lamellen verstärkt werden. Glattmuskelzellen (vascular smooth muscle cells; VSMCs) enthalten dicke Myosinfilamente die von zahlreichen dünnen Aktinfilamenten umgeben sind. Das Aktin-zu-Myosin-Verhältnis ist etwa achtmal größer als im quergestreiften Muskel, womit die starken Verkürzungseigenschaften der glatten Muskelzellen zu erklären sind. Zwischen den glatten Muskelzellen befinden sich unterschiedliche Mengen an Elastin, Kollagen und Proteoglykanen, welche die extrazelluläre Matrix bilden. Die *Membrana elastica externa* trennt die Media von der Adventitia (Newby und Zaltsman 2000, Stevens 1997 Human Histology, Junqueira und Carneiro 1971 Histologia Basica). Die Adventitia bildet die äußere Gefäßwandschicht und besteht überwiegend aus Kollagen. In dickwandigen Gefäßen enthält die Adventitia kleine Blutgefäße, die *vasa vasorum*, die mit ihren Verzweigungen die Media mit Blut versorgen. Die Intima und der innere Teil der Media sind dagegen gefäßlos und erhalten ihre Nährstoffe durch Diffusion aus dem Blut (Wight et al. 1996, Junqueira und Carneiro 1971, Histologia Basica).

1.2 Physiologie von Blutgefäßen

1.2.1 Kontraktion (Vasokonstriktion) von glatten Gefäßmuskelzellen

Die neuromuskuläre Erregung von glatten Gefäßmuskelzellen kann sowohl über elektromechanische Kopplung als auch über pharmakomechanische Kopplung eine Gefäßkontraktion auslösen. Bei der elektromechanischen Kopplung werden in

kleinen arteriellen Gefäßen perivaskuläre, sympathische Nervenfasern kurz und mit geringer Intensität gereizt. Es handelt sich um so genannte exzitatorische junctionale Potentiale (EJP). Nimmt die Reizstärke zu wird das EJP größer, erreicht die Schwelle der spannungsabhängigen Kalziumkanäle (z.B. L-Typ-Kalziumkanäle) und löst ein Aktionspotential (AP) aus, dem dann eine kurze Kontraktion folgt (Cheung 1984, Casteels et al. 1985, Levick J.R. 1991 An Introduction to Cardiovascular Physiology). Bei der pharmakomechanischen Kopplung wird die Übertragung durch einen chemischen Botenstoff vermittelt, der entweder aus einem lokalen Nerven freigesetzt wird oder im Blut zirkuliert (Michel et al. 1995). Es kommt dabei, anders als bei der elektromechanischen Kopplung, primär nicht zu einer Änderung des Membranpotentials, sondern zur Aktivierung spezifischer Rezeptoren (Abb. 1.2).

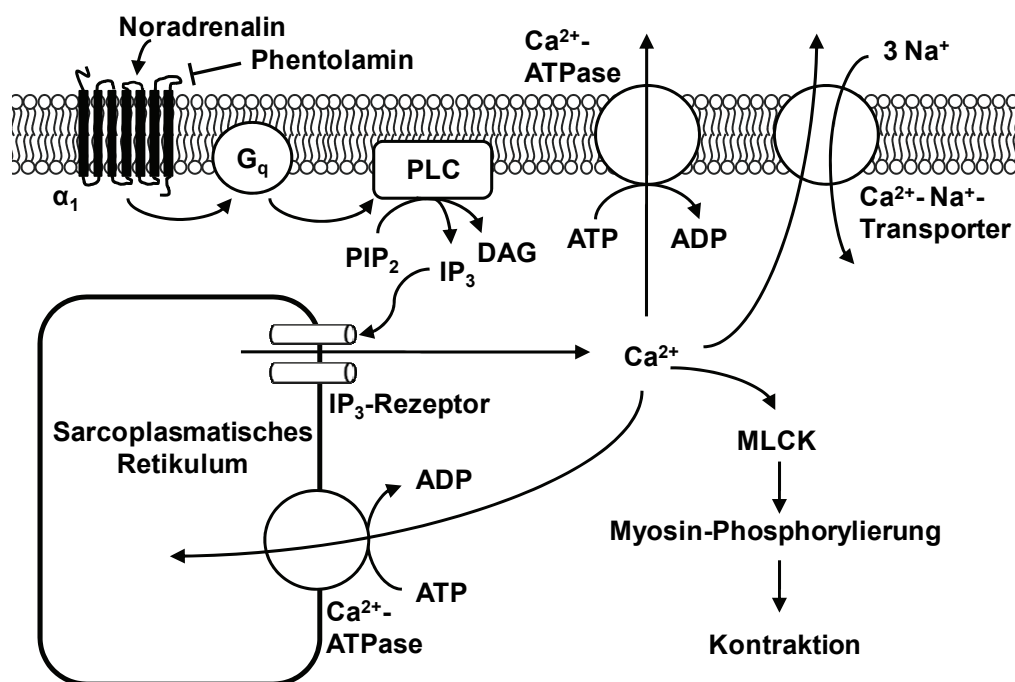


Abb. 1.2 α₁-Adrenozeptor-vermittelte Kontraktion in glatten Muskelzellen. Die Aktivierung des α₁-Adrenozeptors durch den Agonisten Noradrenalin führt über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der G_q-Familie (G_q) zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Diese bewirkt die Hydrolyse von Phosphatidyl-Inositolbisphosphat (PIP₂) zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ bewirkt die Freisetzung von Kalzium aus dem SR (sarcoplasmatisches Retikulum). Dadurch kommt es zu einem Kalziumanstieg in der Zelle von 0,1 auf 10 μM (Aktories / Förstermann / Hofmann / Starke, 2005, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 9. Auflage). Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt die Aktivierung der Myosin-Leichtkettenkinase (MLCK). Diese katalysiert die Phosphorylierung von Myosinköpfchen durch ATP und führt zur Myosin-Aktin-Querbrückenbildung und schließlich zur Kontraktion. Phentolamin hemmt den α₁-Adrenozeptor und bewirkt so die Hemmung der Vasokonstriktion (Adelstein und Klee 1981, Michel et al. 1995). Modifiziert nach Aktories / Förstermann / Hofmann / Starke, 2005, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 9. Auflage.

Beispielsweise kommt es durch die Stimulation von α_1 -Adrenozeptoren in der Zellmembran der VSMCs zu einer Vasokonstriktion. Arzneistoffe, die α -Adrenozeptoren blockieren, z.B. Phenoxybenzamin und Phentolamin, führen dagegen zu einer Hemmung der Vasokonstriktion (Michel et al. 1995). Die Bindung eines Agonisten an den α_1 -Adrenozeptor (z.B. Noradrenalin) führt durch die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (G_q -Proteine) und die Aktivierung der Phospholipase C zur Hydrolyse von Phosphatidyl-Inositolbisphosphat (PIP_2) zu dem „second messenger“ Inositoltrisphosphat (IP_3) und zu Diacylglycerol. IP_3 bewirkt die Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C, welche die Sensitivität der Myofilamente für Kalzium erhöht. Eine Kontraktion der Glattmuskelzelle erfolgt durch einen Anstieg der freien Kalzium-Ionen im Zytoplasma von 0,1 auf etwa 10 μM (Aktories / Förstermann / Hofmann / Starke, 2005, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 9. Auflage). Dabei kommt es über den Kalzium/Calmodulin-Komplex zur Aktivierung der Myosin-Leichtkettenkinase (MLCK). Diese katalysiert die Phosphorylierung von Myosinköpfchen durch ATP und führt zur Myosin-Aktin-Querbrückenbildung und zur Entwicklung von Spannung. Dies führt zur Kontraktion, also zur Verkürzung der Glattmuskelzelle (Adelstein und Klee 1981, Hartshorne 1980, Small und Sobieszek 1980, Huxley 1969).

1.2.2 Relaxation (Vasodilatation) von glatten Gefäßmuskelzellen

Durch Abnahme der intrazellulären Kalziumkonzentration kommt es zu einer Lösung der Querbrückenverbindung zwischen Myosin- und Aktinfilamenten, dies bewirkt die Relaxation der Glattmuskelzellen (Huxley 1969). Ein zugrunde liegender elektromechanischer Kopplungsmechanismus in kleinen arteriellen Gefäßen ist die durch Hyperpolarisation vermittelte Vasodilatation. Durch Herabsetzung der Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Kalziumkanäle, kommt es zu einer Verringerung der intrazellulären Kalziumkonzentration und einer Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle (Casteels et al. 1985, Levick J.R. 1991 An Introduction to Cardiovascular Physiology).

Die durch Stimulation des β_2 -Adrenozeptors ausgelöste Vasodilatation wird durch den „second Messenger“, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), vermittelt. Der

genaue Wirkmechanismus ist im Detail allerdings unklar. Es wird aber angenommen, dass cAMP durch die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) die Kalzium-ATPase-Pumpen im SR aktiviert. Dadurch sinkt der Kalzium-Spiegel im Zytoplasma. Eine andere Möglichkeit stellt die Phosphorylierung und Aktivierung von Kalium-Kanälen in der Zellmembran dar. Dies bewirkt eine Hyperpolarisation der Zellmembran. Eine weitere Theorie geht von einer Phosphorylierung der Myosin-Leichtkettenkinase durch die PKA aus. Die phosphorylierte Myosin-Leichtkettenkinase wird dadurch nur noch schwach von Kalzium/Calmodulin-Komplexen aktiviert und die leichte Kette des Myosins wird weniger phosphoryliert. (Raina et al. 2009, Yang und Lin 2005, Aktories / Förstermann / Hofmann / Starke, 2005, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 9. Auflage).

β -Adrenozeptor-Antagonisten, z.B. Propranolol, blockieren die β -Adrenozeptoren und hemmen dadurch die β_2 -Adrenozeptor-vermittelte Vasodilatation (Wallukat 2002).

Ein weiterer wichtiger pharmakologischer Mechanismus, der zur Vasodilatation führt, wird durch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) vermittelt. Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoffmonoxid freisetzende Stoffe, wie z.B. Nitroprussid-Natrium (SNP), stellen dabei wichtige Substanzen dar. NO wird natürlicherweise vom Endothel freigesetzt und diffundiert in das Zytoplasma, wo es die Guanylatzyklase aktiviert. Dadurch kommt es zu einem Anstieg von cGMP in der glatten Muskelzelle. cGMP aktiviert die Proteinkinase G (PKG) und induziert die Relaxation der VSMCs über eine Verringerung der intrazellulären Kalzium-Konzentration (Desch et al. 2010), die Hemmung der RhoA-abhängigen Kalzium-Sensitivierung der Kontraktion (Lohmann et al. 1997, Sauzeau et al. 2000) und über die PKG-abhängige Phosphorylierung des IP₃-Rezeptor assoziierten G-Kinase Substrats (IRAG) (Geiselhöringer et al. 2004, Desch et al. 2010).

1.3 Struktureller Umbau von Blutgefäßen und gefäßproliferative Erkrankungen

Die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen spielt eine zentrale Rolle bei einer Reihe von kardiovaskulären Erkrankungen, z.B. Atherosklerose, arterieller Hypertension und Restenosen nach Angiographien. Der Umbau von Blutgefäßen („vaskuläres Remodeling“) ist ein aktiver Prozess von verschiedenen strukturellen

Veränderungen. Er kann durch die Anpassung an langandauernde hämodynamische Veränderungen, Störungen des Gefäßdurchflusses und durch die Pathophysiologie bestimmter Gefäßerkrankungen und -verletzungen hervorgerufen werden (Gibbons und Dzau 1994). Nach Gefäßverletzungen kommt es z.B. zur Bildung einer sog. Neointima, die mit der Migration und Proliferation von VSMCs, der Produktion der extrazellulären Matrix und der Infiltration von Entzündungszellen einhergeht (Clowes et al. 1983, Assoian und Marcantonio 1996, Newby und Zaltsman 2000). Der vaskuläre Umbauprozess beeinflusst aber ebenfalls die Pathologie von atherosklerotischen Läsionen. Die „Response to injury“-Hypothese der Atherosklerose geht auf eine verletzungsinduzierte Dysfunktion des Endothels zurück, die besonders an Bifurkationen in Arterien zu einer erhöhten Ablagerung von Lipoproteinen führt und zur Anhaftung spezifischer adhäsiver Glykoproteine an die Oberfläche der Endothelzellen beiträgt (Mora et al. 1987, Ross 1993).

Die extrazelluläre Matrix (ECM) bildet eine wichtige Komponente in der Neointimabildung und ist zusätzlich an der Proliferation und Migration von VSMCs beteiligt. Das ECM-Molekül Fibronectin vermittelt z.B. die Migration von VSMCs (Koyama et al. 1991). Osteopontin, ein weiteres ECM-Molekül, ist in die Proliferation während der Neointimabildung involviert und in atherosklerotischen Läsionen heraufreguliert (Giachelli et al. 1993). Andere ECM-Moleküle wie Laminin, Kollagen und Heparin haben dagegen einen inhibitorischen Effekt auf die Migration in VSMCs *in vivo* (Ross 1993). Die Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) aus VSMCs, die zu einer Degradation der ECM führen, stellen sogar die Voraussetzung für die Proliferation der VSMCs dar (Southgate et al. 1992).

Dem Endothel kommt beim Umbau der Gefäßstruktur ebenfalls eine wichtige Bedeutung zu. Endothelzellen beeinflussen den Umbauprozess direkt durch die Ausschüttung oder Aktivierung von Signalen, die Einfluss auf Zellwachstum, Zelltod und die Migration von Zellen haben. Weiterhin beeinflussen diese Substanzen die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Die Oberfläche des Endothels ist fortlaufend humoralen Faktoren, inflammatorischen Mediatoren und physikalischen Kräften ausgesetzt. Die Endothelzellen fungieren somit sowohl als sensorische Schnittstellen, die hämodynamische und humorale Signale übertragen, als auch als Effektorzellen, die biologische Antworten aussenden und somit mutmaßlich die Struktur der Gefäße bestimmen (Gibbons und Dzau 1994).

1.3.1 Molekulare Mechanismen der Neointima-Bildung

Die Bildung einer Neointima durch intimale Hyperplasie geht mit einer Erhöhung der Zellzahl, begleitet von einer Erhöhung des Anteils der extrazellulären Matrix, einher. Die Prozesse, die der intimalen Hyperplasie zugrunde liegen, sind die Migration und Proliferation von VSMCs, hervorgerufen durch Gefäßverletzung, -entzündung oder -dehnung (Newby und Zaltsman 2000).

Physiologisch bedingte intimale Hyperplasien beim Menschen treten z.B. nach der Geburt beim Verschluss des „Ductus Arteriosus“, einer Verbindung zwischen Aorta und *Truncus pulmonalis* im fetalen Blutkreislauf, auf (Slomp et al. 1992). Diffuse Verdickungen der Intima geschehen aber auch natürlicherweise im Verlaufe des Alterns, z.B. in der menschlichen Aorta als Folge der Expansion von VSMC, die von der Media in die Intima migrieren (Orekhov et al. 1984). Nach Verletzungen der Lumenoberfläche des Gefäßes, z.B. bei perkutanen transluminalen Angioplastien, kommt es ebenfalls zu einer verletzungsbedingten Neointimabildung (Ip et al. 1990).

Vollständig ausdifferenzierte VSMCs in der Media adulter Arterien verfügen nur über sehr geringe Proliferations- und Apoptoseraten (Schwartz et al. 1986). Bei Verletzungen erhöht sich ihre Teilungs- und Migrationsrate jedoch und es kommt, durch sog. „phänotypische Modulationen“, zu einer Aktivierung verschiedener Gene, die die Voraussetzungen für die Migration und Proliferation der VSMCs schaffen (Thyberg 1998, Clowes et al. 1983).

Die Proliferation von Zellen umfasst alle aktiven Phasen des Zellzyklus (G_1 , S; G_2 ; M). Im Ruhezustand befinden sich Zellen von Säugetieren normalerweise in der G_0 -Phase des Zellzyklus. In diesem Stadium sind mRNA- und Protein-Synthese minimal. Zellen können in dieser Phase für viele Jahre verbleiben, treten aber bei Stimulation, z.B. durch die Bindung eines Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor, wieder in die G_1 -Phase ein. Während der G_1 -Phase produzieren die Zellen eine Reihe von mRNAs und Proteinen, die für die DNA-Synthese (S-Phase) nötig sind. In der G_2 -Phase des Zellzyklus bereiten sich die Zellen auf die bevorstehende Zellteilung, die Mitose (M-Phase), vor (Hutchison et al. 1988).

Der Zellzyklus von Säugetieren wird über die Aktivierung und Inaktivierung einer ganzen Reihe von Zellzyklus-regulierenden Molekülen, z.B. einer Gruppe von regulatorischen Proteinen, den Zyklinen und den Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK)

reguliert. Zyklone bilden in bestimmten Zellzyklus-Phasen Komplexe mit den verschiedenen CDKs und führen die Zelle so von einer Phase des Zellzyklus in die nächste (Brooks et al. 2005). So bewirken diese Komplexe über eine Phosphorylierungskaskade die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F. Dieser bewirkt über die Induktion der DNA-Polymerase den Eintritt der Zellen in die S-Phase (Bell und Ryan 2004). Einige Zyklone können auch direkt induziert werden. Ein Beispiel stellt das Zyklin D1 dar, welches direkt über den MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Signalweg aktiviert werden kann (Lavoie et al. 1996).

Die Proliferation und Migration nach Gefäßverletzungen ist die Folge der Ausschüttung von autokrinen und parakrinen Wachstumsfaktoren, z.B. PDGF (platelet-derived growth factor) und TGF- β 1 (transforming growth factor β 1), die einen Eintritt der Zellen in die G₁-Phase des Zellzyklus bewirken (Owens 1988, Ferns et al. 1991, Hutchison et al. 1988). Der Wachstumsfaktor PDGF wird neben Blutplättchen auch von VSMCs, Endothelzellen, Fibroblasten und Makrophagen produziert (Ross 1986). Dabei setzen VSMC fast ausschließlich das Homodimer AA, Makrophagen hingegen hauptsächlich das BB-Homodimer frei (Hart et al. 1990). Endothelzellen produzieren sowohl A- als auch B-Stränge in unterschiedlicher Ausprägung (Newby und Henderson 1990). Während die klassischen PDGF-Isoformen A und B bereits seit längerem bekannt sind, konnten in den Jahren 2000 und 2001 die Isoformen PDGF-C und PDGF-D identifiziert werden (Li et al. 2000, Bergsten et al. 2001). Alle Isoformen und Dimere von PDGF stellen potente Mitogene dar und weisen zusätzlich vasokonstriktorische und chemotaktive Eigenschaften auf (Hart et al. 1990, Bergsten et al. 2001). Die biologische Aktivität der PDGF-Dimere ist dabei abhängig von der Beschaffenheit des PDGF-Rezeptors (α - oder β -Isoform) auf der Zielzelle. Die α -Isoform bindet PDGF A- und PDGF B-Stränge, wohingegen die β -Isoform nur die Bindung von PDGF B-Strängen zulässt. Eine Vielzahl von zellulären Komponenten, die von dem PDGF- β -Rezeptor phosphoryliert werden, sind bereits identifiziert worden (Claesson-Welsh 1996). Dennoch ist weiterhin unklar, welche intrazellulären Komponenten oder Signalwege den proliferationsfördernden Effekt von PDGF vermitteln. Yamaguchi et al. (2001) konnten zeigen, dass eine Stimulation mit PDGF die Expression von ERK1/2 in VSMCs erhöhte. Funakoshi et al. (2002) postulierten die Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs durch PDGF-BB über eine Ras/Raf-Aktivierung sowie die direkte MEK-1 und ERK1/2-Phosphorylierung.

Ebenso soll eine Aktivierung von CREB (cAMP response element-binding protein) durch ERK1/2 an der PDGF-vermittelten Proliferation von VSMCs beteiligt sein (Jiang et al. 2008, Abb. 1.3).

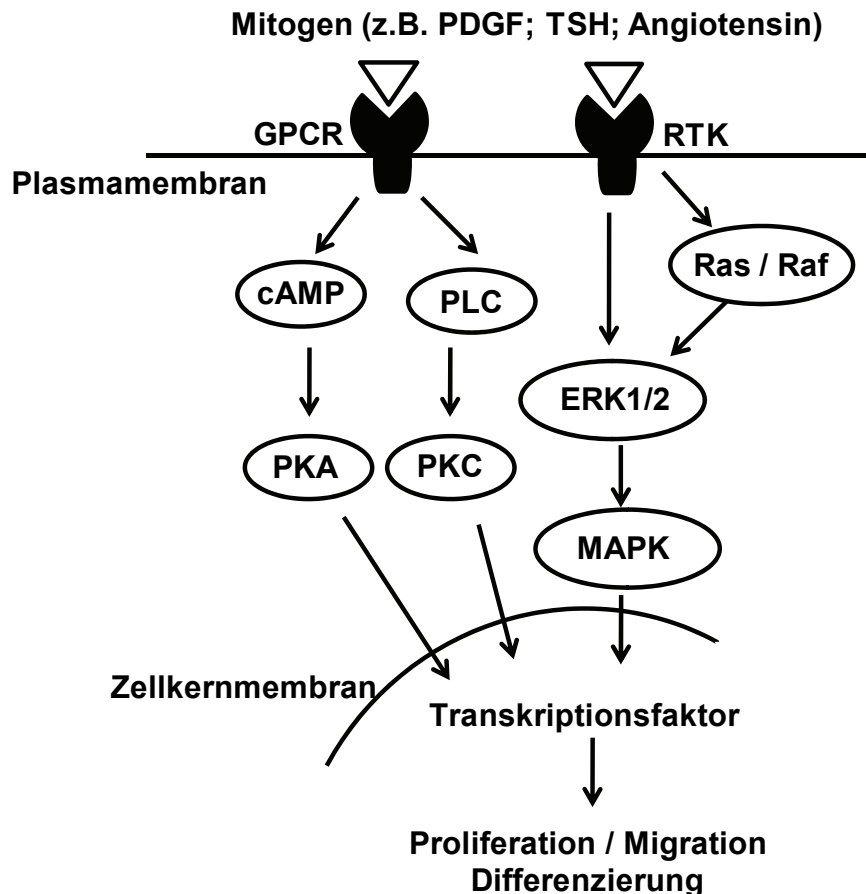


Abb. 1.3 Mitogene Signalwege. Die Stimulation mit einem Mitogen führt nach der Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) letztendlich zur veränderten Transkription verschiedener Gene, die zu Veränderungen in Proliferation, Migration und Zelldifferenzierung führen. Ein Effekt auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen wird u.a. durch den cAMP-vermittelten Signalweg in Hinblick auf Stimulation mit cAMP-freisetzenden Hormonen, z.B. Thyreotropin (TSH), angenommen. Angiotensin vermittelt u.a. über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) sein mitogenes Signal. Das PDGF-vermittelte mitogene Signal wird, entweder direkt unter Beteiligung verschiedener Kinasen des MAPK-Signalwegs (MAPK, mitogen-activated protein kinase), z.B. ERK1/2, oder (zusätzlich) über die Aktivierung von Ras / Raf vermittelt.

Zellantworten auf mitogene Stimulationen können ebenfalls über heterotrimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) vermittelt werden (LaMorte et al. 1993). Heterotrimere G-Proteine der G_q -Familie aktivieren nach Bindung eines Agonisten, z.B. Angiotensin, an den GPCR die Phospholipase C und die PKC (Jackson et al. 1988). cAMP-freisetzende Hormone wie Thyreotropin (TSH) bewirken durch Bindung

an GPCRs und Aktivierung von G_s -Proteinen, die Aktivierung der Adenylatzyklase und führen so zur Transkription verschiedener Gene die zur Proliferation und Differenzierung der Zielzellen führen (Dumont et al. 1989). Der zur Mitogenese führende Signalweg kann somit sowohl mit dem Proteinkinase C als auch mit dem cAMP-vermittelten Signalweg in Verbindung gebracht werden. Auch ein Zusammenspiel der PKA- und PKC- Signalwege für die Stimulation der Zellproliferation wird angenommen (Rozengurt 1986).

Neben den proliferationsvermittelnden Eigenschaft stellt PDGF-BB den potentesten chemoattraktiven Stoff für VSMCs dar (Ross 1990). In einem Modell einer Ballon-Angioplastie an Ratten, bewirkte die Stimulation mit PDGF, durch die gesteigerte Migration von VSMCs aus der Media, die Bildung einer Neointima. Die Neointimabildung konnte dabei, z.B. durch PDGF-spezifische Antikörper, inhibiert werden (Ferns et al. 1991). Über welchen intrazellulären Signalweg die PDGF-induzierte Migration vermittelt wird, ist nach wie vor unklar. Hawkins et al. (1995) vermuten, dass das kleine GTP-bindenden Protein Rac und der $p125^{FAK}$ -Signalweg (FAK, focal adhesion kinase) eine Rolle in der PDGF-vermittelten Migration spielt. $p125^{FAK}$ ist eine hoch konservierte, nicht membranständige, Protein-Tyrosinkinase (PTK), die in der fokalen Adhäsion eine Rolle spielt. Sie ist dabei in die Übertragung chemotaktischer Signale auf Aktinfilamente und andere Komponenten involviert, die an der Zellmigration beteiligt sind (Schaller und Parsons 1994).

1.3.2 Pathogenese der Atherosklerose

Atherosklerose als Ursache von Herzinfarkten und Schlaganfällen ist verantwortlich für über 50 % der Todesfälle in den westlichen Industrienationen (<http://www.cdc.gov/nchs>). Kennzeichen ist eine chronisch fortschreitende Degeneration der Arterien mit progressiven Veränderungen der Gefäßwand. Als Risikofaktoren, die zu der Entstehung einer Atherosklerose beitragen, gelten Übergewicht, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie, *Diabetes mellitus*, aber auch eine kalorien- und fettreiche Ernährung sowie Rauchen und Stress (Insull 2009).

Viele bekannte Theorien zur Entstehung der Atherosklerose beinhalten die sog. „Response to injury“-Hypothese von Russel Ross (Ross 1993), die von der Initialisierung durch Verletzungen des Endothels ausgeht. Diese Verletzungen

können z.B. mechanischer oder immunologischer Herkunft sein, aber auch durch bakterielle Toxine oder Viren hervorgerufen werden. Dies kann zur Dysfunktion des Endothels führen. Als Folge der Verletzungen kommt es zum Einen Wachstumsfaktor-induziert zu einer Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima, zum Anderen zur Bildung von sog. Schaumzellen durch Ablagerungen von Lipoproteinen in Media und Intima.

Die „Response to injury“-Hypothese als Auslöser der Atherosklerose wird allerdings kontrovers diskutiert. In tierexperimentellen Studien konnten z.B. fokale Akkumulationen von LDL (low density lipoprotein) in den intimalen Raum unverletzter Arterien und die darauf folgenden Veränderungen der Morphologie des Endothels als Auslöser der Atherosklerose identifiziert werden (Witztum et al. 1993). Nach der Akkumulation des LDLs im subintimalen Raum kommt es zu sekundären Veränderungen des Endothels durch Anhaftung von im Plasma zirkulierenden Monozyten an die luminale Oberfläche des Endothels (Witztum et al. 1993, Libby 1992). Nach dieser Anhaftung beginnen die Monozyten in den subintimalen Raum zu infiltrieren. Chemoattraktive Substanzen, wie z.B. Monozyten-stimulierende Faktoren (M-CSF, MCP-1), die von glatten Muskelzellen und Endothelzellen abgegeben werden, aber auch das oxidierte LDL locken Monozyten an (Quinn et al. 1987). Monozyten differenzieren zu Makrophagen, welche mit dem oxidierten LDL akkumulieren und Schaumzellen bilden. In diesem Frühstadium der atherosklerotischen Läsionen können sog. „fatty streaks“, Fettstreifen bestehend aus Schaumzellen, an der Innenseite der Arterienwand identifiziert werden (Gerrity 1981, Insull 2009). Zusätzlich zur Akkumulierung, proliferieren die Makrophagen in Gegenwart von oxidiertem LDL und produzieren endothel-toxische Substanzen, wie z.B. Interleukin-1 und verschiedene Zytokine (Paulson et al. 2000). Diese Substanzen bewirken die Rekrutierung weiterer Immunzellen sowie die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF). Die gesteigerte Proliferation und Migration von Glattmuskelzellen durch PDGF sowie die daraus resultierende Verdickung der Intima, spielen eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Entstehung von atherosklerotischen Läsionen. Im Verlaufe des Prozesses der Migration aus der Media, verändern die VSMCs ihren Phänotyp vom kontraktilen zum proliferativen-Phänotyp, der durch höhere Proliferationsraten und die aktive Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix gekennzeichnet ist (Ross und Glomset

1973, Klemm et al. 2001). Die Konsequenz dieser exzessiven Bildung extrazellulärer Matrix ist die Entstehung der typischen atherosklerotischen Läsion, bestehend aus einer fibrösen Kappe, die einen Kern aus akkumulierten und partiell nekrotisierten Schaumzellen enthält, der von dem Gefäßlumen durch ein fibröses Gewebe getrennt ist. Diese atherosklerotische Läsion kann das Gefäß im schlimmsten Fall komplett verschließen (Ross 1993).

1.4 Transkriptionsfaktoren der CREB/CREM/ATF-1-Familie

Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression verschiedener Gene und kontrollieren dadurch die meisten Funktionen der Zellen, z.B. Metabolismus, Neurotransmission, inter- und intrazellulären Transport, Morphologie und Zellzyklus. Die Regulation von Genen steht dabei in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen und wird durch verschiedene Signaltransduktionswege, z.B. als Antwort auf hormonelle Stimuli oder Wachstumsfaktoren, vermittelt. Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wird u. a. reguliert durch Bindung von Liganden (z.B. Steroidhormone), Phosphorylierung oder die Interaktion mit Koaktivatoren (Reese 2003).

Transkriptionsfaktoren deren Aktivität durch Phosphorylierung reguliert wird, sind z.B. CREB (cAMP response element-binding protein), CREM (cAMP response element modulator) und ATF-1 (activating transcription factor-1) (Mayr und Montminy 2001).

Ein wichtiger Mechanismus, der schließlich zu einer Phosphorylierung von CREB führt, wird über das zyklische Adenosin-Monophosphat (cAMP) vermittelt. cAMP fungiert als „second messenger“ und wird von der Adenylatzyklase reguliert, deren Aktivität wiederum über GPCR-vermittelte extrazelluläre Stimuli moduliert wird. Die Bindung eines spezifischen Liganden an einen Rezeptor führt zu der Aktivierung oder Hemmung des cAMP-abhängigen, Proteinkinase A (PKA)-vermittelten Signalwegs und zu transkriptionellen Regulation verschiedener Gene (Lalli und Sassone-Corsi 1994). Erhöhte Konzentrationen von cAMP beeinflussen direkt die Funktion der PKA. Die katalytische C-Untereinheit der PKA diffundiert nach ihrer Aktivierung in den Zellkern und induziert die zelluläre Genexpression über die Phosphorylierung von CREB am Serin der Position 133. Die Stöchiometrie der CREB-Phosphorylierung korreliert dabei mit der Intensität des Stimulus und dem Ausmaß der Ziel-Gen-Aktivierung (Mayr und Montminy 2001, Hagiwara et al. 1993).

CREB vermittelt die Aktivierung cAMP-abhängiger Gene durch die Bindung als Dimer an ein konserviertes cAMP-response element (CRE; TGACGTCA), bzw. an ein sog. „half site CRE“ (CGTCA/TGACG) (Montminy et al. 1986). Die Phosphorylierung von CREB ist aber nicht Voraussetzung für die Bindung an das CRE-Element, allerdings ist sie notwendig für die nachfolgende Bindung des Koaktivators CBP (CREB binding protein) (Hagiwara et al. 1993). Die Phosphorylierung von CREB ermöglicht die Bindung des Koaktivators CBP und der Histonazetyltransferase p300 (Parker et al. 1996, Matus et al. 2007). CBP vermittelt dabei die transkriptionelle Aktivierung durch Bindung mit RNA-Polymerase II-Komplexen und über eine intrinsische Histonazetyltransferase-Aktivierung. Dadurch wird die Chromatinstruktur partiell aufgelockert und die Bindung des basalen Transkriptionsapparates an die DNA ermöglicht (Bannister und Kouzarides 1996, Ogryzko et al. 1996). Die Dephosphorylierung von CREB erfolgt über die Serin/Threonin-Phosphatase sowie die Proteinphosphatasen PP-1 und PP-2 (Hagiwara et al. 1992, Wadzinski et al. 1993).

Die Transkriptionsfaktoren CREB und ATF-1 sind ubiquitär im Organismus vertreten, die höchsten Expressionsraten von CREM konnten im neuroendokrinen Gewebe nachgewiesen werden (Mayr und Montminy 2001). Alle Transkriptionsfaktoren der CREB/CREM/ATF-1 Familie weisen eine ähnliche Grundstruktur auf und bestehen, je nach Isoform, aus einer zentral gelegenen 60 Aminosäuren großen, Kinase-induzierbaren Domäne (KID), die von glutaminreichen hydrophoben Regionen, Q1 und Q2, flankiert wird, die als konstitutive Aktivatoren fungieren (Quinn 1993). Die KID enthält neben einer PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle auch potentielle Phosphorylierungsstellen der Casein-Kinasen I und II sowie der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Kinase II (Brindle et al. 1993, De Groot et al. 1994). Am carboxy-terminalen Ende der Transkriptionsfaktoren liegt eine basische Region, die mit einer Leuzin-Zipper-Dimerisationsdomäne (bZIP) gekoppelt ist (Mayr und Montminy 2001). In Abbildung 1.4 sind der strukturelle Aufbau und einige Isoformen der humanen Mitglieder der CREB/CREM/ATF-1 Familie dargestellt. Die Gene von *Creb* und *Crem* kodieren für eine Vielzahl alternativer Translationsprodukte, die wiederum zur Synthese verschiedener Isoformen führen.

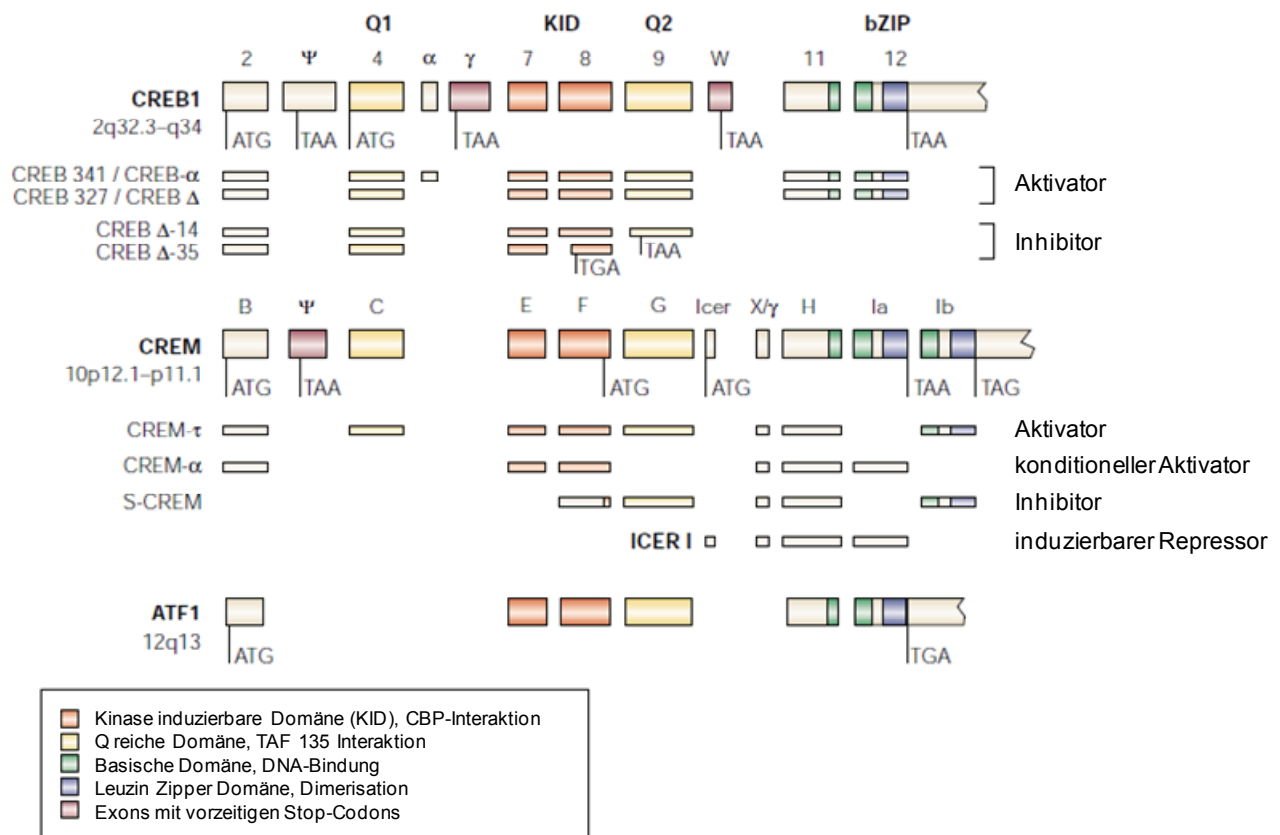


Abb. 1.4 Mitglieder der CREB/CREM/ATF-1 Familie. Die genomische Struktur des humanen cAMP response element-binding proteins (CREB), des cAMP response element modulators (CREM) und des activating transcription factor-1 (ATF-1) zeigt eine große Übereinstimmung zwischen den Mitgliedern. In *Creb*- und *CreM*-Genen führt die Nutzung alternativer Stopp-Kodons (TAA oder TGA) zu carboxy-terminal trunkierten Proteinen und die Nutzung alternativer Start-Kodons (ATG) zu amino-terminal trunkierten Proteinen. Am carboxy-terminalen Ende liegt eine basische Region, die mit einer Leuzin-Zipper-Dimerisationsdomäne (bZIP) gekoppelt ist. Die KID-Domäne wird flankiert von hydrophoben glutaminreichen Regionen, Q1 und Q2, die als konstitutive Aktivatoren *in vitro* fungieren (Quinn 1993). Modifiziert aus Mayr und Montminy 2001.

Diese verschiedenen Isoformen können, je nach Vorhandensein einer Aktivator-domäne (KID), als Aktivator oder Repressor der CRE-vermittelten Transkription fungieren (Abb. 1.4, Delmas et al. 1992, Foulkes et al. 1991, Walker et al. 1996). Die repressorischen Isoformen können als Homo- oder Heterodimere an die DNA binden und so in kompetitiver Weise aktivierende Isoformen verdrängen (Molina et al. 1993). Ein Beispiel einer repressorischen CREM-Isoform stellt ICER (inducible cAMP response element repressor) dar. Die Aktivierung des cAMP-Signalwegs führt, z.B. durch Phosphorylierung der Aktivatoren CREB und ATF-1, zur Expression cAMP-abhängiger Gene. Die Aktivatoren der cAMP-abhängigen Transkription vermitteln ebenfalls über die Bindung an vier CRE-ähnliche

Elemente, sog. CAREs (cAMP autoregulatory elements), im ICER-Promotor die Transkription des amino-terminal trunkierten Polypeptids ICER (Molina et al. 1993, Abb. 1.5).

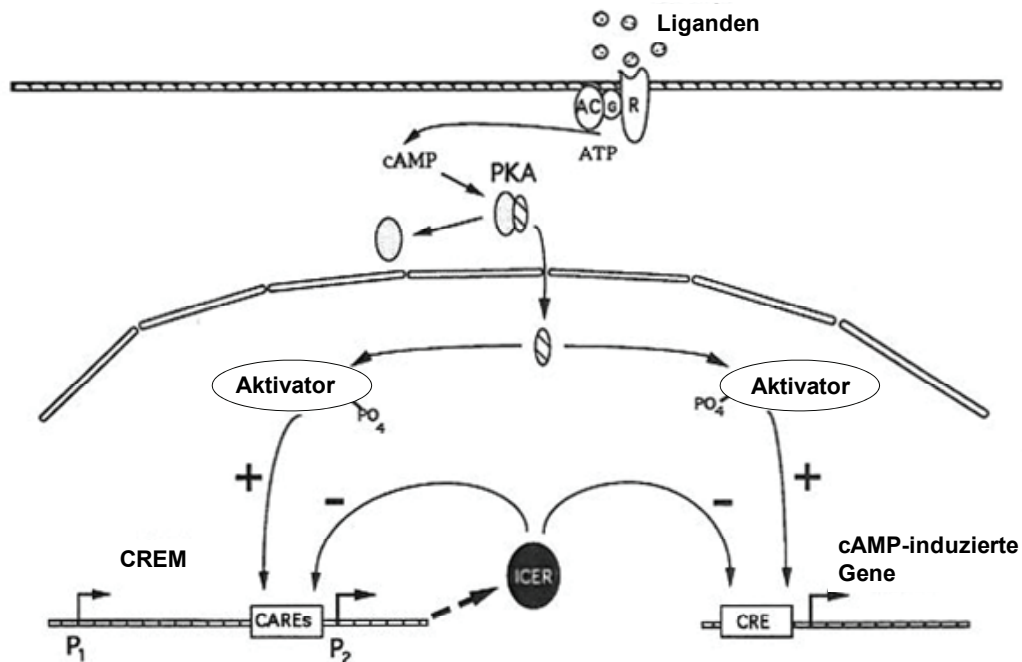


Abb. 1.5 Negative Autoregulation der cAMP-vermittelten Genexpression durch ICER. Ligandenbindung an transmembrane Rezeptoren (R) stimuliert über die Aktivierung der G-Proteine (G) die Adenylatzyklase (AC). Die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zur Phosphorylierung der PKA und zur Translokation der aktiven katalytischen Untereinheit in den Zellkern. Die PKA phosphoryliert transkriptionelle Aktivatoren (z.B. CREB, CREM- τ und ATF-1) und vermittelt so die Bindung an CREs (Gonzalez et al. 1989). Dies führt zur Transkription cAMP-abhängiger Gene. Die Aktivatoren vermitteln über CAREs (cAMP autoregulatory elements) ebenfalls die Transkription vom CREM P2-Promotor, was eine Erhöhung des ICER-Proteinspiegels bewirkt. ICER unterdrückt die cAMP-vermittelte Transkription, inklusive seines eigenen Promotors. Modifiziert aus Molina et al. 1993.

ICER besteht ausschließlich aus der DNA-bindenden Domäne (DBD). Daher bindet er an CRE-Elemente, hemmt aber als Repressor die CRE-vermittelte Gentranskription. Seine Aktivität wird dabei durch Veränderungen des cAMP-Spiegels und nicht über Phosphorylierung reguliert, da ICER über keine PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle verfügt. Die erhöhte ICER-Konzentration im Zellkern bedingt die Repression cAMP-induzierter Gene, führt aber ebenfalls, durch eine negative Autoregulation, zur Blockierung der eigenen Transkription (Molina et al. 1993).

1.4.1 Physiologische Bedeutung von CREB und CREM

CRE-Elemente sind in der Promotorregion verschiedener Genen vorhanden. Die Gene für *Creb* und *Icer* werden dabei selbst durch CREs reguliert (Mayr und Montminy 2001). Die Arbeitsgruppe Montminy hat ihre genomweite Suche nach humanen CREB-Ziel-Genen 2005 veröffentlicht und auf ihrer Internetseite (<http://natural.salk.edu/CREB>) zur Verfügung gestellt (Zhang et al. 2005).

Mit Hilfe von transgenen Tiermodellen und *Knockout*-Mäusen konnten bereits mehrere Arbeitsgruppen die Bedeutung der CREB/CREM-regulierten Transkriptionskontrolle untersuchen. CREB-defiziente Mäuse mit einer Deletion der bZIP-Domäne sterben bei der Geburt an einer Lungenatelektase und weisen schon in der Fetalphase eine eingeschränkte Entwicklung der T-Zellreihen auf (Rudolph et al. 1998). Homozygote CREM-defiziente Mäuse erreichen dagegen das Erwachsenenalter ohne Veränderungen der Mortalität (Müller et al. 2003).

Die Letalitäts-Befunde der globalen CREB-Inaktivierung führten zur Entwicklung transgener Modelle mit einer gewebsspezifischen Überexpression dominant-negativer Formen von CREB. Die Überexpression von dominant-negativem A-CREB führte, z.B. in Chondrozyten, zu Zwergenwuchs. Dieser wurde auf eine Hemmung der Chondrozyten-Proliferation zurückgeführt. Die gehemmte Proliferation wurde mit der Hemmung der transkriptionellen Aktivität von Zyklin A und D1 korreliert (Übersicht bei Mayr und Montminy, 2001). Weiterhin wurde der Befund einer gesteigerten Apoptose nach Überexpression von dominant-negativem CREB beschrieben. Dieser Effekt konnte durch die gleichzeitige Überexpression von Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), einem anti-apoptotisch wirkenden Protein, aufgehoben werden (Riccio et al. 1999, Bonni et al. 1999).

Die globale Inaktivierung des *Crem*-Gens führt zu verschiedenen phänotypischen Veränderungen der Tiere. So konnte eine Aufhebung der zirkadianen Periodizität des Verhaltens beobachtet werden. Mäuse mit einer Inaktivierung von CREM zeigen, im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, eine unveränderte Bewegungsaktivität über den Tag verteilt (Maldonado et al. 1999). Als Begründung für dieses Verhalten wird das Fehlen der repressorischen CREM-Isoform ICER diskutiert. Durch das Fehlen von ICER kommt es zu Verschiebungen der CREB/ICER-Ratio, wodurch die Expression der Arylalkylamin-N-Azetyltransferase, dem limitierenden Enzym der Melatonin-Synthese, verändert wird (Maronde et al. 1999). Verhaltensbiologische Tests zeigten

weiterhin, dass CREM-defiziente Mäuse über ein geringeres Angst-Niveau verfügen. Dieser Befund wird auf eine vermehrte β -Endorphin-Produktion, hervorgerufen durch den Verlust der ICER-vermittelten Repression in der Hypophyse, zurückgeführt (Maldonado et al. 1999). Eine weitere neurophysiologische Bedeutung von CREB und CREM stellt die Ausbildung der synaptischen Plastizität im Zusammenhang mit der Entwicklung des Langzeitgedächtnisses dar (Bartsch et al. 1998). Vor allem die Ausschaltung der α - und δ -Isoformen von CREB führten bei Mäusen zu Schäden des Langzeitgedächtnisses (Bourtchouladze et al. 1998).

Eine weitere Bedeutung von CREM im Organismus liegt im Bereich der Reproduktionsbiologie. Männliche Mäuse mit einer homozygoten Inaktivierung von CREM sind aufgrund einer gesteigerten Apoptose in postmeiotischen Spermatischen steril (Blendy et al. 1996).

1.4.2 Bedeutung von CREB und CREM im Gefäßsystem

Die Kalzium-regulierte Gentranskription ist bedeutend für die Physiologie und die Morphologie von VSMCs. Es konnte gezeigt werden, dass Kalzium die CREB-induzierte Transkription z.B. über die Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMK), den Wachstumsfaktor/MAPK- und den cAMP-abhängigen Proteinkinase A-Signalweg in VSMCs aktivieren kann (Shaywitz und Greenberg 1999). In kultivierten und in intakten zerebralen Arterien konnte eine CREB-Aktivierung, hervorgerufen durch Depolarisation der Membran und dem daraus resultierenden Kalziumeinstrom durch spannungsabhängige Kalziumkanäle, ebenfalls gezeigt werden (Cartin et al. 2000, Stevenson et al. 2001). Die Pathogenese von vaskulären Erkrankungen, wie z.B. Bluthochdruck, führt ebenfalls zu veränderten Kalziumströmen. Diese bewirken Veränderungen in der Genexpression, die in sich entwickelnden VSMCs zu Differenzierung und Proliferation führen (Somlyo und Somlyo 1994).

Mehrere Studien deuten auf eine Bedeutung von CREB im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen hin. Durch erhöhte Spiegel von phosphoryliertem CREB, die in Verbindung mit arteriellen Verletzungen, z.B. durch Angiotensin II-induzierte Hypertension und chronische Nikotin-Administration hervorgerufen werden, kommt es zur Proliferation von VSMCs (Gerzanich et al. 2003). Des Weiteren bewirkte die Überexpression von dominant-negativen CREB-Konstrukten

nach Ballon-Katheter-induzierter Verletzung die Unterdrückung der Neointimabildung und die Steigerung der Apoptose in VSMCs (Tokunou et al. 2003). Kurzzeitige Ischämie-Bedingungen führten *in vitro* und *in vivo* ebenfalls zu einer CREB-Phosphorylierung und einer gesteigerten CRE-vermittelten Bcl-2 Expression (Meller et al. 2005). Diese Studien lassen auf eine Bedeutung von CREB für das Überleben und die Proliferation von VSMCs schließen. Die zugrundeliegenden Signalwege der Proliferation bei Gefäßerkrankungen sind allerdings komplex und werden kontrovers diskutiert (Ichiki 2006).

Über die physiologische Rolle von CREM/ICER ist im Gefäßsystem im Vergleich zu CREB relativ wenig bekannt. Untersuchungen von Ohtsubo et al. (2007) weisen aber auf eine Bedeutung von ICER im Gefäßsystem hin. Die adenovirale Transduktion transgener ICER-Konstrukte in Ballon-Katheter-verletzten Carotisarterien von Ratten, führte zu einer Hemmung der Neointima-Bildung. Dieser Befund wurde mit einer gesteigerten Apoptose und einer gehemmten Proliferation von VSMCs korreliert. Diese Studie liefert damit Hinweise dafür, dass CREM/ICER einen wichtigen Einfluss auf die Pathophysiologie und Morphologie der Gefäße haben könnte.

Dennoch ist die Rolle von CREB und CREM im Gefäßsystem und im Hinblick auf vaskuläre Erkrankungen nicht im Detail verstanden. Weitere Erkenntnisse über mögliche Ziel-Gene von CREB und CREM, die im Zusammenhang mit vaskuloproliferativen Erkrankungen stehen, könnten deshalb zum Verständnis der Entstehung vaskulärer Erkrankungen beitragen.

1.5 Ziel der Dissertation

Wie bereits beschrieben spielen die Transkriptionsfaktoren CREB und CREM in der Regulation cAMP-abhängiger Gene im Organismus eine wichtige Rolle und sind in physiologische Prozesse wie z.B. Metabolismus, Neurotransmission, inter- und intrazellulärer Transport, Morphologie und Zellzyklus involviert.

Ziel der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war es, Kenntnisse der funktionellen Bedeutung von CREB und CREM in Glattmuskelzellen und in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen zu erlangen und mögliche Ziel-Gene im Hinblick auf die verschiedenen Signaltransduktionswege im vaskulären System zu identifizieren.

Anhand genetisch-veränderter Mausmodelle sollten die Hypothesen überprüft werden, dass CREB und CREM in der Regulation der Genexpression im vaskulären System eine Rolle spielen und in die Pathophysiologie vaskulärer Erkrankungen involviert sind. An Mäusen mit Liganden-induzierter, glattmuskelzellspezifischer CREB-Inaktivierung und an Mäusen mit globaler Inaktivierung von CREM wurden daher Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose sowohl in primär kultivierten Glattmuskelzellen als auch an Gefäßschnitten durchgeführt. Untersuchungen zu pathophysiologischen Prozessen erfolgten mit Hilfe eines Modells der Gefäßschädigung (Ligation der Arteria carotis) und eines Atherogenese-Modells. Weiterhin wurde der Gefäßtonus bei Mäusen mit induzierter, glattmuskelzellspezifischer CREB-Inaktivierung mittels myographischer Messungen untersucht.

Bei Mäusen mit globaler Inaktivierung von CREM wurden transiente Transfektionen eines CRE-kontrollierten Luciferase-Reportergenkonstruks zur Charakterisierung der CRE-vermittelten Aktivität nach Stimulation möglicherweise involvierter Signalwege in kultivierten VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen durchgeführt. Die Identifizierung möglicher Ziel-Gene der CRE-vermittelten Transkriptionskontrolle durch CREM, erfolgte durch Expressionsanalysen mit mRNA-Mikroarrays und quantitativen Real-Time PCR-Untersuchungen.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit sollten damit zum Verständnis der cAMP-abhängigen Transkription im vaskulären System beitragen.

2 Material und Methoden

Die verwendeten Standardchemikalien stammen, soweit nicht anders beschrieben, von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) und Carl Roth (Karlsruhe).

2.1 Tierlinien

Alle gesetzlichen Bestimmungen des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen für die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden eingehalten. Die theoretischen und praktischen Kenntnisse über den Umgang mit Versuchstieren, die Narkose- und Operationstechniken sowie die Techniken zur Tötung wurden nachgewiesen.

2.1.1 Mäuse mit globaler Inaktivierung von CREM

Die in dieser Arbeit untersuchten CREM-defizienten Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. G. Schütz vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die Tierlinie wurde 1996 beschrieben (Blendy et al. 1996) und zeichnet sich durch eine globale Inaktivierung aller CREM-Isoformen aus, die aus der Deletion der Leuzin-Zipper-Domänen hervorgeht. Die Exons 1a und 1b (siehe Einleitung Abb. 1.4), die für diese Leuzin-Zipper-Domänen kodieren, sind für die Dimerisierung und DNA-Bindung von CREM notwendig. Der Austausch der Exons 1a/1b mit einem Fusionskonstrukt aus einem β -Galaktosidase-Gen (*LacZ*) und einem Gen für Neomycinresistenz (*neo*) führt zu Inaktivierung der Exons und folglich zu einer funktionellen Inaktivierung von CREM. Für die durchgeführten Versuche wurden Mäuse verpaart bei denen das *Crem*-Gen heterozygot (HZ) vorlag. Homozygote CREM-KO Zuchten waren aufgrund der Sterilität männlicher CREM-KO Mäuse nicht möglich (Blendy et al. 1996). Die Inaktivierung von CREM wurde durch PCR (Polymerase-Kettenreaktion) überprüft. Das benötigte Gewebematerial wurde mittels Schwanzspitzenbiopsie entnommen. Für die Versuche wurden CREM-KO und WT-Mäuse im Alter von 17-19 Wochen eingesetzt.

2.1.2 Mäuse mit globaler Inaktivierung von CREM und Inaktivierung des Apolipoproteins E (ApoE)

Die in dieser Arbeit verwendeten Apolipoprotein E (ApoE)-defizienten Mäuse sind unter der Liniennummer B6.129P2-Apoe^{tm1Unc}/J in „The Jackson Laboratory“ (www.jaxmice.jax.org) erhältlich und wurden in den Laboren von Dr. Nobuyo Maeda aus der Universität von North Carolina generiert (Piedrahita et al. 1992). Die Insertion des Konstrukts pNMC109, bestehend aus einem Thymidin-Kinase-Promotor (Herpes simplex Virus) und einem Neomycin-Resistenzgen, führte zur Deletion von Teilen des ApoE-Gens und folglich zu seiner funktionellen Inaktivierung.

Mäuse mit homozygoter Apoe^{tm1Unc} Mutation weisen, unabhängig von Alter und Geschlecht, stark erhöhte Plasmacholesterinspiegel sowie eine erhöhte atherosklerotische Plaquebildung auf (Zhang et al. 1992). Sie eignen sich deshalb für die Untersuchungen der atherosklerotischen Plaquentwicklung besonders in Kombination mit einer Inaktivierung anderer gefäßrelevanter Gene sowie einer zusätzlichen atherogenen Diät.

Für die Generierung der Tierlinie, die neben einer ApoE-Defizienz auch eine CREM-Inaktivierung aufweist, wurden Mäuse der CREM-Linie mit ApoE-defizienten Mäusen über fünf Generationen verpaart. Aufgrund der bereits erwähnten Sterilität der männlichen CREM-KO Mäuse, konnten ausschließlich heterozygote CREM-Männchen für die Zuchten eingesetzt werden. Die Zucht der Versuchstiere ab der fünften Generation, erfolgte mit Mäusen mit homozygoter ApoE- und heterozygoter CREM-Inaktivierung. Die Inaktivierung von CREM und ApoE wurde durch PCR überprüft. Das benötigte Gewebematerial wurde mittels Schwanzspitzenbiopsie entnommen. Zur Unterstützung der atherosklerotischen Plaquebildung wurden die Mäuse ab der achten Lebenswoche mit einer atherogenen Spezialdiät gefüttert (Western Diät (E15721-34), Ssniff, Soest).

2.1.3 Mäuse mit induzierter, glattmuskelzellspezifischer Inaktivierung von CREB

Die glattmuskelzellspezifische Inaktivierung von CREB erfolgte mit Hilfe des Cre/loxP-Systems und basierte auf der Verwendung Liganden-aktivierbarer Cre-

Rekombinasen. Die in dieser Arbeit untersuchten Mäuse der Linie SM-iCRE-ER^{T2}-Cre-Cre^{fl/fl} wurden generiert durch Kreuzung der Mauslinien CREB^{loxP} und SM-iCre-ER^{T2}. Im Genom der CREB^{loxP}-Mäuse wurde das Exon 10 des *Creb*-Genes durch *loxP*-Elemente flankiert (Mantamadiotis et al. 2002). Diese Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. G. Schütz vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg zur Verfügung gestellt.

Die Mäuse der Linie SM-iCre-ER^{T2} stammten von der Arbeitsgruppe von Prof. Offermanns aus dem pharmakologischen Institut in Heidelberg. Sie exprimieren eine Cre-Rekombinase und einen modifizierten Östrogenrezeptor unter Kontrolle eines SMMHC (smooth muscle myosin heavy chain)-Promotors (Wirth et al. 2008). Die Genotypen-Kontrolle der Nachkommen beider Tierlinien erfolgte mittels PCR. Das benötigte Gewebematerial wurde mittels Schwanzspitzenbiopsie entnommen.

Um die gewünschte CREB-Inaktivierung zu induzieren wurden männliche SM-iCRE-ER^{T2}-Cre-Cre^{fl/fl}-Mäuse im Alter von acht Wochen, an fünf aufeinander folgenden Tagen, mit je 1 mg Tamoxifen (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; gelöst in 50 µl Miglyol 812 Neutralöl, Sasol Germany GmbH, Witten) behandelt. Diese Behandlung ermöglicht die glattmuskelzellspezifische Aktivierung der Cre-Rekombinase und dadurch die kontrollierte Exzision des Exon 10 des *Creb*-Gens. Durch die Exzision des Exon 10 kommt es zu Bildung eines CREB-Null-Allels, welches für ein trunkiertes CREB Protein kodiert, dem die Dimerisations- und DNA-Bindungsdomänen fehlen (Mantamadiotis et al. 2002). Der Nachweis des Null-Allels mittels PCR diente der Kontrolle der CREB-Inaktivierung (siehe 2.2.2).

Männliche Wurfgeschwister Tamoxifen-behandelter SM-iCRE-ER^{T2}-Cre⁺-Cre^{fl/fl}-Mäuse wurden analog mit je 50 µl Neutralöl behandelt und dienten als Kontrollen. Um einen anti-östrogenen Effekt des Tamoxifens im Vergleich zur Kontroll-behandelten Gruppe auszuschließen, wurde nach der letzten Injektion eine Wartezeit von acht Wochen eingehalten, bevor die Versuche mit diesen Mäusen in einem Alter von 17-19 Wochen durchgeführt wurden.

2.1.4 Mäuse mit induzierter, glattmuskelzellspezifischer Inaktivierung von CREB und Inaktivierung von ApoE

Für die Generierung der Tierlinie, die neben einer ApoE-Defizienz auch eine CREB-Inaktivierung aufweist, wurden Mäuse der oben genannten SM-iCRE-ER^{T2}-Cre-Creb^{fl/fl}-Linie mit ApoE-defizienten Mäusen über fünf Generationen verpaart. Die Kontrolle der Genotypen erfolgte mittels PCR. Das benötigte Gewebematerial wurde mittels Schwanzspitzenbiopsie entnommen. Die männlichen Nachkommen wurden, wie bereits beschrieben, ab der achten Lebenswoche mit Tamoxifen behandelt und zusätzlich, zur Unterstützung der atherosklerotischen Plaquebildung, mit einer fettreiche, atherogene Spezialdiät gefüttert (Western Diät (E15721-34), Ssniff, Soest, siehe 2.9).

2.1.5 C57Black6 /6J Mäuse

Die Mäuse dieser Tierlinie wurden von der Harlan-Winkelmann GmbH (http://www.harlan.com/research_models_and_services/research_models_by_product_type/inbred_mice/c57bl6j_inbred_mice.hl) bezogen und dienen in dieser Studie als Kontrollen zu der SM-iCRE-ER^{T2}-Cre-Creb^{fl/fl}-Mauslinie, indem sie analog mit Tamoxifen bzw. mit Injektionen von Neutralöl behandelt wurden (siehe 2.1.3).

2.1.6 Zucht und Haltung der Versuchstiere

Die genetisch veränderten Mäuse wurden bei einem konstanten, 12 stündigen Tag-Nacht-Rhythmus bei kontrollierter Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten und mit handelsüblichem Standardfutter (Altromin®, Lage/Lippe) und Leitungswasser *ad libitum* versorgt. Die Käfige wurden einmal wöchentlich gewechselt.

Vier Wochen nach der Geburt wurden die Jungtiere vom Muttertier separiert und nach Geschlechtern getrennt. Die Nummerierung der Tiere erfolgte fortlaufend für jede Tierlinie. Zur Unterscheidung wurden Ohrmarkierungen angebracht.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Genotypisierung der Schwanzspitzenbiopsie mittels PCR

Gewebematerial zur Genotypisierung genetisch veränderter Mäuse wurde durch Schwanzspitzenbiopsie entnommen und mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona 1987) charakterisiert.

Die entnommenen Proben wurden in NID-Puffer (Nonionic Detergent Puffer) mit 2% Proteinase K aufgenommen und über Nacht bei 55° C unter schütteln inkubiert.

Nach einem zehnmütigen Denaturierungsschritt bei 95° C konnten die Proben in der PCR eingesetzt werden.

Alle verwendeten Oligonukleotide und PCR-Programme sind im Anhang aufgeführt.

2.2.2 Nachweis des CREB Null-Allels

Der Nachweis des CREB Null-Allels in Gewebe-Homogenaten Tamoxifen- und Neutralöl-behandelter SM-iCRE-ER^{T2}-Cre-Creb^{fl/fl}-Mäuse wurde mittels „Step-down“ PCR durchgeführt und diente dem Nachweis der CREB-Inaktivierung in Geweben und Zellen nach erfolgter Tamoxifen-Behandlung. Die verwendeten Oligonukleotide und das Programm der „Step-down“ PCR sind im Anhang aufgeführt.

2.2.3 Puffer und Chemikalien

NID-Puffer	50 mM	KCl
	10 mM	Tris/HCl pH 8,3
	2 mM	MgCl ₂
	0,45%	NP40 (Igepal Ca-630)
	0,45%	Tween 20
	pH 6; autoklaviert	

GoTaq®DNA Polymerase	Promega, Mannheim
PCR-Cycler	PerkinElmer 9700, Waltham, USA
Oligonukleotide	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.2.4 Plasmidpräparation

DNA-Präparationen im Maßstab bis 500 µg wurden mit dem „Plasmid Purification Kit“ der Firma Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden) durchgeführt. Alle Schritte der DNA-Isolierung erfolgten nach Herstellerangaben der Firma Qiagen und beruhten auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Chromatographie unter Verwendung von Anionenaustauschersäulen.

Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA-Lösungen wurde mittels UV-Absorptionsspektroskopie bestimmt. Die Extinktion doppelsträngiger DNA mit einer Konzentration von 50 µg/ml beträgt $OD_{260} = 1$ und dient als Referenz (Sambrook et al. 1989). Der Quotient OD_{260}/OD_{280} liegt bei einer reinen DNA-Lösung zwischen 1,8 und 2,0. Ein geringeres Verhältnis deutet auf eine Verunreinigung durch Proteine hin, ein Wert über 2,0 auf RNA-Rückstände.

2.3 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden zur Vorbeugung gegen Kontaminationen an einer Reinbank (Clean Air®; Clean Air Techniek B.V., Niederlande) durchgeführt. Die Zellen wurden in ihrem entsprechenden Medium, in sterilen Zellkulturflaschen (Gewebekulturflaschen 25 cm², Nr. 831,810,002; Sarstedt, Nümbrecht) oder Zellkulturschalen (Nunclon Multidishes Zwölf- (Nr. 150628) und Sechskammer (Nr. 140685), Nunc, Langenselbold; Labtek Chamberslide (Nr. 177445), Nunc, Langenselbold) in einem Inkubator (Binder CB150, Tuttlingen) bei 37° C unter 5% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Die verwendeten Zellkulturgefäße begünstigen durch eine raue, hydrophile Oberfläche die Haftung der Zellen.

2.3.1 Isolation und Kultivierung primärer vaskulärer Glattmuskelzellen (VSMCs) aus murinen Aorten

Für die Zellisolation von VSMCs aus Mauseorten wurden, nach Tötung der Versuchstiere durch Kohlendioxid-Inhalation, die Aorten von jeweils vier bis fünf Tieren eines Genotyps entnommen und in steriles PBS überführt. VSMCs von Mäusen beider Genotypen wurden dabei immer am selben Tag in abwechselnder Reihenfolge isoliert. Nach Entnahme der Aorten erfolgte zunächst die Entfernung von

umliegendem Fett und Gewebe unter Zuhilfenahme einer Stereolupe (Leica MS5, Wetzlar) und sterilem Präparationsbesteck. Der anschließende Längsschnitt diente der restlosen Entfernung von enthaltenden Blutresten. Die Aorten der Tiere des gleichen Genotyps wurden, ohne Zugabe von Flüssigkeit, in eine Petrischale überführt und mit einem sterilen Skalpell manuell zerkleinert. Dieser Gewebepulver wurde anschließend mit Hilfe einer Glaspipette am Boden von zwei Zellkulturflaschen ausgestrichen, wobei die Gewebestückchen weitestgehend vereinzelt wurden. Die Zellkulturflasche wurde zur Antrocknung der Gewebestücke stehend mit 5 ml Zellkulturmedium (Dulbecco's modified Eagle's Medium; DMEM, 37° C) befüllt und für 10 min im Zellkulturschrank inkubiert, bevor sie hingelegt wurde. VSMCs sprossen aus den Gewebestückchen nach etwa drei Tagen aus. Die erste Passage erfolgte dann nach etwa sieben bis zehn Tagen. Dazu wurde das Medium abgesaugt und der Boden der Zellkulturflasche mit 2 ml sterilem PBS (37° C) gespült. Das PBS wurde entfernt und die VSMCs einer Zellkulturflasche mit 1 ml Trypsin/EDTA für 10 min im Zellkulturschrank inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde durch Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium (37° C) gestoppt. Die noch nicht vollständig abgelösten VSMCs wurden anschließend durch Spülen des Flaschenbodens gelöst. Der Inhalt der Zellkulturflaschen eines Genotyps wurde vereinigt und je nach Zelldichte (s.u.) auf zwei oder mehrere neue Zellkulturflaschen verteilt. Die passagierten VSMCs setzten sich nach etwa vier Stunden vollständig am Boden der neuen Zellkulturflasche ab und verblieben bis zur zweiten Passage eine weitere Woche im Zellkulturschrank. Das Medium wurde zwischen den Passagen zusätzlich jede Woche gewechselt.

2.3.2 Zellzahlbestimmung und Aussaat von VSMCs

Für die durchgeführten Versuche wurde stets die zweite Passage isolierter VSMCs verwendet. Die VSMCs wurden dazu, analog zur 1. Passage, mittels Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, in 5 ml Medium aufgenommen und für 5 min bei 900 rpm pelletiert. (Rotina 35R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen). Das Pellet wurde anschließend in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Die Auszählung der VSMCs erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & CoKG, Lauda-Königshofen).

Die Aussaat der Zellen für immunhistologische Färbungen erfolgte auf Chamberslides in einer Dichte von 8000 Zellen/cm², für die transienten Transfektionen und RNA-Isolationen wurden 4000 Zellen/cm² auf Zwölf- bzw. Sechskammer-Zellkulturschalen ausgesät. Die Ausbeute einer Isolation betrug dabei zwischen 8×10^4 und 1×10^5 Zellen. Um die Bedingungen für die Untersuchungen möglichst gleich zu halten, wurden immer VSMCs beider Genotypen auf demselben Chamberslide bzw. derselben Zwölf- oder Sechskammer-Zellkulturschale ausgesät.

2.3.3 Fixierung adhärenter VSMCs

Für die immunhistologischen Nachweise verschiedener Antigene war es notwendig, die auf Chamberslides ausgesäten VSMCs zu fixieren. Dafür wurden kultivierte und stimulierte VSMCs nach Abnahme des Mediums mit PBS gewaschen und für 25 min bei Raumtemperatur mit einer 4%igen Formaldehydlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die fixierten VSMCs mit 70%igem Ethanol überschichtet und bis zur immunhistologischen Färbung bei -20° C gelagert.

2.3.4 Nährmedien und Lösungen

VSMC-Kulturmedium	400 ml	DMEM (Cambrex (Nr.12-707F), Charles City, USA)
	20 %	Fötale Kälberserum (CytoGen (Nr. 01-015ST), Sinn)
	2 %	200 mM L-Glutamin (PAA (Nr. M11-004), Pasching, Österreich)
	1 %	Penicillin-Streptomycin (Cambrex (Nr.17-602E))
10x PBS	80 g/l	NaCl
	2 g/l	KCl
	14,4 g/l	Na ₂ HPO ₄
	2,4 g/l	KH ₂ PO ₄
		pH=7,4

1x PBS	100 ml	10x PBS
	900 ml	doppelt destilliertes Wasser (ddH ₂ O) autoklaviert
4% Formaldehydlösung		Formaldehydlösung 37% in PBS
1 x Trypsin/EDTA		0,05% Typsin / 0,022% EDTA (PAA (Nr. L11-004))

2.4 Transiente Transfektion von primären VSMCs

2.4.1 Vorbereitung und Transfektion von VSMCs

Um den Einfluss des Transkriptionsfaktors CREM auf die transkriptionelle CRE-vermittelte Aktivität in VSMCs zu untersuchen, wurden primäre VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen mit einem CRE-kontrollierten Luciferase-Reporter-gen-Konstrukt (4xSomCRELuc; Oetjen et al., 1994) transient transfiziert. Dieses Konstrukt wurde uns freundlicherweise von PD Dr. Elke Oetjen vom Institut für Biochemische Pharmakologie der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz erfolgte eine KO-Transfektion mit einem Plasmid, das die *Renilla reniformis* Luciferase (pRL-CMV, Promega, Mannheim) unter Kontrolle des CMV (Cytomegalievirus)-Promotors exprimiert.

Die VSMCs wurden fünf Stunden vor der Transfektion unter Serumentzug gesetzt. Die Durchführung der Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend den Herstellerangaben. Die Zellen wurden mit einem Ansatz, bestehend aus je 0,95 µg 4xSomCRELuc und 0,05 µg pRL-CMV sowie 1,5 µl Lipofectamin 2000, für zweieinhalb Stunden transfiziert. Bis zur Stimulation am nächsten Tag verblieben die VSMCs in serumhaltigem Medium im Brutschrank.

2.4.2 Stimulation transfizierter VSMCs

Die Stimulation transfizierter VSMCs erfolgte über einen Zeitraum von 9 Stunden mit verschiedenen Aktivatoren der zu untersuchenden Signalkaskaden in serumhaltigem

Medium. Für die Aktivierung der Adenylatzyklase wurde Forskolin in Konzentrationen von 3×10^{-8} bis 3×10^{-5} M eingesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle diente Dimethylsulfoxid (DMSO). Alle anderen Stimulanzen konnten in Wasser gelöst werden. 8 pCPT-cGMP, ein membranpermeables cGMP-Analogon und Aktivator der Proteinkinase G (PKG) und der NO-Donor S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) wurden in einer Endkonzentration von 1×10^{-4} M eingesetzt. Die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF erfolgte ebenfalls über 9 Stunden, dabei wurde eine Konzentration von 7,5 ng/ml analog zu den Untersuchungen der Proliferation (siehe 2.5.3) gewählt.

2.4.3 Messung der Luciferase-Aktivität

Nach Stimulation wurden die VSMCs lysiert. Die Messung der Luciferase-Aktivität in den Zellextrakten wurde mit dem Dual Luciferase Detectionkit der Firma Promega (Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung erfolgte mit einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold Technologies GmbH & Co. KG; Bad Wildbad). Die gemessenen Werte der *Renilla reniformis* Luciferase dienten als interne Kontrolle für die Normalisierung der Expression des Luciferase-Reportergen-Konstrukts (4xSomCRELuc). Alle Messdaten einer Transfektion wurden relativ zur jeweiligen WT-Kontrollprobe dargestellt. Für jeden Stimulus wurden fünf bis sechs unabhängige Transfektionen durchgeführt.

2.4.4 Lösungen und Chemikalien

Optimem	GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
8 pCPT-cGMP	Biolog, Bremen
Forskolin	Sigma-Aldrich, Steinheim
S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PDGF-BB (Platelet Derived Growth Factor)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.5 Immunhistologische Färbungen

2.5.1 Organpräparation und Herstellung histologischer Präparate

Nach Tötung des Versuchstiers durch Kohlendioxid-Inhalation erfolgte die Entnahme der Aorta sowie, je nach Versuch, die Entnahme von Carotisarterien, Femoralisarterien, Lunge und Skelettmuskeln. Die entnommenen Organe wurden zunächst in raumtemperiertem PBS gespült. Die anschließende Feinpräparation, bei der das umliegende Fettgewebe vorsichtig entfernt wurde, erfolgte mit Hilfe einer Stereolupe in frischem PBS. Für Untersuchungen zum Nachweis des Null-Allels mittels PCR wurden die Organe in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für histologische Untersuchungen wurden die Gefäße für 12 Stunden in 4 %iger Formaldehydlösung fixiert. Die Einbettung histologischer Präparate erfolgte zuerst manuell, später mit einem Einbettautomaten (Citadel 1000 Shandon, Waltham, USA) in Paraffin nach durchlaufener Alkoholreihe mit folgenden Schritten:

50 % Ethanol	30 min
75 % Ethanol	45 min
95 % Ethanol (3x)	45 min
Absolut Ethanol (3x)	45 min
Xylol (3x)	45 min
Paraffin (3x)	60 min

Der Verbleib in jeder Stufe richtete sich nach der Größe des Präparats und konnte für kleinere Organe wie z.B. Aorta und Arterien auf 30 min (Ethanolsschritte) bzw. 45 min (Paraffin) verkürzt werden.

Für die Anfertigung von Gefäßschnitten wurden Aorten oder Carotisarterien im Einbettgefäß hängend in Paraffin eingegossen und schließlich auf Eis abgekühlt. Die Paraffinblöcke konnten bis zur Anfertigung der Schnitte auf 4°C gelagert werden.

Die Schnitte histologischer Präparate wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica RM2125, Messer Leica Typ 819, Wetzlar) angefertigt. Die in Paraffin eingegossenen Organe wurden dabei in Reihen von je $5\ \mu\text{m}$ dicken Paraffinschnitten mit Hilfe eines Wasserbads (Leica HI1210, Wetzlar) geglättet und auf Objektträger aufgebracht. Die Lagerung der Objektträger erfolgte in Objektträgerboxen bei 4°C .

2.5.2 Immunhistologischer Proteinnachweis

Folgende Antigene wurden sowohl in Gewebeschnitten als auch in fixierten VSMCs immunhistologisch nachgewiesen.

α -Glattmuskelaktin (Anti-Human Actin, Smooth Muscle) diente dem Nachweis glatter Gefäßmuskulzellen (VSMCs), VCAM-1 und ICAM-1 wurden zur Charakterisierung der Zelladhäsion am Endothel nachgewiesen. Ki67, ein nukleares Protein, das in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G_1 , S, G_2 und M-Phase) vorliegt, diente als Proliferationsmarker. Der Transkriptionsfaktor CREB wurde zur Kontrolle der CREB-Inaktivierung nachgewiesen.

Für den immunhistologischen Nachweis verschiedener Proteine in Gewebeschnitten, wurden die Objektträger zuerst in einen Wärmeschrank (W. Memmert, Schwabach) bei 60° C inkubiert, um das umgebende Paraffin zu verflüssigen. Anschließend erfolgte das Entwachsen der Gewebeschnitte in Xylol und absteigender Alkoholreihe nach folgendem Protokoll:

Xylol (2x)	7 min
Absolut Ethanol	3 min
95 % Ethanol	3 min
75 % Ethanol	3 min
50 % Ethanol	3 min
ddH ₂ O	30 sek

Die entwachsenen Gewebeschnitte wurden anschließend durch Kochen in 10 mM Natriumzitratlösung für 10 min permeabilisiert. Nach 30 minütigem Abkühlen wurden diese zweimal mit ddH₂O und einmal mit PBS gewaschen.

Die Permeabilisierung kultivierter und fixierter VSMCs erfolgte nach Abnahme des Mediums und dreimaligem Waschen mit PBS durch die Inkubation mit 0,2% TritonX-100 in PBS für 5 min bei Raumtemperatur (RT). Danach wurden die Chamberslides zweimal für 5 min mit PBS gewaschen.

Nach der Permeabilisierung erfolgte für die Gewebeschnitte und die fixierten VSMCs das gleiche Protokoll.

Gewebeschnitte und fixierte VSMCs wurden zur Blockierung nicht-spezifischer Bindungsstellen mit 0,2 % Ziegenserum in PBST (Blocklösung) für eine Stunde bei RT inkubiert. Bei der CREB-spezifischen Färbung wurde dem Ziegenserum 1% BSA (bovines Serumalbumin) zugesetzt.

Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolge für eine Stunde bei RT in der entsprechenden Blocklösung. Die jeweiligen Erstantikörper wurden wie folgt verdünnt:

anti- α -Glattmuskelaktin	1:50
anti-Ki67	1:200
anti-CREB	1:1000
anti-VCAM-1	1:50
anti-ICAM-1	1:50

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Präparate für eine Stunde bei RT mit dem Zweitantikörper in entsprechender Blocklösung inkubiert. Dabei standen die Zweitantikörper Alexa Fluor 594 (goat-anti-rabbit; rote Fluoreszenz) für die CREB-, VCAM-1 und α -Glattmuskelaktin-Färbung und Alexa Fluor 488 (goat-anti-rabbit, grüne Fluoreszenz) für den Nachweis von Ki67, ICAM-1 und CREB zur Verfügung. Die Zweitantikörper wurden jeweils im Verhältnis 1:500 eingesetzt.

Die Inkubation des Zweitantikörpers wurde durch drei Waschschriffe mit PBS und einem Waschschriff mit ddH₂O beendet.

Die anschließende Zellkernfärbung erfolgte für 5 min bei RT mit 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, 5 μ g/ml) im Verhältnis 1:50000 in ddH₂O.

Die Eindeckung der Gewebeschnitte auf Objektträgern und der fixierten VSMCs auf Chamberslides wurde mit Fluoreszenz-Eindeckmedium durchgeführt. Die eingedeckten Präparate konnten dunkel bei 4° C bis zur Anfertigung der Fotos gelagert werden.

Die Digitalisierung der immunhistologischen Färbungen erfolgte mit einem Mikroskop (Leica DMLB, Wetzlar), ausgerüstet mit einer hochauflösenden Kamera (Leica DFC320, Wetzlar).

Bei der Ki67- und α -Glattmuskelaktin-spezifische Doppelfärbung, mit deren Hilfe proliferierende VSMCs in Gewebeschnitten identifiziert werden sollten, erfolgte zuerst die Ki67-spezifische Färbung, wie bereits oben beschrieben. Auf die Inkubation des Zweitantikörpers Alexa Fluor 488 (goat-anti-rabbit; grüne Fluoreszenz) der Ki67-spezifischen Färbung folgte dann ein einstündiger Blockschritt mit unkonjugierten Fab-Fragmenten (100 μ g/ml in PBS; goat-anti-mouse-IgG), um endogene Mäuse IgG-Antikörper in den Gewebeschnitten zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation des Erstantikörpers gegen α -Glattmuskelaktin (mouse-anti-human-IgG; 1:25 in PBS) über Nacht bei 4° C. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper Alexa Fluor 594 (goat-anti-mouse IgG, rote Fluoreszenz) erfolgte am nächsten Morgen nach drei kurzen Waschschritten für eine Stunde bei RT. Die Zellkernfärbung mit DAPI und die Eindeckung der Präparate wurden anschließend wie bereits oben beschrieben durchgeführt.

2.5.3 Quantifizierung proliferierender VSMCs durch Nachweis von Ki67

Die quantitativen Analysen immunhistologischer Färbungen erfolgten unter standardisierter Vergrößerung mit der Software Image PRO Plus (Media Cybernetics, Bethesda, USA).

Für die Bestimmung des basalen Prozentsatzes proliferierender Zellen in Aortenschnitten von Mäusen, wurde der prozentuale Anteil immunhistologisch nachgewiesener, Ki67-positiver VSMCs eines Gewebeschnittes an der gesamten VSMC Anzahl (DAPI-Färbung) desselben Schnittes, von jeweils 5 Gewebeschnitten pro Tier, von 6 Mäusen eines Genotyps ermittelt. Es wurden pro Tier insgesamt 4250 ± 250 VSMCs ausgewertet.

Die Quantifizierung proliferierender VSMCs in Kultur erfolgte ebenfalls durch immunhistologischen Nachweis von Ki67. Vor der Färbung wurden die kultivierten VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen für 24 Stunden in serumfreiem DMEM belassen, um den Zellzyklus zu synchronisieren. Dann folgte die Inkubation mit 7,5 ng/ml PDGF für 24 Stunden in serumfreien DMEM, um die Proliferation anzuregen. Die Fixierung der Zellen wurde wie in 2.3.3 beschrieben durchgeführt. Die

Quantifizierung proliferierender Zellen erfolgte an stimulierten und Kontroll-behandelten Proben aus je fünf unabhängigen Isolationen pro Genotyp.

2.5.4 Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Assay

Mit Hilfe des sog. TUNEL- (Terminal Uridin Deoxynukleotdyl Transferase dUTP nick end labeling) Assays können die für apoptotische Zellen charakteristischen Fragmentierungen der DNA in Gewebeschnitten und fixierten Zellen nachgewiesen werden.

Nach Entwachsen und Permeabilisieren der Gewebeschnitte, bzw. TritonX-100-Permeabilisierung der fixierten VSMCs, wurden die Untersuchungen mit dem DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System der Firma Promega nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellkerne wurden wie bereits beschrieben mit DAPI gegengefärbt.

Eine zusätzliche α -Glattmuskelaktin-spezifische Immunfärbung konnte optional, sowohl im Gewebe als auch bei fixierten Zellen, vor der eigentlichen TUNEL-Färbung, durchgeführt werden.

Für die Bestimmung des basalen Prozentsatzes apoptotischer Zellen in Aortenschnitten von Mäusen, wurde der prozentuale Anteil TUNEL-positiver VSMCs eines Gewebeschnittes an der gesamten VSMC-Anzahl (DAPI-Färbung) desselben Schnittes, von jeweils 5 Gewebeschnitten pro Tier, von sechs Mäusen eines Genotyps ermittelt. Es wurden pro Tier insgesamt 4250 ± 250 VSMCs ausgewertet.

Vor der Färbung wurden kultivierte VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen, analog zu den Untersuchungen der Proliferation, für 24 Stunden in serumfreiem DMEM belassen. Um in VSMCs Apoptose auszulösen, folgte eine Stimulationsreihe mit Wasserstoffperoxid (400, 600 und 800 μM H_2O_2) für 24 Stunden in serumfreiem DMEM. Die Fixierung der Zellen erfolgte anschließend wie unter 2.3.3 beschrieben. Die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolgte an stimulierten und Kontroll-behandelten Proben aus je sechs unabhängigen Isolationen pro Genotyp.

2.5.5 Lösungen und Chemikalien

Natriumzitat-Lösung	10 mM	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH= 6,0
1x PBST	100 ml 900 ml 1 ml	10x PBS ddH ₂ O Tween 20
Blocklösung	2 %	Ziegen-Serum (Sigma- Aldrich (Nr. G9023)) in PBST
Blocklösung der CREB- spezifischen Färbung	2 % 1 %	Ziegen-Serum in PBST BSA
Antikörper		
anti-Human α -Actin, Smooth Muscle	Kaninchen	IgG; USBiological (Nr. A0760-31D); Massachusetts, USA
anti-Human α -Actin, Smooth Muscle	Maus	IgG; USBiological (Nr. A0760-31C)
anti-Ki67 (Clone SP6)	Kaninchen	IgG; Thermo Fisher Scientific (Nr. RM-9106-S), Dreieich
anti-CD106 / VCAM-1	Kaninchen	IgG; Cell Applications (Nr. CA0406), INC., San Diego, USA
anti-CD54 / ICAM-1	Kaninchen	IgG; Cell Applications (Nr. CA0541)
anti-CREB	Kaninchen	IgG; Millipore (Nr. 06-863), Billerica, USA
Alexa Fluor 594 (goat-anti-rabbit IgG)	2 mg/ml;	Invitrogen (Nr. A-11012, Carlsbad, USA)
Alexa Fluor 594 (goat-anti-mouse IgG)	2 mg/ml;	Invitrogen (Nr. A-11005)
Alexa Fluor 488 (goat-anti-rabbit IgG)	2 mg/ml;	Invitrogen (Nr. A-11008)

AffiniPure Fab Fragment (anti-mouse)	Ziegen IgG, Dianova, Hamburg (Nr. 115-007-003)
--------------------------------------	--

Kits

DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	Promega, Mannheim
------------------------------------	-------------------

Chemikalien und Materialien

Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt
4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	5 mg/ml; Roth, Karlsruhe
Fluorescence mounting Medium	DAKO Cytom, Carpinteria, USA
Ethanol 99% vergällt mit 1% MEK	Roth, Karlsruhe
Xylol Isomerengemisch für Histologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
Roti-Plast (Paraffin)	Roth, Karlsruhe
TritonX-100	Merck KGaA, Darmstadt

2.6 Ligation der Arteria carotis

2.6.1 Anästhesie, Analgesie und Nachsorge

Die Anästhesie von CREM-KO und WT-Mäusen erfolgte durch intraperitoneale Injektion einer 2%igen Avertinlösung (20 mg/ml Tribromoethanol / 10 mg/ml 2-Methyl-2-Butanol). Der Wirkstoff Tribromoethanol ist besonders für kurze chirurgische Eingriffe geeignet und bewirkt nach nur einer Injektion neben einer schnellen Anästhesie auch eine gute Analgesie für etwa eine Stunde. Die verabreichte Avertin-Dosis betrug 0,36 mg Tribromoethanol und 0,18 mg 2-Methyl-2-Butanol pro Gramm Körpergewicht.

Nach der Injektion und dem Eintritt einer leichten Narkotisierung wurde das Versuchstier, auf dem Rücken liegend, auf dem Operationstisch, bestehend aus einer Wärmeplatte mit einer Stereolupe und einer Kaltlichtquelle, befestigt. Das Operationsfeld wurde enthaart und mit Alkohol sterilisiert. Die Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen®-Augensalbe behandelt.

Bei gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen wurde die Narkose, aufgrund einer Unverträglichkeit der Tierlinie gegen Bestandteile der Avertinlösung, mit einer Isofluran- und Distickstoffmonoxid (N₂O; Lachgas)-Inhalation durchgeführt. Isofluran

(Forene 100 % (V/V), Abbott, Wiesbaden) ist ein halogeniertes Inhalationsanästhetikum. Es induziert eine reversible, generalisierte Depression des zentralnervösen Systems. Der Grad der Depression ist dosisabhängig und bestimmt die Anästhesietiefe. Laryngale und Pharyngale Schutzreflexe werden abgeschwächt. Die durch Isofluran entstehende Muskelrelaxation ist für einen chirurgischen Eingriff ausreichend (Aktories / Förstermann / Hofmann / Starke, 2005, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage).

Für die Anästhesie wurde das Versuchstier in eine verschließbare Box gesetzt, in die ein Isofluran/N₂O-Gemisch (Isofluran, minimale alveoläre Konzentration - MAC 2,0%; N₂O:O₂ im Verhältnis 70:30) über einen Isofluran-Verdampfer (Isofluran Vet. Med. Vapor; Drägerwerk AG, Lübeck) eingeleitet wurde. Nach Eintritt einer Narkotisierung wurde das Versuchstier auf den Operationstisch überführt und darauf befestigt. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch fortlaufende Inhalation des Isofluran/N₂O-Gemisches über eine Maske. Die Isofluran-Dosis konnte dabei auf 1-1,5% MAC reduziert werden.

Die postoperative Analgesie erfolgte bei beiden Tierlinien durch subkutane Injektion von Carprofen (4 mg/kg, Rimadyl, Pfizer, Berlin) kurz vor Beendigung der Narkose. Die Analgesie ist für 24 Stunden wirksam, da sie als Depot unter die Haut verabreicht wurde. In den nachfolgenden zwei bis drei Tagen wurde der Gesundheitszustand des Versuchstiers zusätzlich mehrmals täglich kontrolliert. Bei Anzeichen von Schmerzen wurde eine erneute Carprofen-Injektion verabreicht.

2.6.2 Ligation der Arteria carotis und Sham-Operation

Nach Feststellung der nötigen Narkosetiefe wurde eine Inzision in der Medianlinie vom Hals bis zum Beginn des Sternums durchgeführt. Die rechte und linke Speicheldrüse wurden zur Seite gezogen und die Carotisarterien wurden freigelegt. Zunächst wurde an der linken A. carotis eine Scheinligation (sham) durchgeführt, indem ein kurzes Stück sterile, nicht resorbierbare Nahtseide (5.0 schwarz geflochten; Ethicon, Norderstedt) mit einer gebogenen Pinzette unter der A. carotis hindurch gezogen wurde ohne diese abzubinden. Anschließend erfolgte die eigentliche Ligation der rechten A. carotis, die den Gefäßdurchfluss stoppte und das

Gefäß verschloss. Vor dem Verschließen des Einschnittes wurden die Speicheldrüsen zurückgeschoben. Die Wunde wurde mit drei bis vier Stichen vernäht und mit Wundspray (Octenisept, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) versorgt.

Das Erwachen der Versuchstiere erfolgte etwa eine Stunde nach Operationsende. Aufgrund der durch die Narkose unterdrückten Thermoregulation wurden die Versuchstiere bis zum Erwachen gewärmt.

Bei Versuchstieren, die mittels Isofluran-Inhalation anästhesiert wurden, erfolgte das Erwachen direkt nach Abfluten des Inhalationsanästhetikums. Anschließend wurde noch einige Minuten reiner Sauerstoff verabreicht, um eine Diffusionshypoxie zu vermeiden. Die Diffusionshypoxie ist durch eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration und eine Zunahme der Lachgaskonzentration in den Lungenbläschen (Alveolen) gekennzeichnet, die durch Rückdiffusion von Lachgas aus dem Blut bei Beendigung einer Inhalationsnarkose zustande kommt. Das Auftreten einer Diffusionshypoxie kann durch Sauerstoffbeatmung vermieden werden (Aktories / Förstermann / Hofmann / Starke, 2005, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage).

2.6.3 Anfertigung von Paraffinschnitten der A. carotis

Drei Wochen nach Ligation wurden die Versuchstiere durch CO₂-Inhalation getötet und die ligierten und scheinoperierten Carotisarterien entnommen. Nach Fixierung mit 4%iger Formaldehydlösung über Nacht wurden die Arterien, wie bereits unter 2.5.1 beschrieben, in Paraffin eingebettet.

Bei Anfertigung der Paraffinschnitte ligierter Carotisarterien erfolgte der Anschnitt des Präparats direkt hinter der gesetzten Ligation. Alle folgenden Paraffinschnitte in Richtung Aortenbogen wurden aufgefangen. Dabei befanden sich immer acht Gefäßschnitte auf einem Objektträger. Der Abstand der einzelnen Paraffinschnitte zur Ligation wurde bei allen Carotisarterien notiert, um eine vergleichbare Zuordnung von proximalem Abstand zur Ligation und gemessener Neointimadicke zu gewährleisten.

Es wurden stets Gefäßschnitte des gleichen Abstandes zur Ligation bei 0, 200, 400, 700 und 1000 μm verglichen und mit Hilfe einer kombinierten Elastika- und Zellkernfärbung (siehe 2.6.4) analysiert.

Bei scheinoperierten Carotisarterien wurden nach Anschnitt des Präparats 10 aufeinanderfolgende Objektträger mit je acht Gefäßschnitten angefertigt. Für die Ermittlung der Gefäßdicke wurden stets die Gefäßschnitte der Objektträger 3, 6 und 9 eines Tieres ausgewertet und gemittelt.

2.6.4 Quantifizierung der Neointimabildung mittels Resorcin-Fuchsin nach Weigert und Kernechtrot-Färbung

Die ausgewählten Objektträger wurden, wie in 2.5.2, beschrieben in absteigenden Xylol und Alkoholreihe entwachst und auf einen Alkoholgehalt von 75% eingestellt.

Die Färbung des elastischen Bindegewebes erfolgte für 5 min mit einer Resorcin-Fuchsin-Färbelösung. Anschließend wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser (dH_2O) gespült. Die Resorcin-Fuchsin-Färbung wurde dann, unter mikroskopischer Kontrolle, mit Säurealkohol für etwa 10-20 sek differenziert, bis der Hintergrund der Präparate entfärbt war und die elastischen Membranen schwarz-blau zu erkennen waren. Die Differenzierung der Färbung wurde durch eine Erhöhung des pH-Werts mit fließendem Leitungswasser gestoppt.

Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte für 5 min mit einer Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Färbelösung. Nach Spülen mit dH_2O wurde auch die Kernfärbung differenziert, um überfärbte Kerne und umliegendes Gewebe zu entfärben. Dieser Schritt erfolgte für etwa 1 min in 95%igem Ethanol unter mikroskopischer Kontrolle. In den Gefäßschnitten waren nun die elastischen Fasern schwarz-blau und die Zellkerne rot gefärbt.

Die gefärbten Gefäßpräparate wurden anschließend für 3 min in absolutem Alkohol und anschließend zweimal für 5 min in Xylol entwässert. Die Objektträger wurden mit Deckgläsern (24 x 50 mm; Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde) und 70 μl xylolhaltigem Einschlussmittel (Roti Histokitt II Roth, Karlsruhe) fixiert. Die Vermessung der Neointima und der Gefäßwände erfolgte unter kalibrierter Vergrößerung mit der Software Image PRO Plus.

2.6.5 Lösungen und Chemikalien

Resorcin-Fuchsin nach Weigert

1% Resorcin-Fuchsin (Chroma Technologie Corp, Bellows Falls, USA) in 95% Ethanol aufgeköcht

3% konzentrierte Salzsäure filtiert

Kernechtrot-Aluminiumsulfat

0,2% Kernechtrot (Chroma Technologie Corp)

10% Kaliumaluminiumsulfat in dH₂O aufgeköcht, filtiert

Salzsäurealkohol

3% konzentrierte Salzsäure 95%iges Ethanol

2.7 Untersuchungen der Genregulation mittels Mikroarray

Hybridisierungs-basierte Arrays bieten die Möglichkeit des Expressions-Screenings sowie der Klassifizierung einer ganzen Reihe von Genen. Die MouseWG-6 v2 Expressions BeadChips (Nr. BD-201-20202) der Firma Illumina decken über 34.526 annotierte Referenz-Sequenzen-Transkripte der Maus ab und wurden für die Untersuchungen zur Genregulation in primär isolierten VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen eingesetzt.

2.7.1 RNA-Isolation aus kultivierten VSMCs

Vor der RNA-Isolation wurden primäre VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen in Sechskammer Zellkulturplatten kultiviert und äquivalent zu den Untersuchungen der transienten Transfektion (siehe 2.4.2), für 9 Stunden mit dem Wachstumsfaktor PDGF stimuliert. Jede Isolation primärer VSMCs pro Genotyp stellte dabei eine unabhängige Probe dar.

Die Lyse der VSMCs wurde mit dem RNA-Lyse-Puffer des RNA MicroPrep™ Kit der Firma Zymo Research (Orange, USA) direkt auf der Zellkulturplatte durchgeführt. Die weitere Isolation und der optionale DNaseI-Schritt (3 Unit/Probe, 15 min bei 37° C) erfolgten ebenfalls mit dem Zymo Research-RNA Kit nach Herstellerangaben.

Die RNA wurde nach der Isolation bis zur RNA-Mikroarray-Analyse bei -80° C gelagert.

2.7.2 RNA-Illumina Mikroarray

Die Durchführung der RNA-Illumina Mikroarrays erfolgte als Dienstleistung des Leibniz-Instituts für Atheroskleroseforschung (Lifa) der Universität Münster.

Die Umschreibung der Gesamt-RNA-Proben und die gleichzeitige Biotin-16-UTP-Markierung der cRNA wurde mit 400 ng RNA-Probe mit Hilfe des Amplifizierungs-Kits der Firma Ambion (Ambion, Foster City, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Hybridisierung erfolgte auf dem Illumina MouseWG-6 v2 Expressions BeadChips (Illumina, San Diego, USA) mit 850 ng cRNA über 16 Stunden bei 55° C in einem Hybridisierungssofen (BeadChip Hyb Wheel). Zum Auslesen der Chips wurde die Illumina BeadStation 500 (Illumina, San Diego, USA) eingesetzt. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Software BeadStudio Data (Illumina, San Diego, USA).

Zur Identifizierung der Regulation verschiedener mRNAs in CREM-KO VSMCs, wurden die Ergebnisse der Hybridisierung auf die WT-Proben normiert.

Die Validierung ausgewählter Gene erfolgte mittels Real-Time PCR-Analysen. Dabei wurden Gene validiert, die mindestens 1,4-fach hoch- bzw. 0,6-fach herabreguliert waren und in der statistischen Auswertung der Mikroarrays signifikant verändert waren ($p < 0,05$). Zusätzlich wurden Gene validiert, deren RNA-Expressionen im Mikroarray zwar nicht signifikant verändert waren, die aber möglicherweise eine funktionelle Relevanz für die untersuchte Fragestellung darstellten.

2.7.3 Quantitative Real-Time PCR zur Validierung der Mikroarrays

Die Umschreibung der RNA-Proben in cDNA erfolgte mit Hilfe des First Strand cDNA-Kits der Firma Roche (Mannheim) nach Herstellerangaben. Für die

Umschreibung wurden 500 ng RNA eingesetzt. Die erhaltende cDNA wurde in 50 μ l ddH₂O aufgenommen. Die quantitativen Real-Time PCRs wurden mit einem LightCycler® der Firma Roche und dem Quanti Fast SYBR Green Kit (Qiagen) durchgeführt.

Der PCR-Ansatz pro Probe setzte sich wie folgt zusammen:

ddH ₂ O	4 μ l
Primer (10 pg)	je 2 μ l
Master SYBR Green I Mix	10 μ l
cDNA Probe	2 μ l

Die entsprechenden Oligonukleotide und Messprogramme der Real-Time PCR sind im Anhang aufgeführt.

Anhand der Standardkurven konnte mit Hilfe der LightCycler®-Software (Version 3.5) die Konzentration der PCR-Produkte berechnet werden. Um sicherzustellen, dass nur ein Fragment hergestellt wurde, wurden im Anschluss an die PCR Schmelzkurven der PCR-Produkte aufgezeichnet. Die relative Quantifizierung der PCRs wurde durch den Abgleich der Expression auf das interne Kontroll-Gen Cyclophilin A (*mcyc*) mit Hilfe der REST® Software Version 2.07 durchgeführt.

2.8 Kontraktionsmessungen an Aortenringen (Mulvany)

Die *in vitro*-Untersuchung von Blutgefäßen mit einem Myographen wurde von Mulvany und Halpern im Jahre 1977 (Mulvany und Halpern 1977) entwickelt und beruht auf dem Prinzip, isolierte Gefäße durch Zugabe unterschiedlicher Substanzen isometrisch zu kontrahieren und die so vom Gefäß erzeugten Wandspannungen zu bestimmen. In gleichem Maße kann die Abnahme der Wandspannung der Gefäße durch Zugabe relaxierender Substanzen bestimmt werden. Für die Messungen wurde ein Gefäß-Myograph (Myo-Interface Modell 410A, J. P. Trading, Aarhus, Dänemark) eingesetzt. Er besteht aus zwei Halterungen, zwischen denen das Gefäßsegment (z.B. Aortenring) mit Hilfe von zwei Platindrähten eingespannt wurde. Die eine Halterung ist mit einer Mikrometer-Schraube, die andere mit einem Kraftaufnehmer verbunden. Der Abstand beider Halterungen voneinander und die

durch die Gefäßdehnung erzeugte Kraft konnten so bestimmt werden. Die Bestimmung dieser Parameter ermöglichte die Berechnung der Gefäßwandspannung. Die Messungen wurden stets in Doppelbestimmung an zwei Mulvany-Anlagen mit zwei Aortenringen pro Tier durchgeführt.

2.8.1 Vorbereitung der Aorten für die Kontraktionsmessungen

Die vaskulären Kontraktionsmessungen wurden an Aorten von 17-19 Wochen alten gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen durchgeführt. Die Mäuse wurden durch Kohlendioxid-Inhalation getötet und die Aorten vorsichtig und ohne zu starke Dehnung entnommen und in den vorbereiteten Krebs-Henseleit-Puffer (KHP; KCl 4,7 mM) überführt. Anschließend wurden die Aorten unter einer Stereolupe von umliegendem Gewebe befreit. Aortenringe von 1,5 bis 1,8 mm Länge (Teilstriche in Skala der Stereolupe x Vergrößerungsfaktor) beider Genotypen wurden, beginnend vom abdominalen Teil der Aorta, mit einer Augenschere abgetrennt. Durch diese Gefäßsegmente wurde dann ein dünner Platindraht geführt und in jeweils einer Halterung des Myographen eingespannt. Die Messkammer des Myographen wurde zuvor mit 10 ml des KHP (37° C) befüllt und während des gesamten Versuchs mit Carbogen (95% O₂ / 5% CO₂) begast. Anschließend wurde ein weiterer Draht in die Gefäße eingeführt und an der anderen Halterung befestigt. Vor Beginn der Messungen wurden die Anlagen mit den eingespannten Aortenstücken für eine halbe Stunde äquilibriert.

2.8.2 Stimulation und Messung

Zu Beginn der Messungen wurden die Aortenringe auf eine basale Spannung von 17,5 mN vorgespannt, um eine optimale Kraftentwicklung zu gewährleisten. Die Untersuchung der Stimulierbarkeit der isolierten Gefäße erfolgte über die dreimalige, kurzzeitige Einleitung von Krebs-Henseleit-Puffer mit erhöhter Kaliumchlorid-Konzentration (KKHP; KCl-Konzentration 122,7 mM) in die Messkammer. Stimulierbare Gefäße reagierten auf die Erhöhung der Kalium-Konzentration in der Messkammer mit einer isometrischen Kontraktion. Um das Maß der maximalen Gefäßkontraktion der Aortenringe festzulegen, erfolgt zunächst eine lange

Kontraktion durch Stimulation mit KKHP. Der KKHP wurde für die nachfolgenden Untersuchungen vollständig ausgewaschen.

Da die Untersuchung relaxierender Aortenringe aus dem basalen Spannungszustand (17 mN) heraus schwer zu beurteilen sind, erfolgte vor den Untersuchungen zur Vasodilatation zuerst eine Kontraktion der Aortenringe mit dem α_1 -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin (PE, 1 μ M). Alle Messungen wurden in Gegenwart des β -Adrenozeptor-Antagonisten Propranolol (PRO 1 μ M; (\pm) Propranolol Hydrochlorid, Sigma-Aldrich) durchgeführt, um, trotz der Selektivität von Phenylephrin auf α_1 -Adrenozeptoren, eine eventuelle Stimulation der β -Adrenozeptoren, besonders bei hohen Konzentrationen von PE, auszuschließen. Einzige Ausnahme stellten die Untersuchungen der β -adrenergen Stimulation mit Isoprenalin (ISO) dar, bei denen Propranolol nicht eingesetzt werden konnte.

Im Folgenden sind die in den myographischen Untersuchungen eingesetzten Substanzen und Konzentrationen dargestellt. Alle eingesetzten Substanzen stammen von Sigma-Aldrich.

Substanz	Wirkung	Konzentration
Phenylephrin	vasokonstriktorisch	1 x 10 ⁻⁹ bis 1 x 10 ⁻⁵ M
Nitroprussid-Natrium	vasodilatatorisch	1 x 10 ⁻¹¹ bis 3 x 10 ⁻⁶ M
Carbachol	vasodilatatorisch	1 x 10 ⁻⁹ bis 1 x 10 ⁻⁴ M
Isoprenalin	vasodilatatorisch	1 x 10 ⁻⁹ bis 3 x 10 ⁻⁴ M
Forskolin	vasodilatatorisch	1 x 10 ⁻¹⁰ bis 3 x 10 ⁻⁶ M

Zum Abschluss der myographischen Untersuchungen erfolgte die Kontrolle der Endothelfunktion der Aortenringe durch Stimulation mit 1 μ M Carbachol, nach vorangegangener maximaler Kontraktion durch Stimulation mit Phenylephrin. Carbachol vermittelt die Freisetzung des ERDF (endothelial derived relaxin factor, NO) aus Endothelzellen (Furchgott und Zawadzki 1980).

Eine Carbachol-vermittelte Relaxation der Gefäße um weniger als 70%, könnte auf eine Beschädigung des Endothels hindeuten und führte zum Ausschluss der Messung.

2.8.3 Lösungen und Chemikalien

Krebs-Henseleit-Puffer (KCl 4,7 mM)	118 mM	NaCl
	4,7 mM	KCl
	1,2 mM	MgSO ₄
	1,2 mM	KH ₂ PO ₄
	25 mM	NaHCO ₃
	0,03 mM	EDTA
	10 mM	Glukose
	2,5 mM	CaCl ₂
Krebs-Henseleit-Puffer (KCl 122,7 mM)	122,7 mM	KCl
	1,2 mM	MgSO ₄
	1,2 mM	KH ₂ PO ₄
	25 mM	NaHCO ₃
	0,03 mM	EDTA
	10 mM	Glukose
	2,5 mM	CaCl ₂

2.9 Atherogene Diät bei Mäusen mit Inaktivierung von CREM / CREB und Inaktivierung von ApoE

Mäuse der Tierlinien CREM x ApoE-KO (siehe 2.1.2) und gmCREB x ApoE-KO (siehe 2.1.4) wurden zur Steigerung der atherosklerotischen Plaquebildung ab einem Alter von 8 Wochen mit einer fettreichen Western-Diät (Ssniff, Soest) gefüttert.

Je nach Tierlinie und Versuch erfolgte die Fütterung der Spezialdiät über 20 bis 40 Wochen.

2.9.1 Analyse der Serumlipidspiegel (Cholesterin, Triglyzeride, HDL und LDL)

Die Entnahme des Blutes erfolgte nach Tötung der Versuchstiere und vor der Präparation der Aorta mit einer Kanüle aus dem Herzen. Nach Gerinnung des Blutes bei RT wurde es über Nacht bei 4° C gelagert. Die geformten Bestandteile wurden bei 14.000 rpm für 5 min pelletiert. Das Serum wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte bei -80° C bis zu Analyse der Serumlipide gelagert werden. Die Analyse der Serumproben wurde als Dienstleistung im Zentrum für Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikum Münsters, Albert-Schweizer-Straße 33, durchgeführt.

2.9.2 Quantifizierung atherosklerotischer Plaques mittels Oil-red-O-Färbung

Nach Fütterung der Spezialdiät über 20-40 Wochen wurden die Aorten von CREM x ApoE-KO und gmCREB x ApoE-KO Mäusen für die Quantifizierung atherosklerotischer Plaques entnommen, freipräpariert und der Länge nach aufgeschnitten. Mit der Lumenseite nach oben wurden die Aorten mit 4%iger Formaldehydlösung über Nacht fixiert. Die Färbung lipidreicher Einlagerungen in der Aorta erfolgte, nach fünfminütiger Äqualibrierung mit 60% Isopropanol, mit einer 0,3%igen Oil-red-O Gebrauchslösung für 50-60 min. Nach Differenzierung mit 60% Isopropanol wurden die Aorten mit wässrigem Eindeckmedium (Faramount mounting Medium, DAKO Cytom, Carpinteria, USA) auf Objektträgern fixiert. Die Quantifizierung wurde unter standardisierter Kalibrierung mit der Software Image PRO Plus durchgeführt.

2.9.3 Lösungen und Chemikalien

Oil-red-O-Gebrauchslösung

0,3% Oil-red-O (Chroma Technologie Corp, Bellows Falls, USA) in 60% Isopropanol

2.10 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM; standard error of the mean) dargestellt, wobei n die Anzahl der untersuchten Tiere pro Genotyp darstellt. Bei den Transfektionen und Mikroarray-Untersuchungen entsprach n der Anzahl unabhängiger Transfektionen bzw. Zellisolationen eines Genotyps. Alle statistischen Analysen wurden mit SigmaStat (Version 3.01; Systat Software, Erkrath) durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde, wenn nicht anders angegeben, bei der Untersuchung mehrerer Stichproben mittels *Omnibustest* (Two-way ANOVA) mit anschließendem *post-hoc Test* ermittelt. Im Falle zweier Stichproben wurde der *t-test* angewendet. Die statistischen Unterschiede wurden bei einem P-Wert $<0,05$ als signifikant betrachtet.

3 Funktion des Transkriptionsfaktors CREB

3.1 Nachweis der glattmuskelzellspezifischen CREB-Inaktivierung

Die glattmuskelzellspezifische Inaktivierung von CREB erfolgte mit Hilfe des *Cre/loxP*-Systems, unter Verwendung von Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinasen. Die Kreuzung von Mäusen der Linie $CREB^{loxP}$, in deren Genom das Exon 10 des CREB-Genes durch *loxP*-Elemente flankiert wurde (Mantamadiotis et al. 2002), mit Mäusen der Linie SM-iCRE-ER^{T2}, die eine Cre-Rekombinase und einen modifizierten Östrogenrezeptor (ER) unter Kontrolle eines glattmuskelzellspezifischen SMMHC (smooth muscle myosin heavy chain)-Promotors exprimieren (Wirth et al. 2008), ermöglicht die Tamoxifen-abhängige glattmuskelzellspezifische Aktivierung der Cre-Rekombinase. Durch die Cre-Rekombinase-vermittelte Exzision des Exons 10 kommt es zu Bildung eines CREB-Null-Allels, welches für ein funktionell inaktives Protein kodiert (Mantamadiotis et al. 2002). Abbildung 3.1 zeigt den Nachweis der CREB-Inaktivierung durch das Auftreten des Null-Allels in einer „Step-down“-PCR in verschiedenen Organen Tamoxifen- bzw. Neutralöl-behandelter SM-iCRE-ER^{T2}-Cre-Creb^{fl/fl}-Mäuse.

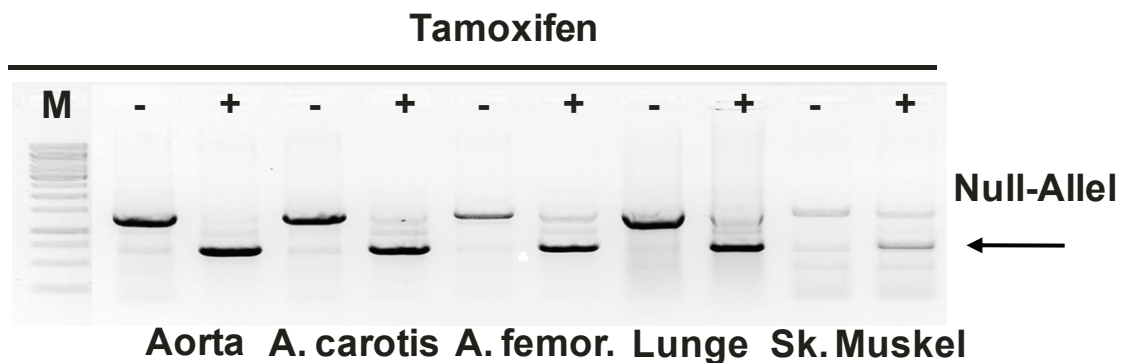


Abb. 3.1 Nachweis der CREB-Inaktivierung in glatten Muskelzellen mittels „Step-down“ PCR. Der Nachweis des Null-Allels (700 bp, Pfeil) in verschiedenen Organen Tamoxifen-behandelter SM-iCRE-ER^{T2}-Cre⁺-Creb^{fl/fl}-Mäuse zeigte die Inaktivierung von CREB in Aorta, A. carotis, A. femoralis und Lunge mit Hilfe des *Cre/loxP*-Systems. In Neutralöl-behandelten Kontrollen war das *loxP*-Allel (1200 bp) nachweisbar. In Skelettmuskel und Lunge Tamoxifen-behandelter Mäuse wurden beide Allele amplifiziert, da CREB nur glattmuskelzellspezifisch inaktiviert wurde.

Der Nachweis der CREB-Inaktivierung durch Bildung des Null-Allels nach Behandlung mit Tamoxifen, konnte in Aorta, A. carotis und A. femoralis gezeigt werden. In Neutralöl-behandelten Kontroll-Mäusen trat das Null-Allel dagegen nicht auf, stattdessen wurde hier, als Nachweis der *Creb*-Genmodifikation, das *loxP*-Allel

identifiziert. In Femoralisarterien wurde neben dem Null-Allel auch das *loxP*-Allel nachgewiesen. Aufgrund der schwachen Amplifizierung des *loxP*-Allels im Vergleich zum Null-Allel konnte aber hier ebenfalls von einer erfolgreichen CREB-Inaktivierung ausgegangen werden. In Skelettmuskel und Lunge wurden beide Allele nachgewiesen, da CREB nur glattmuskelzellspezifisch inaktiviert wurde.

Zum weiteren Nachweis der glattmuskelzellspezifischen Inaktivierung von CREB, wurden CREB-spezifische Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebeschnitten der Aorta angefertigt. Abbildung 3.2 zeigt die Überlagerungsbilder der immunhistologischen Färbungen von Gefäßschnitten Tamoxifen- und Kontroll-behandelter SM-iCRE-ER^{T2}-Cre-Creb^{fl/fl}-Mäuse.

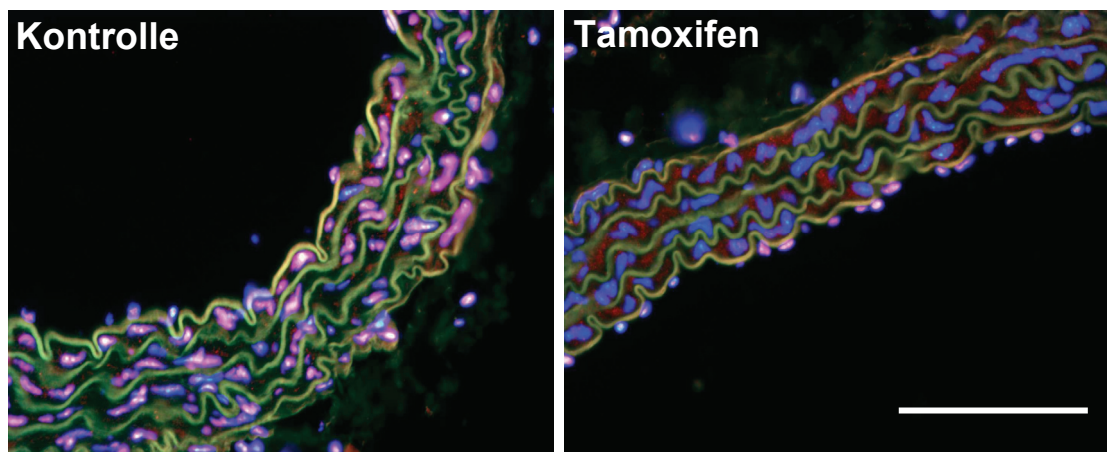


Abb. 3.2 Immunhistologischer Nachweis der glattmuskelzellspezifischen Inaktivierung von CREB. Die Überlagerung der Bilder der Immunfluoreszenzfärbung von CREB (rote Fluoreszenz) und der DAPI-Zellkernfärbung (blaue Fluoreszenz) in aortalen Gewebeschnitten Tamoxifen- und Kontroll-behandelter SM-iCRE-ER^{T2}-Cre-Creb^{fl/fl}-Mäuse, zeigte die Inaktivierung von CREB in glatten Muskelzellen der aortalen Media Tamoxifen-behandelter Mäuse, nicht aber im umgebenden Gewebe und den Endothelzellen. In Glattmuskelzellen Neutralöl-behandelter Kontroll-Mäuse konnte CREB dagegen nachgewiesen werden (violette Zellkerne). Größenbalken 100 μ m.

In Gewebeschnitten Neutralöl-behandelter Mäuse konnte CREB in den VSMCs der Media, den Endothelzellen und den Zellen des umliegenden Gewebes nachgewiesen werden. Bei Tamoxifen-behandelten Mäusen wurden keine CREB-positiven Zellkerne in den glatten Muskelzellen der Media detektiert. Die Endothelzellen und die Zellen des umliegenden Gewebes waren dagegen CREB-positiv. Dies beweist die Tamoxifen-aktivierte, glattmuskelzellspezifische Inaktivierung von CREB.

3.2 Nachweis der CREB-Inaktivierung in der Primärkultur

Die Isolation von VSMCs erfolgte durch Aussprossung aus Gewebestückchen der Aorta. Die Untersuchungen der CREB-Inaktivierung in kultivierten VSMCs von Aorten Tamoxifen-behandelter Mäuse, erfolgten analog zu den oben gezeigten Versuchen mittels PCR und Immunfluoreszenzfärbungen. Der Nachweis der Inaktivierung von CREB konnte dabei nicht erbracht werden. Auch die nachträgliche Behandlung kultivierter VSMCs von SM-iCRE-ER^{T2}-Cre-Creb^{fl/fl}-Mäusen mit Tamoxifen bewirkte keine Inaktivierung von CREB (Untersuchungen von M. Seidl und T. M. H. Sur, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Münster). Aus diesem Grund musste auf Versuche mit kultivierten VSMCs verzichtet werden. Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse beziehen sich daher auf *in vivo* bzw. *ex vivo* Untersuchungen, bei denen, aufgrund der PCR-Ergebnisse und der immunhistologischen Untersuchungen von Gefäßen Tamoxifen-behandelter SM-iCRE-ER^{T2}-Cre⁺-Creb^{fl/fl}-Mäuse, von einer erfolgreichen Inaktivierung von CREB in glatten Muskelzellen ausgegangen werden kann.

In den nachfolgenden Versuchen werden die Tamoxifen-behandelten SM-iCRE-ER^{T2}-Cre⁺-Creb^{fl/fl}-Mäuse (glattmuskelspezifische) gmCREB-KO und die Neutralöl-behandelten SM-iCRE-ER^{T2}-Cre⁻-Creb^{fl/fl}-Mäuse Kontroll-Mäuse genannt.

3.3 Basale Proliferation und Apoptose in Aorten von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen

Die Bestimmung der basalen Proliferation und Apoptose in aortalen Gewebeschnitten von Mäusen mit einer Inaktivierung von CREB diente der Charakterisierung des basalen Phänotyps und war für die Interpretation der nachfolgenden Kontraktionsmessungen an Aortenringen sowie für die Interpretation der Befunde gefäßproliferativer Erkrankungen relevant.

3.3.1 Basale Proliferation

Die Charakterisierung der basalen Proliferation in aortalen Gewebeschnitten von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen erfolgte durch immunhistologischen Nachweis von Ki67, einem Marker der Zellproliferation.

Abbildung 3.3 zeigt Einzelbilder der Ki67-positiven (grüne Fluoreszenz) und DAPI-gefärbten Zellkerne (blaue Fluoreszenz) sowie deren Überlagerung in einer Beispielfärbung eines Aortenschnittes. Die Überlagerung der Einzelbilder diente der Quantifizierung proliferierender Zellen, welche aus dem Verhältnis Ki67-positiver VSMCs zu DAPI-positiven Zellen des Aortenschnittes bestimmt wurde (Abb. 3.4).

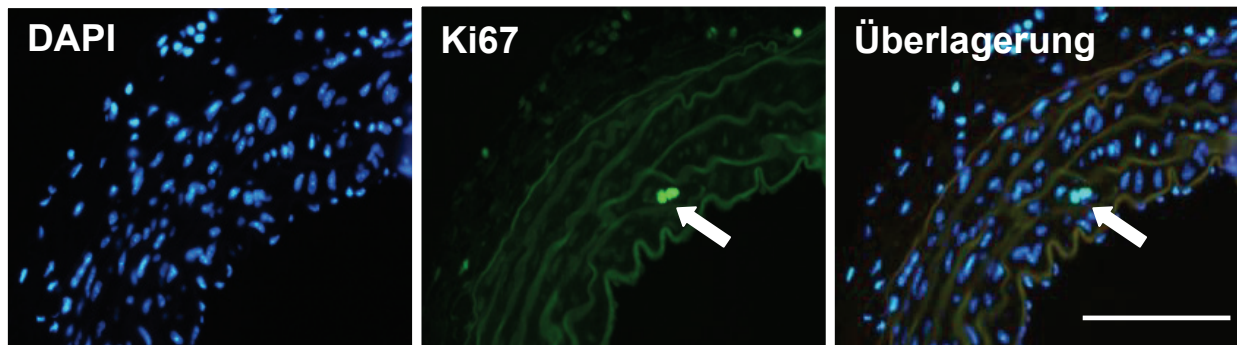


Abb. 3.3 Nachweis proliferierender VSMCs in aortalen Gewebeschnitten. Die Pfeile zeigen Ki67-positive Zellen (grüne Fluoreszenz) in aortalen Gewebeschnitten von Kontroll-Mäusen. Mit Hilfe der Ki67-Färbung konnten proliferierende VSMCs nachgewiesen werden. Die Überlagerung dieser Fluoreszenzbilder mit Bildern der DAPI-Zellkernfärbung (blaue Fluoreszenz) wurde zur Quantifizierung der Proliferation herangezogen. Größenbalken 100 μ m.

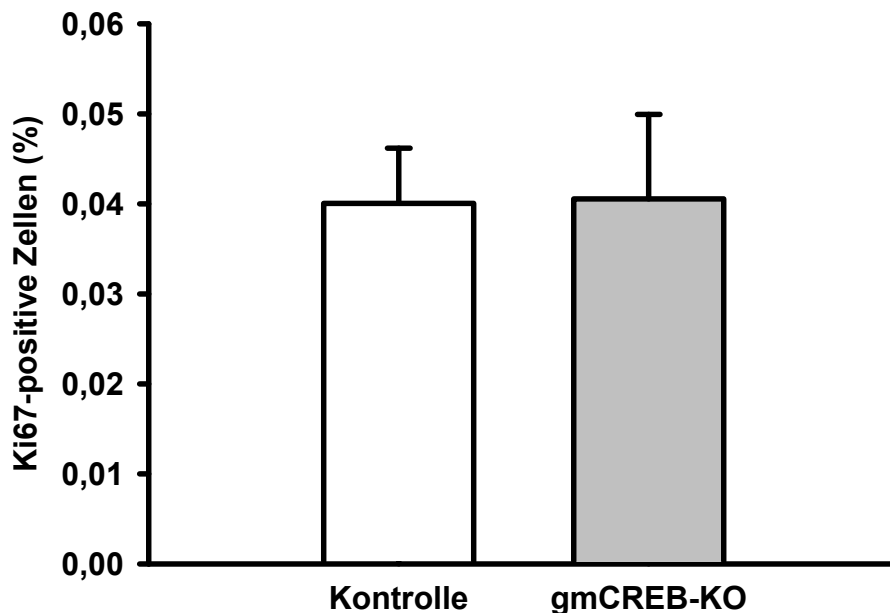


Abb. 3.4 Basale Proliferation in aortalen Gewebeschnitten. Die Quantifizierung proliferierender Zellen von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen unter basalen Bedingungen zeigte keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Kontrolle n=6, gmCREB-KO n=6.

Der prozentuale Anteil Ki67-positiver Zellen zeigten zwischen den untersuchten Gruppen keine Unterschiede. Die glattmuskelzellspezifische Inaktivierung von CREB hatte keinen Einfluss auf die Proliferation von VSMCs.

3.3.2 Basale Apoptose

Die Charakterisierung der basalen Apoptose in aortalen Gewebeschnitten von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen erfolgte mit Hilfe des TUNEL-Assays. Diese Einzelzellanalyse weist Strangbrüche der genomischen DNA nach und dient als Marker apoptotischer Zellen. Die Beispielfärbung in Abbildung 3.5 zeigt die Einzelbilder sowie die Überlagerungen der Bilder der TUNEL-Färbung mit Bildern einer α -Glattmuskelaktin-spezifischen Färbung.

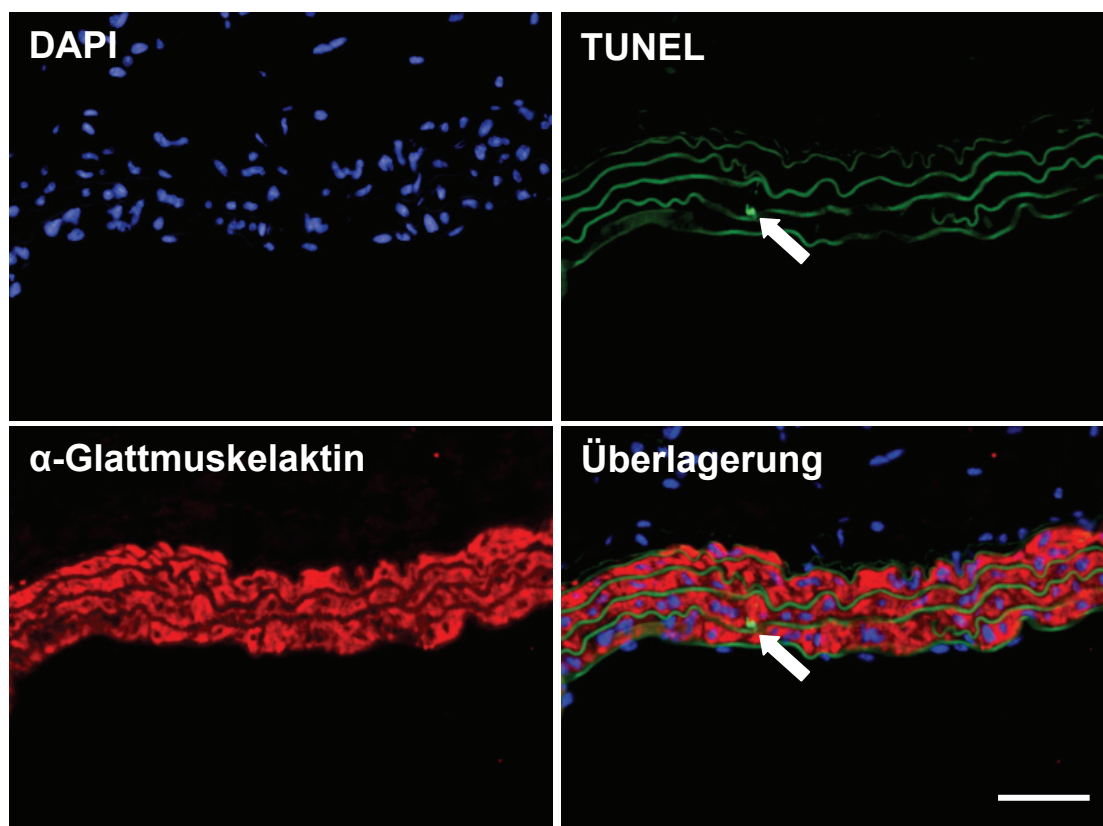


Abb. 3.5 Nachweis apoptotischer VSMCs in aortalen Gewebeschnitten. Die Pfeile kennzeichnen TUNEL-positive Zellen (grüne Fluoreszenz) in aortalen Gewebeschnitten von Kontroll-Mäusen. Mit Hilfe der TUNEL-Färbung konnten apoptotische VSMCs nachgewiesen werden. Die Überlagerung dieser Bilder mit Bildern einer DAPI-Zellkernfärbung (blaue Fluoreszenz) und einer α -Glattmuskelaktin-spezifischen Färbung (rote Fluoreszenz) diente der Quantifizierung apoptotischer VSMCs. Größenbalken 100 μ m.

Die Überlagerung mit Bildern der DAPI-Zellkernfärbung diente der Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen. Dabei konnte die fragmentierte DNA im Zellkern lokalisiert und somit die Apoptose der Zelle nachgewiesen werden. Um bei der Quantifizierung apoptotischer Zellen nur VSMCs zu berücksichtigen, diente eine zusätzliche α -Glattmuskelaktin-spezifische Färbung (rote Fluoreszenz) der Unterscheidung

zwischen VSMCs und nicht-glattmuskelzellulärem Gewebe. In allen Zellen der Media konnte α -Glattmuskelaktin nachgewiesen werden, daher wurden alle Zellen der Media in der Auswertung berücksichtigt. In den Untersuchungen der VSMC-Proliferation mittels Ki67-spezifischer Immunfärbung (siehe Abb. 3.3), wurde daher auf eine zusätzliche α -Glattmuskelaktin-spezifische Färbung verzichtet.

Der Prozentsatz apoptotischer Zellen aortalen Gewebeschnitte wurde aus dem Verhältnis TUNEL-positiver VSMCs zu der gesamten Zellzahl (DAPI-positive Zellen) des Gefäßschnitts bestimmt (Abb. 3.6). Die glattmuskelzellspezifische Inaktivierung von CREB führte dabei, im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, zu einer Verdopplung des Prozentsatzes apoptotischer Zellen (Kontrolle $0,05 \pm 0,01$ %, gmCREB-KO $0,11 \pm 0,02$ %).

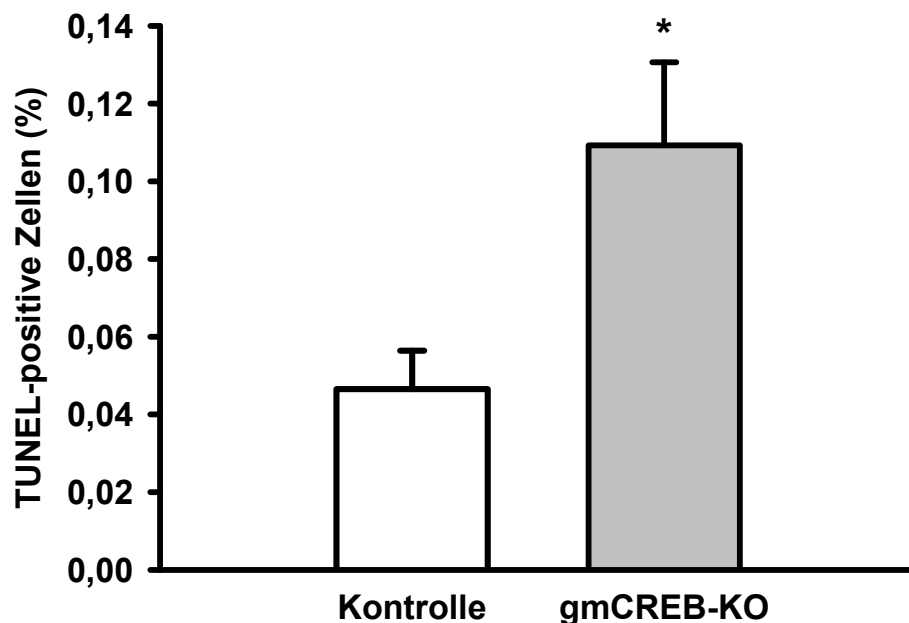


Abb. 3.6 Basale Apoptose in aortalen Gewebeschnitten. In aortalen Gewebeschnitten von gmCREB-KO Mäusen konnte, mittels TUNEL-Färbung, ein gesteigerter Anteil TUNEL-positiver Zellen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe festgestellt werden. Kontrolle n=6, gmCREB-KO n=6, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

In verschiedenen Studien wurden anti-östrogene Einflüsse von Tamoxifen auf die Regulation der Apoptose diskutiert (Feng et al. 2010, Dalvai und Bystricky 2010). Um mögliche Einflüsse des Tamoxifens auf die vorliegenden Ergebnisse auszuschließen, wurden C57Bl6-Wildtyp-Mäuse, analog zu den gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen, mit Tamoxifen bzw. Neutralöl behandelt. Die Quantifizierung apoptotischer Zellen

mittels TUNEL-Färbung in aortalen Gewebeschnitten Tamoxifen-behandelter C57Bl6-Mäuse zeigte im Vergleich zu Neutralöl-behandelten Mäusen keinen Anstieg des Prozentsatzes apoptotischer Zellen (Abb. 3.7). Ein Einfluss des Tamoxifens auf die gesteigerte Apoptose von gmCREB-KO Mäusen konnte nicht festgestellt werden.

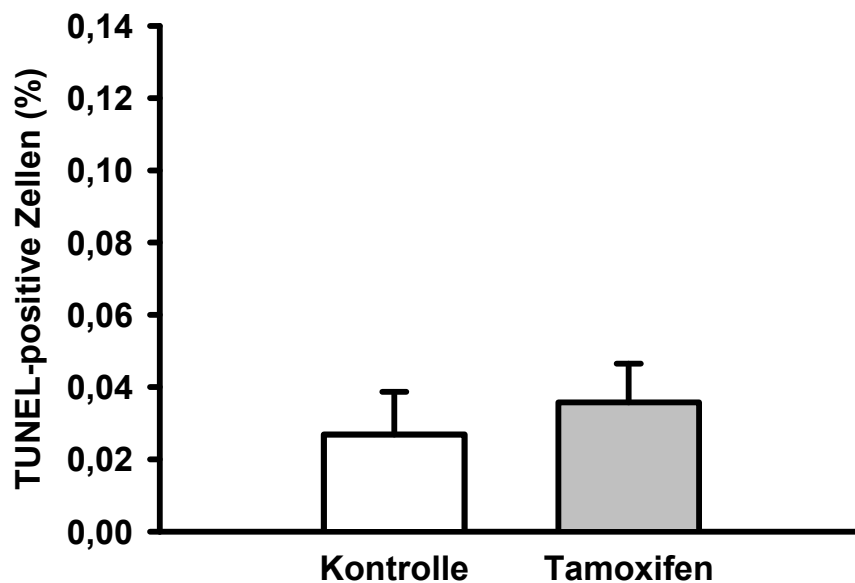


Abb. 3.7 Apoptoserate in aortalen Gewebeschnitten von C57Bl6-Mäusen nach Behandlung mit Tamoxifen. Um einen Effekt des Tamoxifens auf die basale Apoptose auszuschließen, wurden C57Bl6-Mäuse mit Tamoxifen bzw. Neutralöl behandelt. Die Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen zeigte bezüglich der Behandlung keinen Einfluss auf die basale Apoptose. Kontroll-Behandlung n=6, Tamoxifen n=6.

3.4 Kontraktionsmessungen an Aortenringen von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen

Zur Untersuchung der Rolle von CREB bei der vaskulären Kontraktilität, wurden die Wandspannungen isolierter Aortenringe von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen nach Zugabe vasoaktiver Substanzen in einem Gefäßmyographen nach Mulvany (Mulvany und Halpern 1977) gemessen.

3.4.1 Kalium- und Phenylephrin-Kontraktion

Eine Erhöhung der Kalium-Konzentration in der Messkammer führt, im vorliegenden Versuchsaufbau an isolierten Gefäßstücken, zu einer isometrischen Kontraktion. Die Kontraktionsfähigkeit der eingesetzten Aortenringe wurde daher zu Beginn des

Versuchs durch Stimulation mit dem Krebs-Henseleit-Puffer mit erhöhter Kaliumkonzentration (KCl 122,7 mM; KKHP) überprüft. Jeder myographischen Untersuchung mit einer vasokonstriktorisch oder vasodilatatorisch wirkenden Substanz ging daher eine Stimulation mit KKHP voraus. Die absoluten Wandspannungen der Kalium-Kontraktion spiegelten dabei die maximale Kontraktionsfähigkeit der Aorten wieder und dienten zusätzlich der Normierung der gemessenen Wandspannungen.

Die untersuchten Gruppen zeigten hinsichtlich der maximalen Wandspannungen nach Stimulation mit KKHP keinen statistisch signifikanten Unterschied (Kontrolle $1,8 \pm 0,2 \text{ mN/mm}^2$, gmCREB-KO $2,6 \pm 0,3 \text{ mN/mm}^2$, nicht signifikant) (Abb. 3.8, A links). Die glattmuskelzellspezifische Inaktivierung von CREB hatte keinen Einfluss auf die Kalium-vermittelte Vasokonstriktion.

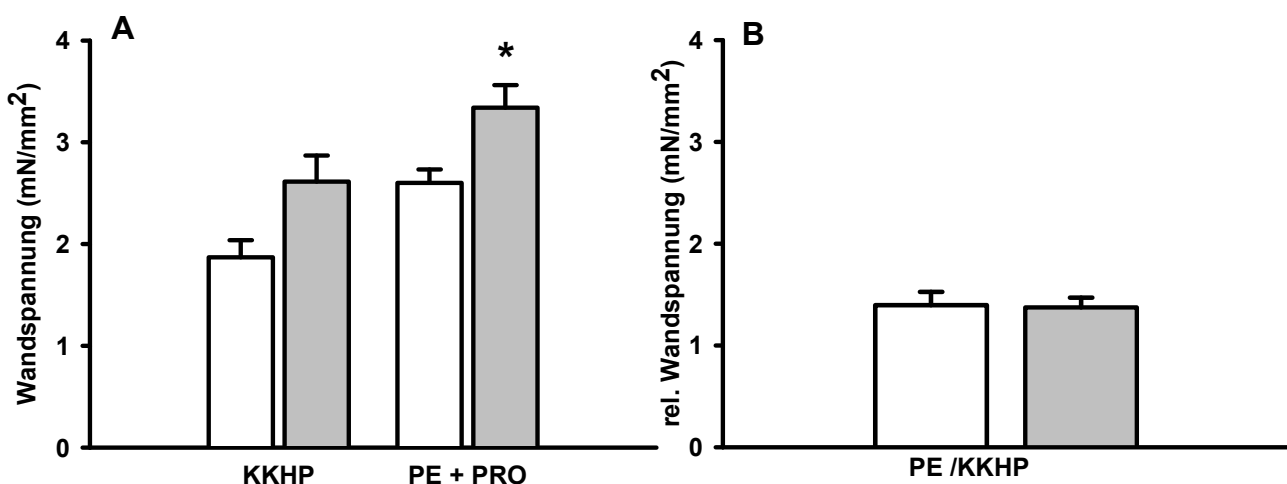


Abb. 3.8 Vasokonstriktion von Aortenringen von gmCREB-KO (graue Balken) und Kontrollmäusen (weiße Balken). Obwohl die Vasokonstriktion bei gmCREB-KO Mäusen nach Stimulation mit Phenylephrin (PE) und Propranolol (PRO) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe gesteigert war (A), zeigten die Kalium-korrigierten Wandspannungen (PE/KKHP) keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (B). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; Kontrolle $n=6$, gmCREB-KO $n=6$.

Die Stimulation mit Phenylephrin, einem α_1 -Adrenozeptor-Agonisten, bewirkt durch Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (G_q -Proteine) und Aktivierung der Phospholipase C eine Vasokonstriktion. Vor den myographischen Untersuchungen der Aortenringe mit den Vasodilatoren Nitroprussid-Natrium (SNP), Carbachol und Isoprenalin, erfolgte die einmalige Stimulation mit Phenylephrin ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$), da die Dilatation der Aortenringe aus dem basalen Spannungszustand (17 mN) ansonsten

schwer zu beurteilen wäre. Mit Ausnahme der Isoprenalin-vermittelten Vasodilatation wurden die Untersuchungen zusätzlich in Gegenwart von Propranolol (1×10^{-6} M) durchgeführt, um, trotz der Selektivität von Phenylephrin auf α -Adrenozeptoren, eine eventuelle Stimulation der β -Adrenozeptoren ausschließen zu können.

In Aortenringen von gmCREB-KO Mäusen wurde nach einmaliger Gabe von Phenylephrin und Propranolol (jeweils 1×10^{-6} M) eine gesteigerte Vasokonstriktion im Vergleich zu Aortenringen von Kontroll-Mäusen festgestellt (Kontrolle $2,6 \pm 0,3$ mN/mm², gmCREB-KO $3,3 \pm 2,2$ mN/mm², $p < 0,05$ vs. Kontrolle; Abb. 3.8, A rechts). Die Kalium-korrigierten maximalen Wandspannungen der Aortenringe von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen zeigten keine Unterschiede (Abb. 3.8 B).

3.4.2 Vasokonstriktion nach Stimulation mit Phenylephrin

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses der CREB-Inaktivierung auf die α_1 -Adrenozeptor-vermittelte Vasokonstriktion von Aortenringen erfolgte die Messung der Wandspannungen, anders als in der vorangegangenen Untersuchung unter 3.4.1, nach Stimulation mit steigenden Phenylephrin-Konzentrationen. Dabei wurde die Konzentration von Phenylephrin schrittweise von 1×10^{-9} M bis 1×10^{-5} M erhöht. Die Messungen wurden in Gegenwart von Propranolol (1×10^{-6} M) durchgeführt. In Abbildung 3.9 sind die absoluten und relativen Wandspannungen der Aortenringe von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen im Verlauf zur gesteigerten Phenylephrin-Konzentration, in Form einer Konzentrationswirkungskurve (KWK) dargestellt. Die sigmoidalen Verläufe der aufgetragenen Wandspannungen zeigten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

In der vorangegangenen Untersuchung wurde in Aortenringen von gmCREB-KO Mäusen eine gesteigerte Vasokonstriktion nach Stimulation mit 1×10^{-6} M Phenylephrin festgestellt (vgl. Abb. 3.8 A, links). Dieser Unterschied in der Vasokonstriktion konnte bei schrittweiser Erhöhung der Phenylephrin-Konzentration nicht bestätigt werden.

Die glattmuskelzellspezifische Inaktivierung von CREB hatte somit keinen Einfluss auf die Potenz von Phenylephrin bei der Vasokonstriktion.

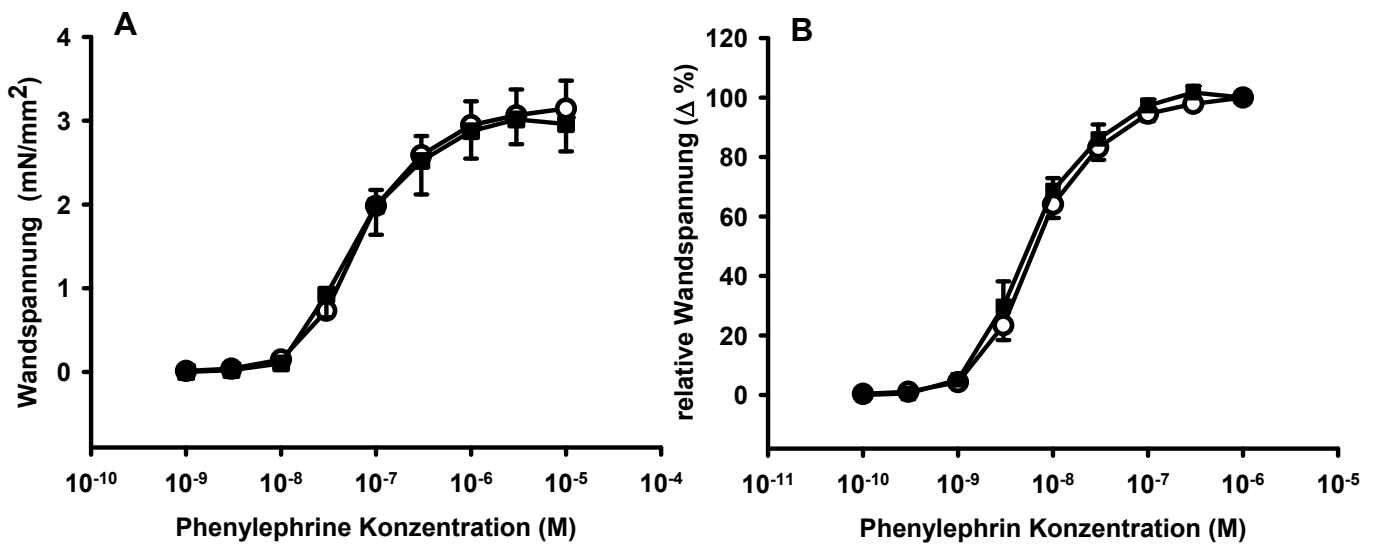


Abb. 3.9 Phenylephrin-vermittelte Vasokonstriktion bei gmCREB-KO (gefüllte Quadrate) und Kontroll-Mäusen (offene Kreise). In gefäßmyographischen Untersuchungen der Phenylephrin-vermittelten Vasokonstriktion zeigten die absoluten (A) und relativen Wandspannungen (B) zwischen den untersuchten Gruppen keine Unterschiede. Kontrolle n=3, gmCREB-KO n=3.

3.4.3 Vasodilatation nach Stimulation mit Nitroprussid-Natrium (Sodium nitroprusside; SNP)

Nitroprussid-Natrium (SNP) führt zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). NO aktiviert die Guanylatzyklase, wodurch es zur Erhöhung des cGMP-Spiegels und schließlich zur Relaxation der Glattmuskelzellen kommt.

Für die gefäßmyographischen Untersuchungen der Vasorelaxation nach Stimulation mit SNP, wurden die Wandspannungen der Aortenringe nach schrittweiser Erhöhung der SNP-Konzentration von 1×10^{-11} M bis 3×10^{-6} M gemessen und in Form einer Konzentrationswirkungskurve dargestellt (Abb. 3.10).

Die sich ergebenden sigmoidalen Verläufe der Kurven zeigten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Die glattmuskelzellspezifische Inaktivierung von CREB hatte keinen Einfluss auf die Potenz von SNP hinsichtlich der Relaxation.

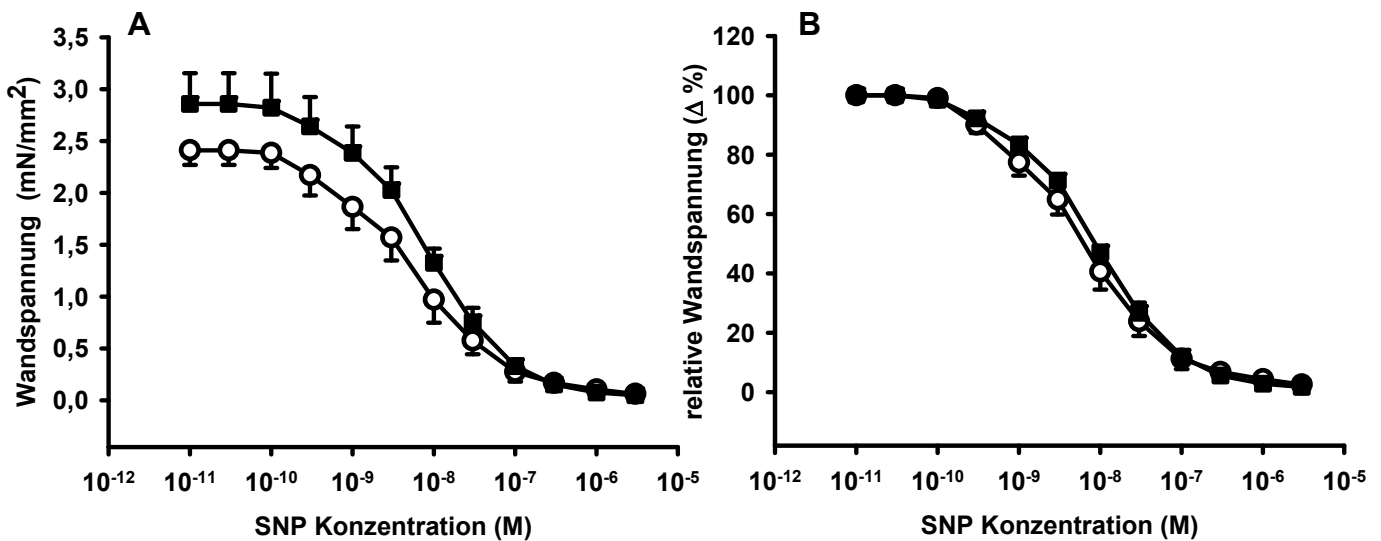


Abb. 3.10 NO-vermittelte Vasodilatation bei gmCREB-KO (gefüllte Quadrate) und Kontroll-Mäusen (offene Kreise). In gefäßmyographischen Untersuchungen der NO-vermittelten Vasodilatation zeigten die absoluten (A) und relativen Wandspannungen (B) zwischen den untersuchten Gruppen keine Unterschiede. Kontrolle n=3, gmCREB-KO n=3.

3.4.4 Vasodilatation nach Stimulation mit Carbachol

Weitere Untersuchungen der NO-vermittelten Vasodilatation erfolgten durch Stimulation mit Carbachol, welches die Freisetzung des ERDFs (endothelial derived relaxin factor, NO) aus den Endothelzellen vermittelt. NO bewirkt durch Stimulation der löslichen Guanylatzyklase die Relaxation der Glattmuskelzellen (Furchgott und Zawadzki 1980; Bolton und Clapp 1986). Die Wandspannungen der Aortenringe wurden nach schrittweiser Erhöhung der Carbachol-Konzentration von 1×10^{-9} M auf 1×10^{-4} M gemessen und in Form einer Konzentrationswirkungskurve dargestellt (Abb. 3.11). Anhand der Verläufe der Konzentrationswirkungskurven konnte bei Aorten von gmCREB-KO Mäusen eine verminderte Effektivität von Carbachol hinsichtlich der Relaxation, im Vergleich zu Aorten von Kontroll-Mäusen, festgestellt werden.

Um zu überprüfen, ob neben der verminderten Effektivität auch eine veränderte Potenz von Carbachol bei gmCREB-KO Mäusen vorliegt, wurden die IC_{50} -Werte der Carbachol-KWKs berechnet (Abb. 3.12). Der IC_{50} -Wert stellt die mittlere inhibitorische Konzentration dar, bei der eine halbmaximale Inhibition erreicht wurde.

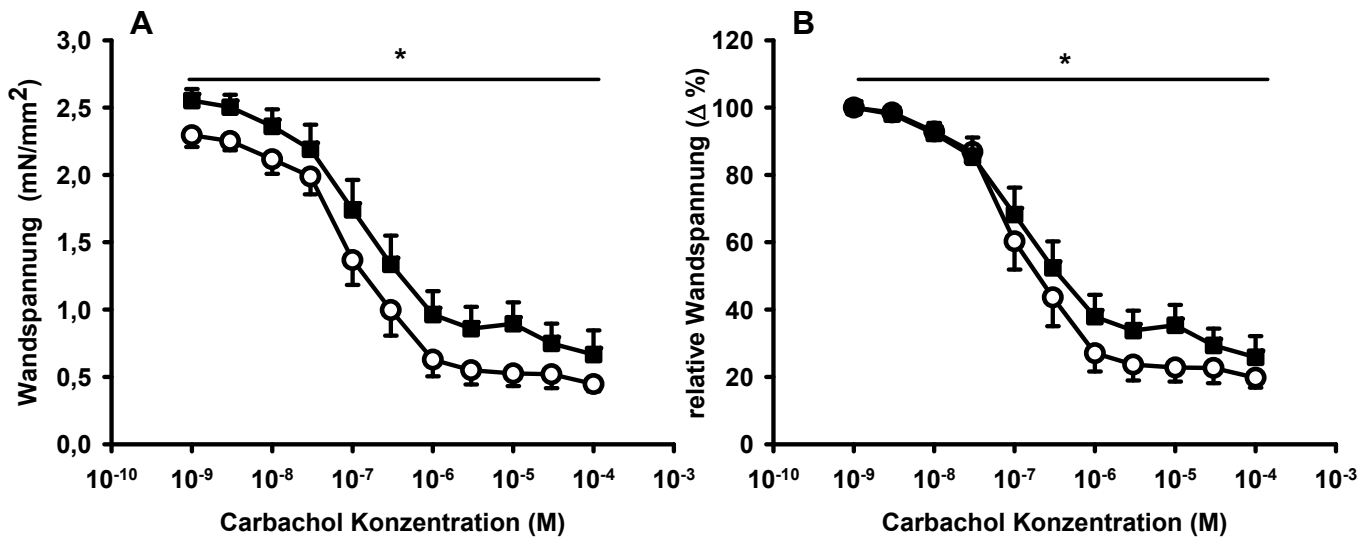


Abb. 3.11 Vasodilatation bei gmCREB-KO (gefüllte Quadrate) und Kontroll-Mäusen (offene Kreise). In gefäßmyographischen Untersuchungen konnte an Aorten von Mäusen mit Inaktivierung von CREB, im Vergleich zur Kontrolle eine verminderte Effektivität von Carbachol hinsichtlich der Relaxation festgestellt werden. Two-way ANOVA Repeated Measures * $p < 0,05$ gmCREB-KO vs. Kontrolle, post-hoc Tests nicht signifikant. Kontrolle $n=6$, gmCREB-KO $n=6$.

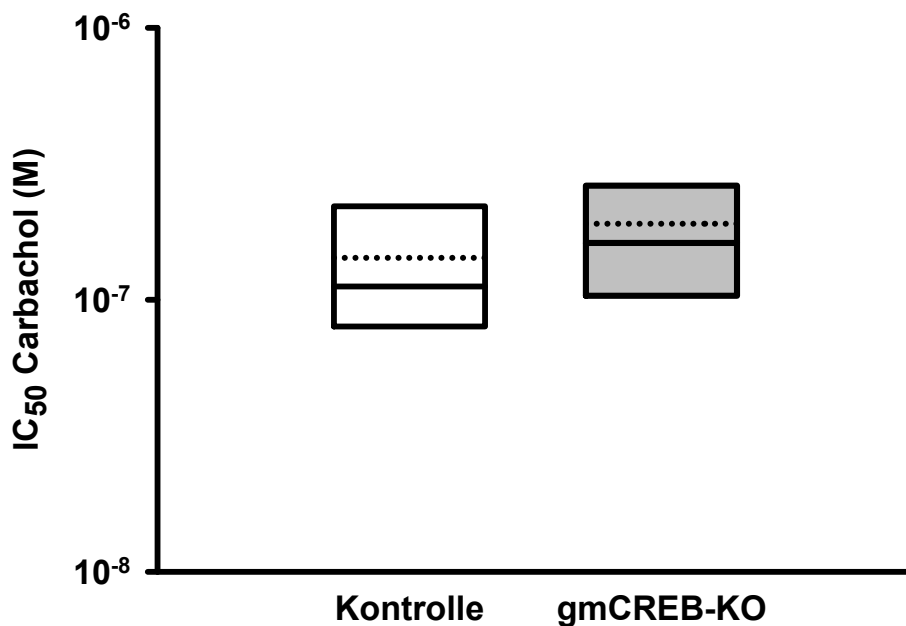


Abb. 3.12 Boxplotdarstellung der IC₅₀-Werte aus den Carbachol-KWKs. Aorten von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen zeigten in der Relaxation nach Stimulation mit Carbachol keine Unterschiede in den IC₅₀-Werten. — Median, ••• Mittelwert; Kontrolle $n=6$, gmCREB-KO $n=6$.

Zwischen den untersuchten Gruppen konnten keine Unterschiede in den mittleren IC₅₀-Werten festgestellt werden (Kontrolle: mittlerer IC₅₀-Wert 0,09 μM (Konfidenzintervall (KI) 95% 0,04 – 0,18 μM); gmCREB-KO: mittlerer IC₅₀-Wert 0,09

μM (KI 95% 0,03 – 0,23 μM)). Eine Verminderung der Potenz von Carbachol hinsichtlich der Relaxation lag somit bei Aorten von gmCREB-KO Mäusen nicht vor.

3.4.5 Vasodilatation nach Stimulation mit Isoprenalin

Die Bindung von Isoprenalin (ISO) an β_2 -Adrenozeptoren der Glattmuskelzellen führt über die Aktivierung der Adenylatzyklase zu einem Anstieg von cAMP in der Zelle, wodurch es schließlich zur Relaxation kommt (siehe Einleitung). In gefäßmyographischen Untersuchungen der Isoprenalin-vermittelten Vasodilatation, wurden die Wandspannungen nach schrittweiser Erhöhung der Isoprenalin-Konzentration von 1×10^{-9} M bis 3×10^{-4} M bestimmt und in Form einer Konzentrationswirkungskurve dargestellt (Abb. 3.13).

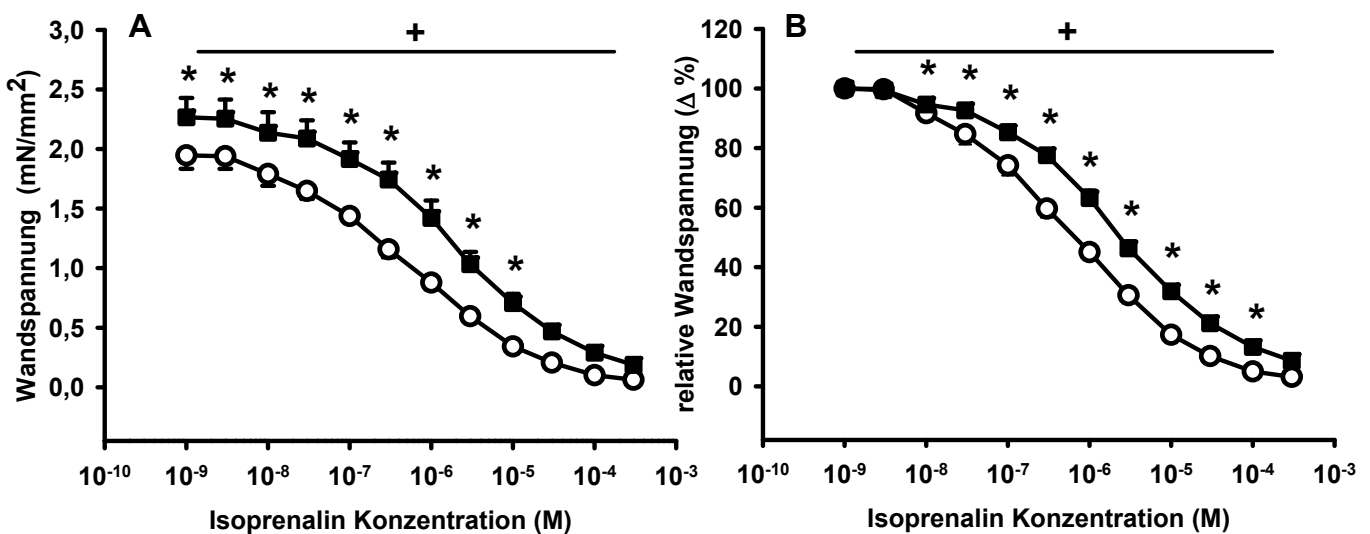


Abb. 3.13 β -Adrenozeptor-vermittelte Vasodilatation bei gmCREB-KO (gefüllte Quadrate) und Kontroll-Mäusen (offene Kreise). In gefäßmyographischen Untersuchungen konnte bei Aorten von Mäusen mit einer Inaktivierung von CREB, im Vergleich zur Kontrolle, eine verminderte Effektivität von Isoprenalin bei der Relaxation festgestellt werden. Two-way ANOVA Repeated Measures + $p < 0,05$ vs. Kontrolle, post-hoc Test * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. Kontrolle $n=6$, gmCREB-KO $n=6$.

Anhand der Verläufe der Konzentrationswirkungskurven konnte, mit steigender Isoprenalin-Konzentration, eine verminderte Effektivität von Isoprenalin hinsichtlich der Relaxation der Aorten von gmCREB-KO Mäusen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe festgestellt werden.

Der mittlere IC_{50} -Wert der Isoprenalin-KWKs war bei Mäusen mit glattmuskelzellspezifischer CREB-Inaktivierung (mittlerer IC_{50} -Wert 1,74 μM (KI 95%

1,15 – 2,64 μM) $p < 0,05$ vs. Kontrolle) im Vergleich zum mittleren IC_{50} -Wert der Kontroll-Mäuse (mittlerer IC_{50} -Wert 0,47 μM (KI 95% 0,20 – 1,11 μM)) signifikant erhöht (Abb. 3.14). Daher ist von einer verminderten Potenz von Isoprenalin hinsichtlich der Relaxation der Aorten von gmCREB-KO Mäusen auszugehen.

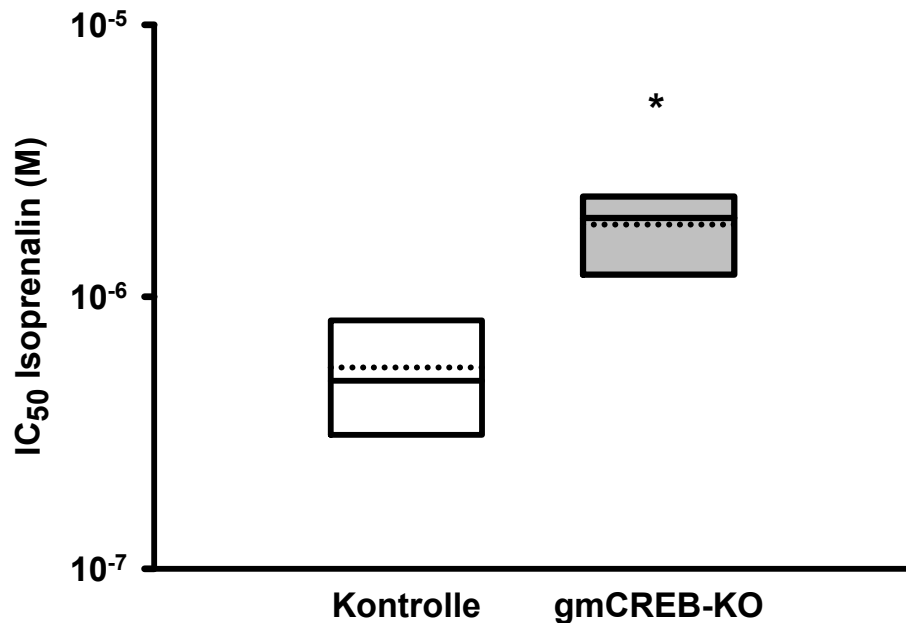


Abb. 3.14 Boxplotdarstellung der IC_{50} -Werte aus den Isoprenalin-KWKs. Eine verminderte Potenz von Isoprenalin hinsichtlich der Relaxation wurde anhand einer signifikanten Erhöhung der IC_{50} -Werte aus den Isoprenalin-KWKs an Aorten von gmCREB-KO Mäusen im Vergleich zur Kontrolle-Gruppe nachgewiesen. * $p < 0,05$; — Median, ••• Mittelwert; Kontrolle $n=6$, gmCREB-KO $n=6$.

Um auszuschließen, dass die verminderte Potenz von Isoprenalin auf die Behandlung der gmCREB-KO Mäuse mit Tamoxifen zurückzuführen war, wurden C57Bl6-Mäuse, analog zu den gmCREB-KO Mäusen, mit Tamoxifen und Neutralöl behandelt und gefäßmyographisch untersucht (Abb. 3.15). Zwischen den gemessenen Wandspannungen der Aortenringe Tamoxifen- und Neutralöl-behandelter C57Bl6-Mäuse konnten keine Unterschiede in der Relaxation nach Stimulation mit Isoprenalin festgestellt werden. Die mittleren IC_{50} -Werte aus den Isoprenalin-KWKs (Abb. 3.16) zeigten ebenfalls keine Unterschiede nach Behandlung mit Tamoxifen (mittlerer IC_{50} -Wert 1,03 μM (KI 95% 0,40 – 2,63 μM)) bzw. Neutralöl (mittlerer IC_{50} -Wert 0,77 μM (KI 95% 0,27 – 2,23 μM)).

Die Tamoxifen-Behandlung hatte bei C57Bl6-Mäusen somit keinen Einfluss auf die Effektivität und Potenz von Isoprenalin hinsichtlich der Relaxation.

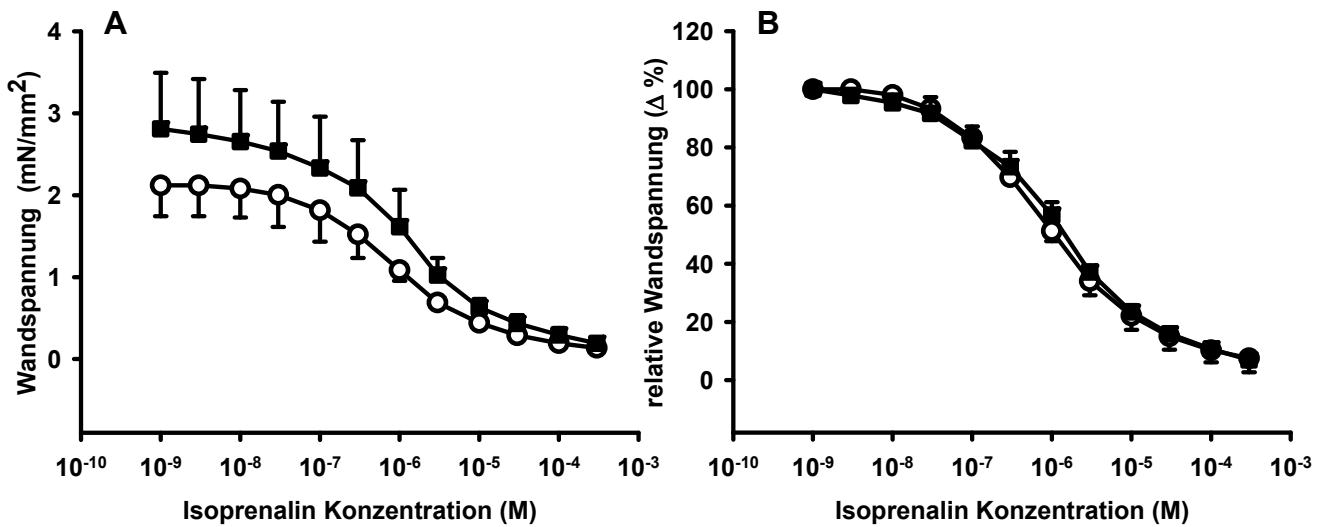


Abb. 3.15 β -Adrenozeptor-vermittelte Vasodilatation in Aorten Tamoxifen- (gefüllte Quadrate) und Neutralöl-behandelter (offene Kreise) C57Bl6-Mäuse nach Stimulation mit Isoprenalin. Die absoluten (A) und relativen Wandspannungen (B) der Aorten von C57Bl6-Mäusen mit Tamoxifen- bzw. Neutralöl-Behandlung zeigten keine Unterschiede in der Relaxation nach Stimulation mit Isoprenalin. Neutralöl-Behandlung n=3, Tamoxifen-Behandlung n=3.

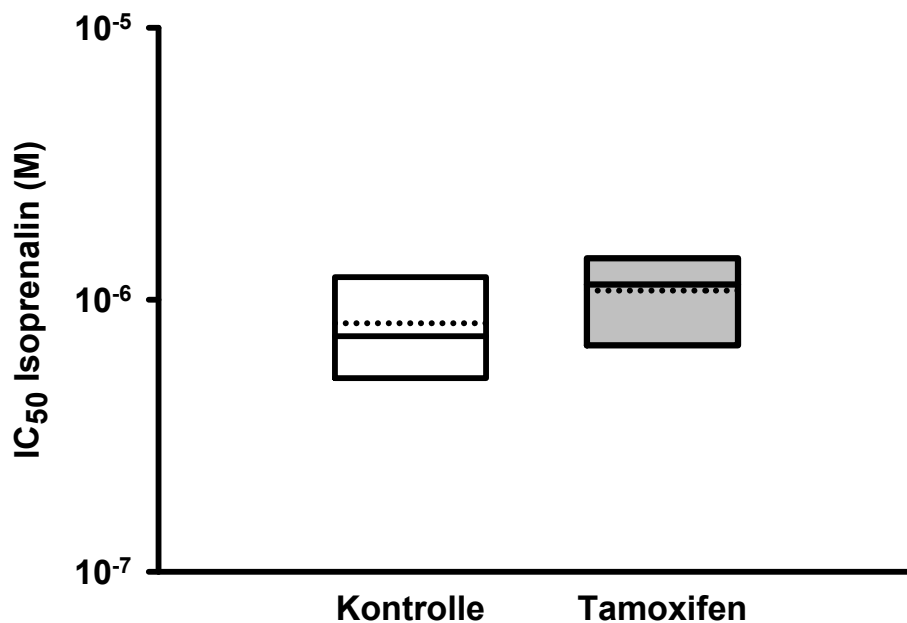


Abb. 3.16 Boxplotdarstellung der IC₅₀-Werte aus den Isoprenalin-KWKs. In gefäßmyographischen Messungen wiesen die IC₅₀-Werte der Isoprenalin-KWKs Tamoxifen- bzw. Neutralöl- (Kontrolle) behandelte C57Bl6-Mäuse keine Unterschiede auf. — Median, ••• Mittelwert; Kontroll-Behandlung n=3, Tamoxifen-Behandlung n=3.

3.4.6 Vasodilatation nach Stimulation mit Forskolin

Um den Einfluss des cAMP-abhängigen Signalwegs auf die Relaxation der Aortenringe näher zu charakterisieren, wurde weiterhin ein Effekt der direkten Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin untersucht. Dadurch konnten funktionelle Mechanismen untersucht werden, die in der Betrachtung des Signalwegs unterhalb des β -Adrenozeptors liegen. Die gefäßmyographische Messung der Wandspannungen der Aortenringe von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen erfolgte nach schrittweiser Erhöhung der Forskolin-Konzentration von 1×10^{-10} M auf eine Endkonzentration von 3×10^{-6} M (Abb. 3.17).

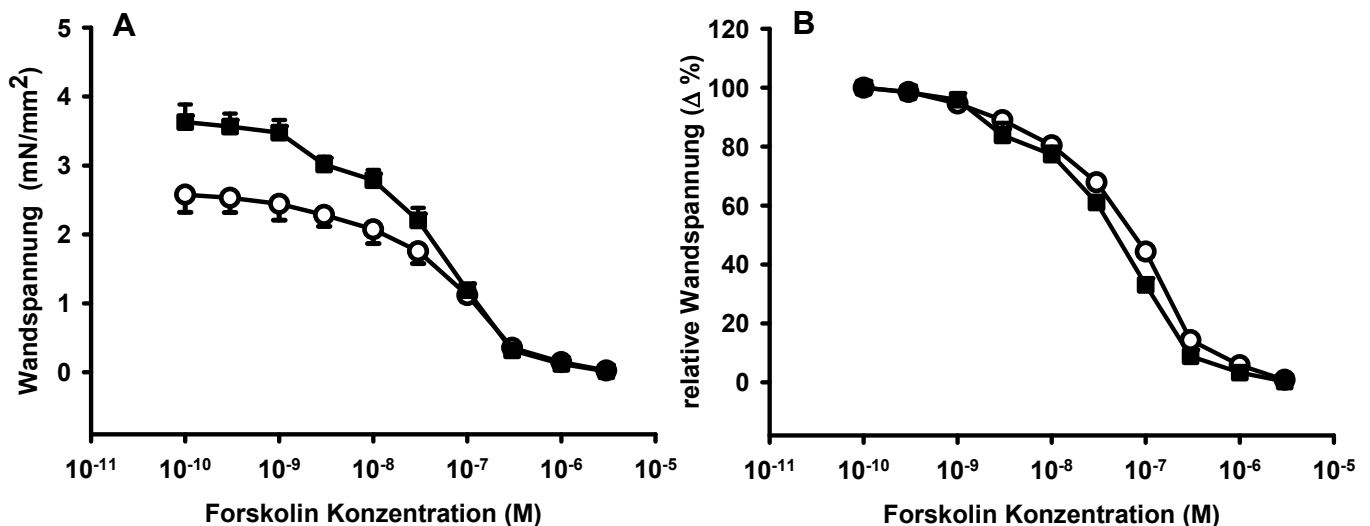


Abb. 3.17 Forskolin-vermittelte Vasodilatation in Aorten von gmCREB-KO (gefüllte Quadrate) und Kontroll-Mäusen (offene Kreise). Die gefäßmyographischen Untersuchungen zeigten in den absoluten (A) und relativen Wandspannungen (B) nach Stimulation mit Forskolin keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Kontrolle n=3, gmCREB-KO n=3.

Die Kurvenverläufe der Wandspannungen zeigten nach Stimulation mit Forskolin keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

Die Inaktivierung von CREB hatte keinen Einfluss auf die Potenz von Forskolin hinsichtlich der Relaxation.

3.5 Untersuchungen zum Gefäßumbau („vaskuläres Remodeling“)

3.5.1 Ligation der Arteria carotis bei gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen

Das Modell der Carotis-Ligation an Mäusen umfasst das vollständige Abbinden der rechten sowie die Schein-Operation der linken A. carotis. Das Abbinden führt zu einer Verletzung des Gefäßes, wodurch es zur Bildung einer Neointima kommen kann (siehe Einleitung). Der Eingriff wurde bei gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen unter einer Isofluran- und Distickstoffmonoxid- (N₂O; Lachgas) Anästhesie durchgeführt. 3 Wochen nach Ligation wurden die ligierten und scheinoperierten Carotisarterien entnommen und die Bildung der Neointima in den angefertigten Gefäßquerschnitten analysiert.

3.5.1.1 Quantifizierung der Neointimabildung

Um die Ausdehnung der Neointima ins Lumen und im Gefäßverlauf proximal zur Ligation bewerten zu können, wurden Gefäßschnitte verglichen, die in einem definierten Abstand zur Ligation (0, 200 und 400 µm) angefertigt wurden. Abbildung 3.18 zeigt Beispiele einer kombinierten Elastika-Zellkern-Färbung mit Resorcin-Fuchsin nach Weigert und Kernechtrot-Färbung, in Gefäßschnitten von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen, im Zentrum der Neointimabildung. Die Bildung einer Neointima in ligierten Gefäßen konnte bei beiden Gruppen beobachtet werden. Die scheinligierten Carotisarterien zeigten dagegen keine Neointimabildung.

In der quantitativen Auswertung gefärbter Gefäßschnitte von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen zeigte die Fläche der Neointima keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Abb. 3.19, A). Die Fläche der Media (Abb. 3.19, B) war ebenfalls sowohl zwischen den untersuchten Gruppen als auch zwischen ligierten und scheinligierten (sham) Carotisarterien nicht unterschiedlich. Die Inaktivierung von CREB bewirkte keine Veränderungen in der Neointimabildung und der Fläche der Media.

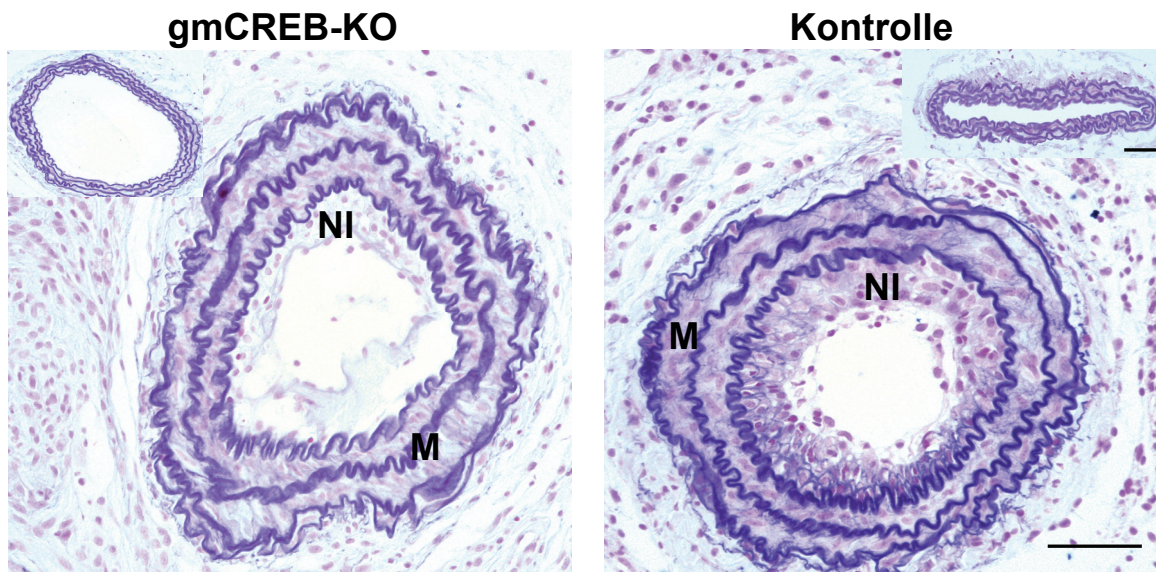


Abb. 3.18 Resorcin-Fuchsin und Kernechtrot-Färbung in Gefäßschnitten nach Ligation der A. carotis. Die Bildung einer Neointima (NI) erfolgte verletzungsbedingt durch Ligation der A. carotis bei gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen (große Bilder). Die scheinoperierten Carotisarterien (kleine Bilder) wiesen keine Neointimabildung auf. In der Färbung der Gefäßschnitte sind die elastischen Membranen in blau und die Zellkerne in rot dargestellt. M, Media; Größenbalken 50 μm .

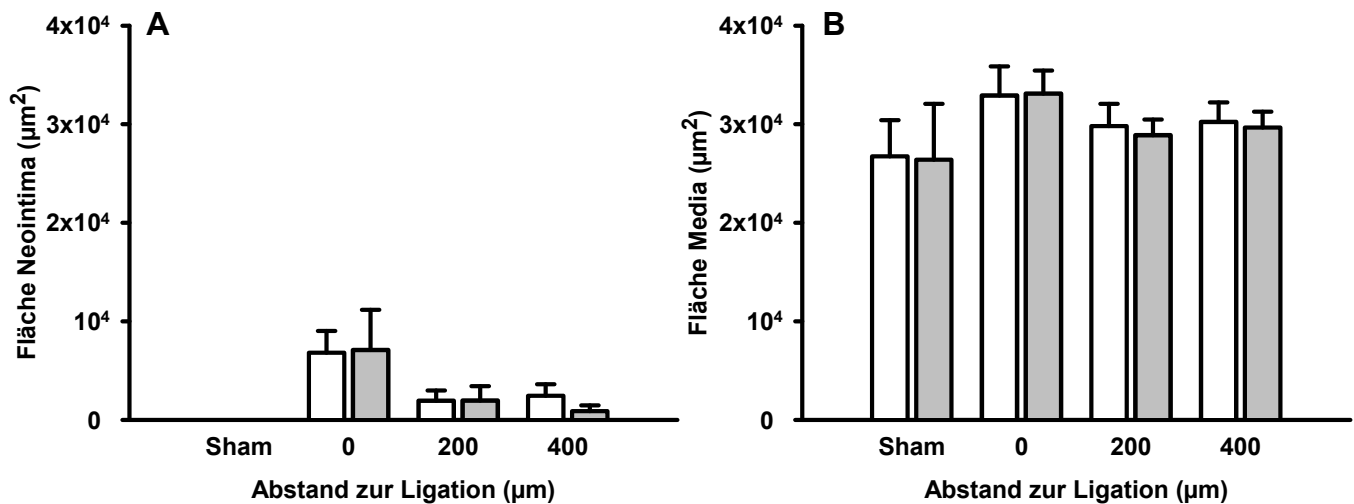


Abb. 3.19 Fläche von Neointima und Media nach Ligation der A. carotis bzw. Schein-Operation (sham). Die Neointimabildung nach Ligation der A. carotis bei gmCREB-KO (graue Balken) und Kontroll-Mäusen (weiße Balken) war zwischen den untersuchten Gruppen nicht verschieden (A). Auch in Bezug auf die Fläche der Media (B) konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die scheinoperierten Arterien beider Gruppen wiesen keine Neointimabildung auf. gmCREB-KO n=11; Kontrolle n=12.

3.5.1.2 Nachweis der CREB-Inaktivierung in der Neointima

CREB-spezifische Immunfluoreszenzfärbungen an Gefäßschnitten ligierter Carotisarterien von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen dienten der Überprüfung der glattmuskelzellspezifischen CREB-Inaktivierung in den Zellen der Neointima (Abb. 3.20).

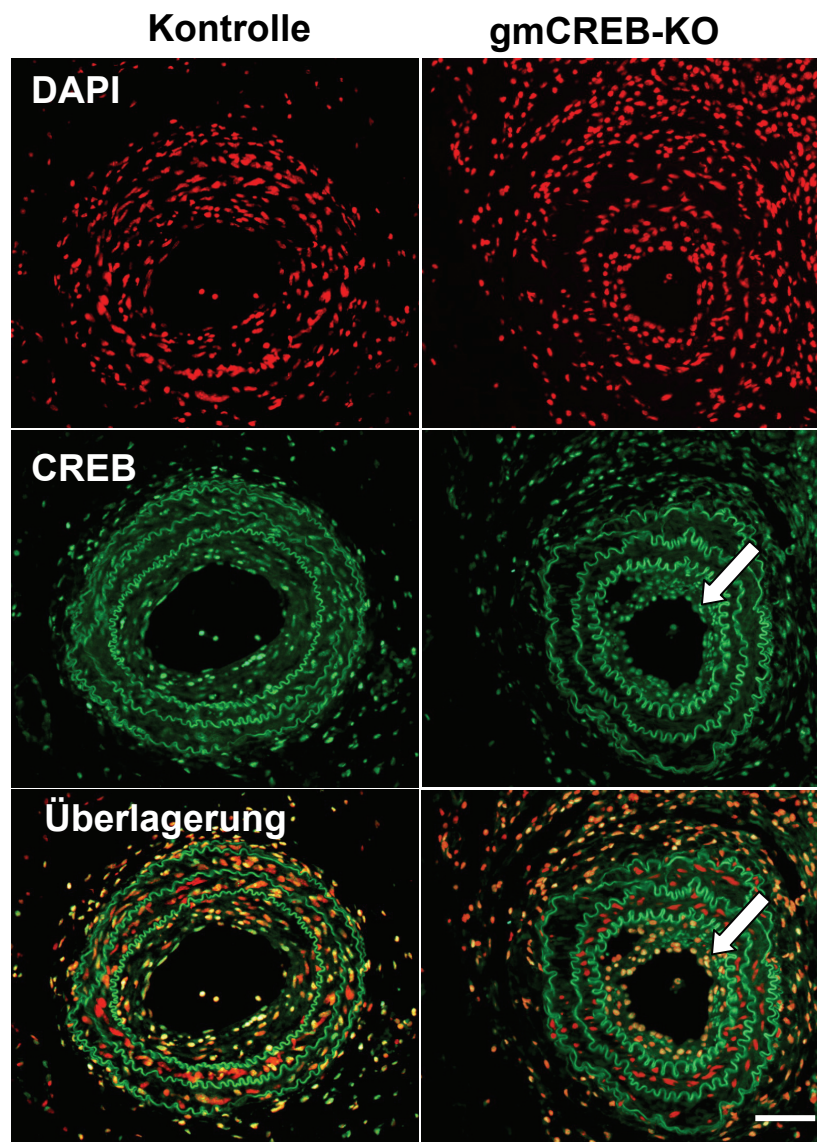


Abb. 3.20 Immunhistologischer Nachweis von CREB in der Neointima nach Ligation der A. carotis. Dargestellt sind die Fluoreszenzaufnahmen der DAPI-Zellkernfärbungen (rot dargestellte Zellkerne) und der CREB-spezifischen Immunfluoreszenzfärbungen (grüne Fluoreszenz) an Gefäßschnitten ligierter Carotisarterien von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen. In Gefäßschnitten von Kontroll-Mäusen waren alle Zellkerne in Media und Neointima sowie die Zellkerne der Endothelzellen und der Zellen des umliegenden Gewebes ausschließlich CREB-positiv. In den Zellkernen der Media von gmCREB-KO Mäusen wurde CREB erwartungsgemäß nicht nachgewiesen. Die Zellkerne der Neointima waren dagegen CREB-positiv (Pfeile). Größenbalken 50 µm.

In ligierten Carotisarterien Neutralöl-behandelter Kontroll-Mäuse konnte CREB, neben den Zellkernen der Neointima, erwartungsgemäß auch in der Media sowie in Endothelzellen und Zellen des umliegenden Gewebes nachgewiesen werden. In der Media der Carotisarterien von gmCREB-KO Mäusen wurde CREB nicht nachgewiesen. Die erfolgreiche, glattmuskelzellspezifische CREB-Inaktivierung konnte daher, analog zu den Untersuchungen von 3.1, bestätigt werden. In der Neointima derselben Mäuse waren allerdings alle DAPI-gefärbten Zellkerne ebenfalls CREB-positiv (siehe Pfeil Abb. 3.20).

3.5.2 Atherosklerotische Plaquebildung bei gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen mit gleichzeitiger Inaktivierung von ApoE

Für die Liganden-aktivierte Deletion des *Creb*-Gens in der Linie gmCREB-KO x ApoE-KO wurden Mäuse, analog zu den bisherigen Versuchen, mit Tamoxifen bzw. Neutralöl behandelt. Zur Steigerung der atherosklerotischen Plaquebildung wurden Mäuse beider Genotypen über 30 Wochen ausschließlich mit einer fettreichen, atherogenen Spezialdiät gefüttert. Neben der atherosklerotischen Plaquebildung wurden Gewichtszunahme und Serumlipidspiegel nach erfolgter Spezialdiät analysiert.

3.5.2.1 Analyse der Gewichtszunahme und Serumlipidspiegel nach atherogener Spezialdiät

Das Gewicht von gmCREB-KO x ApoE-KO und ApoE-KO Kontroll-Mäusen wurde jeweils vor Versuchsbeginn (ApoE-KO: $23,4 \pm 0,6$ g; gmCREB-KO x ApoE-KO: $21,5 \pm 0,5$ g) und nach der Spezialdiät (ApoE-KO: $37,8 \pm 1,9$ g; gmCREB-KO x ApoE-KO: $37,3 \pm 1,4$ g) bestimmt. Die absoluten Gewichtszunahmen (Abb. 3.21) zeigten zwischen den untersuchten Gruppen, als Folge der atherogenen Spezialdiät, keine Unterschiede. Die Inaktivierung von CREB hatte keinen Einfluss auf die Gewichtszunahme.

Die Analyse der Serumlipide diente dem Ausschluss einer Hypercholesterinämie, die einen starken Einfluss auf die Bewertung der atherosklerotischen Plaquebildung hätte. Für die Analyse der Serumlipide wurde den Mäusen nach erfolgter Spezialdiät, *post mortem* Blut entnommen.

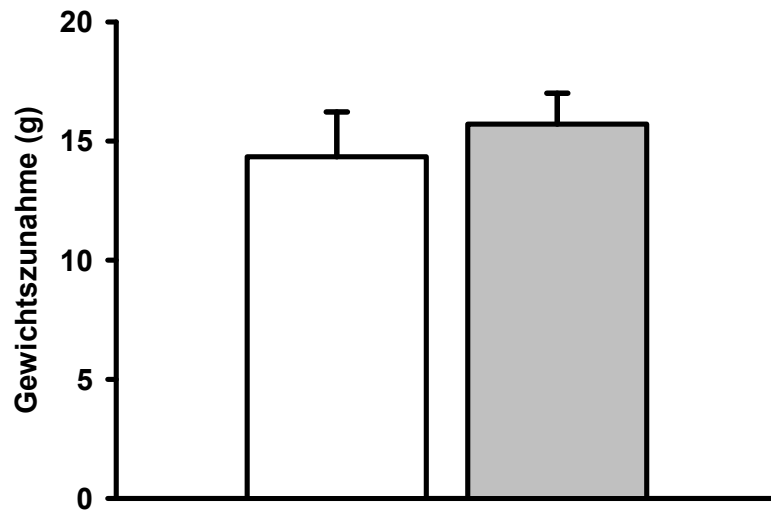


Abb. 3.21 Absolute Gewichtszunahme nach 30 Wochen atherogener Spezialdiät bei ApoE-KO (weiße Balken) und gmCREB-KO x ApoE-KO Mäusen (graue Balken). Zwischen den untersuchten Gruppen konnten keine Unterschiede in der Gewichtszunahme festgestellt werden. ApoE-KO n=11, gmCREB-KO x ApoE-KO n=7.

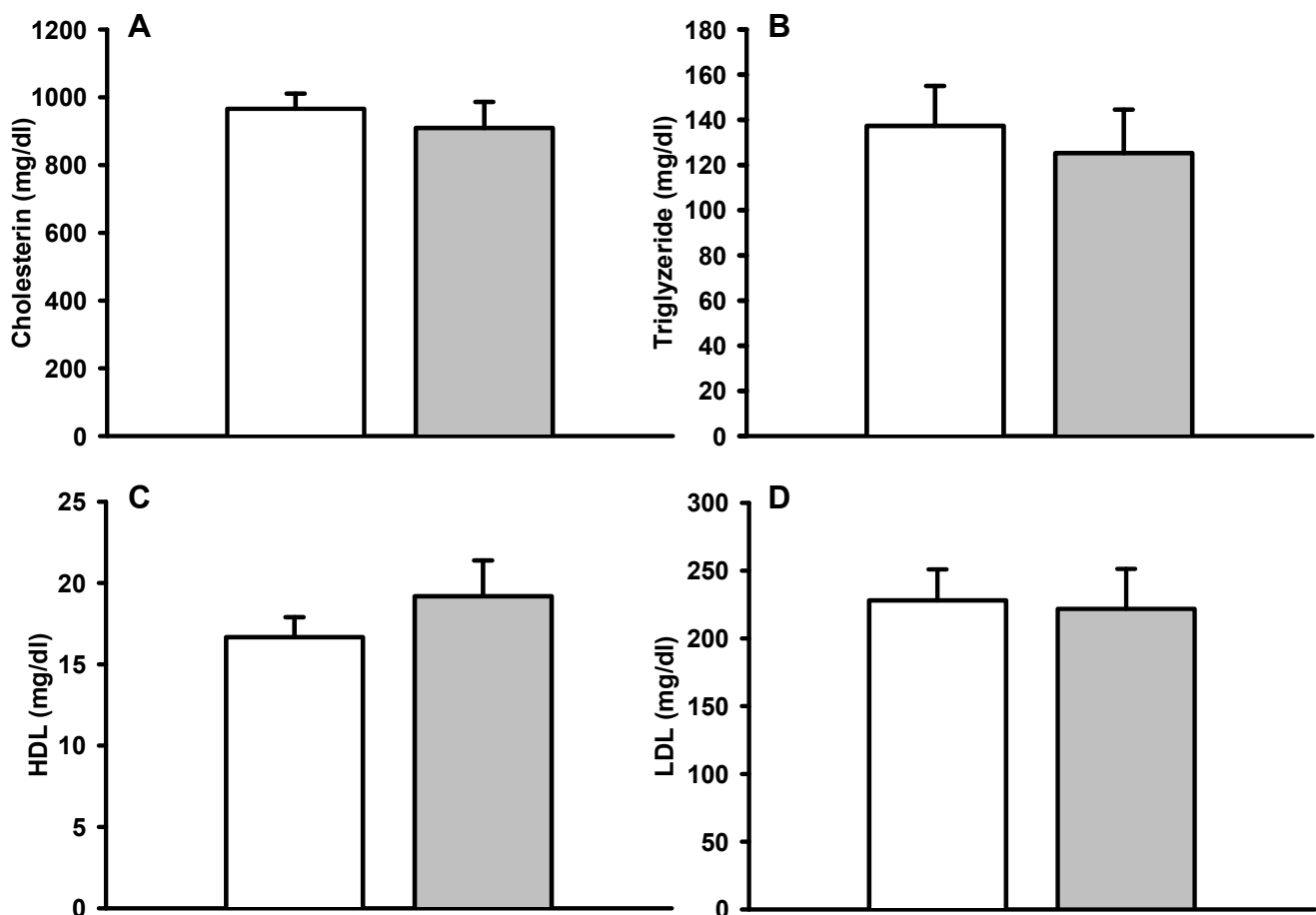


Abb. 3.22 Analysen der Serumlipidspiegel nach 30 Wochen atherogener Spezialdiät. gmCREB-KO x ApoE-KO (graue Balken) und ApoE-KO-Kontroll-Mäuse (weiße Balken) zeigten nach 30 Wochen atherogener Spezialdiät keine Unterschiede in den Serumspiegeln der Gesamt-Cholesterin (A), Triglyzeride (B), HDL- (C) und LDL-Cholesterin (D); gmCREB-KO x ApoE-KO n=7, ApoE-KO n=11.

Die Bestimmung von Gesamt-Cholesterin, Triglyzeriden, HDL (high-density-lipoprotein) und LDL (low-density-lipoprotein)-Cholesterin erfolgte aus dem gewonnenen Serum im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster (Abb. 3.22). Die Serumspiegel des Gesamt-Cholesterins, der Triglyzeride und der HDL- und LDL-Cholesterine zeigten zwischen den untersuchten Gruppen keine Unterschiede. Die Inaktivierung von CREB hatte keinen Einfluss auf die Serumlipidspiegel.

3.5.2.2 Quantitative Analyse der Plaques mittels Oil-red-O-Färbung

Die Anfärbung lipidreicher Flächen und Plaques von Aorten erfolgte mittels Oil-red-O Färbung. In Abbildung 3.23 sind Beispiele Oil-red-O-gefärbter Aorten von gmCREB-KO x ApoE-KO und ApoE-KO Mäusen nach 30 Wochen atherogener Spezialdiät dargestellt.

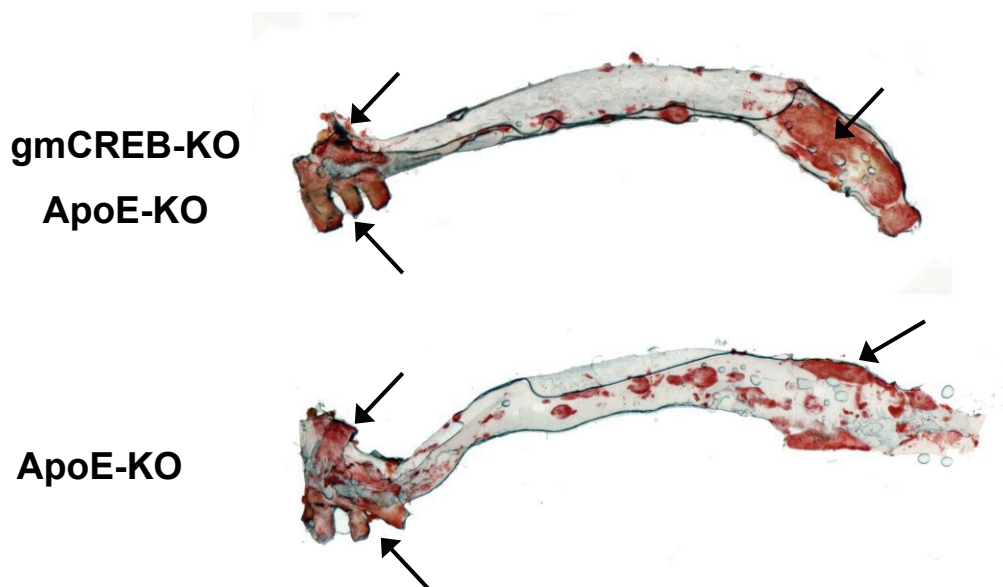


Abb. 3.23 Oil-red-O-Färbung atherosklerotischer Aorten nach 30 Wochen atherogener Spezialdiät. Die atherosklerotischen Plaques in Aorten von gmCREB-KO x ApoE-KO und ApoE-KO Mäusen wurden mittels Oil-red-O-Färbung rot dargestellt. Die meisten Plaques konnten im Bereich des Aortenbogens, den Abgängen der Carotisarterien und im distalen Bereich der abdominalen Aorta nachgewiesen werden (Pfeile).

Die meisten atherosklerotischen Plaques wurden dabei im Bereich des Aortenbogens, den Abgängen der Carotisarterien und im distalen Bereich der abdominalen Aorta nachgewiesen (Pfeile Abb. 3.23).

Die Quantifizierung der Oil-red-O Plaque-Färbungen (Abb. 3.24) zeigte einen signifikant erhöhten Anteil lipidreicher Flächen in Aorten von gmCREB-KO x ApoE-KO Mäusen ($22,3 \pm 2,1$ %) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($16,2 \pm 1,5$ %). Dieser Befund lässt auf einen erhöhten Anteil atherosklerotischer Plaques in Aorten der gmCREB-KO x ApoE-KO Mäuse schließen.

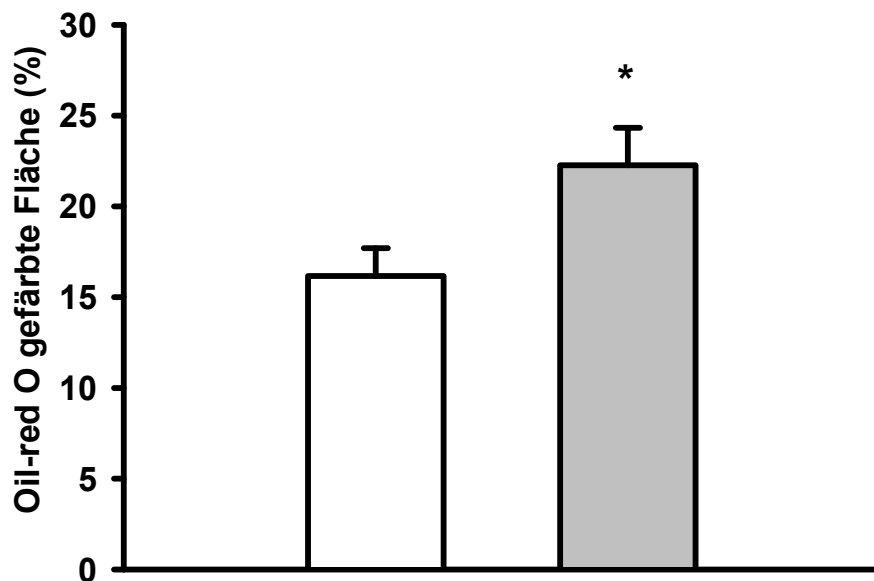


Abb. 3.24 Quantifizierung der Oil-red-O Lipidfärbung in Aorten von ApoE-KO (weiße Balken) und gmCREB-KO x ApoE-KO Mäusen (graue Balken). Aorten von Mäusen mit glattmuskelspezifischer CREB-Inaktivierung zeigten, im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, nach 30 Wochen atherogener Spezialdiät einen gesteigerten Anteil Oil-red-O gefärbter, atherosklerotischer Flächen. gmCREB-KO x ApoE-KO n=7, ApoE-KO n=11; *p<0,05 vs. ApoE-KO.

4 Funktion des Transkriptionsfaktors CREM

4.1 Untersuchungen zum Gefäßumbau („vaskuläres Remodeling“)

4.1.1 Atherosklerotische Plaquebildung bei CREM-KO und WT-Mäusen mit gleichzeitiger Inaktivierung von ApoE

Mäuse der Tierlinie CREM-KO x ApoE-KO wurden zur Steigerung der atherosklerotischen Plaquebildung, analog zu den Untersuchungen an gmCREB-KO x ApoE-KO und ApoE-KO Kontroll-Mäusen, über 20 bis 40 Wochen mit einer fettreichen, atherogenen Spezialdiät gefüttert. Zusätzlich wurden Gewichtszunahme und Serumlipidspiegel nach erfolgter Diät analysiert.

4.1.1.1 Analyse der Gewichtszunahme und der Serumlipidspiegel nach atherogener Spezialdiät

Das Ausgangsgewicht von CREM-KO x ApoE-KO und ApoE-KO Kontroll-Mäusen wurde vor Versuchsbeginn bestimmt (ApoE-KO, n=63: $22,8 \pm 0,3$ g; CREM-KO x ApoE-KO, n=60: $23,0 \pm 0,4$ g).

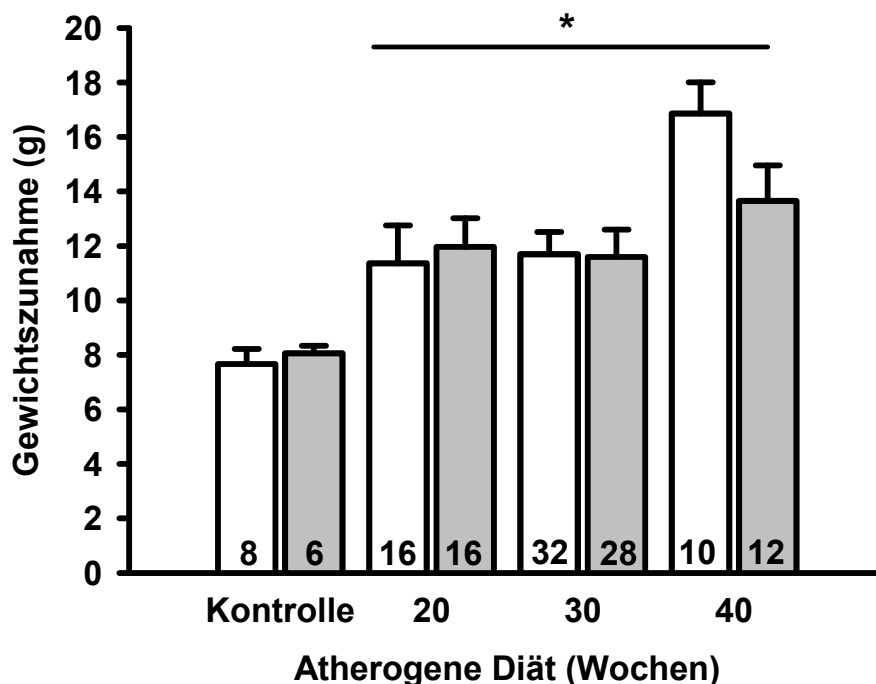


Abb. 4.1 Absolute Gewichtszunahme nach 20, 30 und 40 Wochen atherogener Spezialdiät bei ApoE-KO (weiße Balken) und CREM-KO x ApoE-KO Mäusen (graue Balken). Die atherogene Spezialdiät führte bei beiden Gruppen zu einer gesteigerten Gewichtszunahme im Vergleich zur Standardfütterung über 30 Wochen (* $p < 0,05$). Die Gewichtszunahme unterschied sich zwischen den CREM-KO x ApoE-KO und den ApoE-KO Mäusen nicht.

Die Fütterung der atherogenen Spezialdiät über 20, 30 und 40 Wochen bewirkte bei beiden Genotypen eine gesteigerte Gewichtszunahme im Vergleich zur Standardfütterung (30 Wochen) (Abb. 4.1). Die Inaktivierung von CREM führte zu keinen Unterschieden in der Gewichtszunahme.

Nach Fütterung der Spezialdiät über 40 Wochen, wurde die Bestimmung der Serumspiegel von Gesamt-Cholesterin, Triglyzeriden, HDL- (high-density-lipoprotein) und LDL-Cholesterinen (low-density-lipoprotein) im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster durchgeführt (Abb. 4.2 A-D).

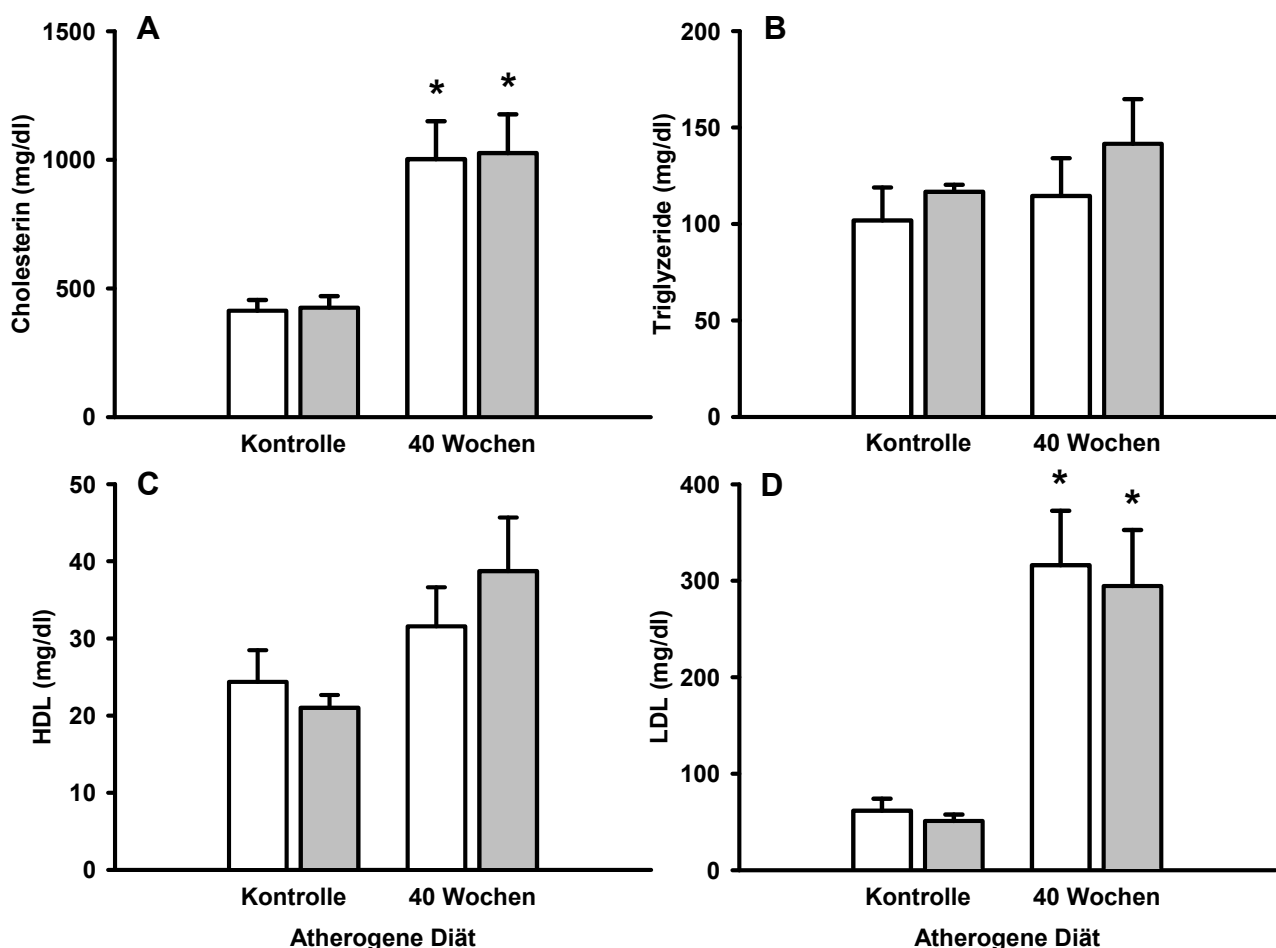


Abb. 4.2 Serumlipidspiegel von Gesamt-Cholesterin (A), Triglyzeriden (B), HDL- (C) und LDL-Cholesterin (D) nach 40 Wochen atherogener Spezialdiät. CREM-KO x ApoE-KO (graue Balken) und ApoE-KO Mäuse (weiße Balken), die über 40 Wochen mit einer atherogenen Spezialdiät gefüttert wurden, wiesen im Vergleich zu Mäusen mit Standardfütterung deutlich erhöhte Serumlipidspiegel von Gesamt-Cholesterin und LDL-Cholesterin auf. Die Inaktivierung von CREM hatte keinen Einfluss auf die Serumlipidspiegel. Standardfutter: ApoE-KO n=6, CREM-KO x ApoE-KO n=5; Spezialdiät: ApoE-KO n=9, CREM-KO x ApoE-KO n=11; *p<0,05 vs. Standardfütterung.

Mäuse, die über 40 Wochen mit einer atherogenen Spezialdiät gefüttert wurden, wiesen im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen mit Standardfütterung eine deutliche Erhöhung der Gesamt-Cholesterine und LDL-Cholesterine auf. Die Serumspiegel der Triglyzeride und HDL-Cholesterine zeigten dagegen keine signifikante Erhöhung nach Fütterung der Spezialdiät.

CREM-KO x ApoE-KO Mäuse zeigten im Vergleich zu ApoE-KO Kontroll-Mäusen weder nach Standardfütterung noch nach Fütterung der Spezialdiät Unterschiede in den Serumlipidspiegeln. Die Inaktivierung von CREM hatte keinen Einfluss auf die Serumspiegel von Gesamt-Cholesterin, Triglyzeriden, HDL- und LDL-Cholesterinen.

4.1.1.2 Quantitative Analyse der Plaques mittels Oil-red-O Färbung

Die Färbung lipidreicher Flächen und Plaques in Aorten erfolgte mittels Oil-red-O Färbung. Abbildung 4.3 zeigt Beispiele der Oil-red-O Färbungen atherosklerotisch veränderter Aorten von CREM-KO x ApoE-KO und ApoE-KO Mäusen.

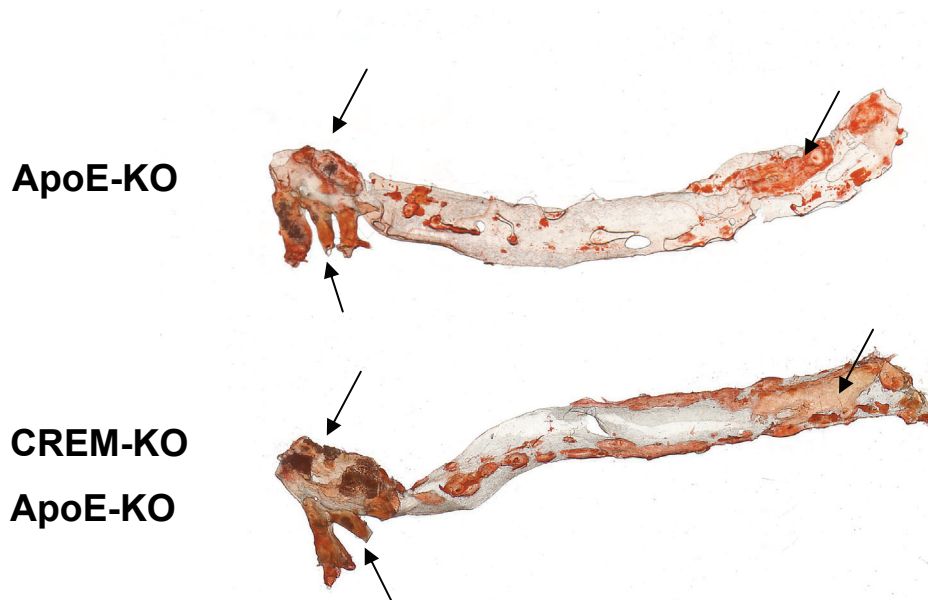


Abb. 4.3 Oil-red-O Färbung atherosklerotischer Aorten nach 30 Wochen atherogener Spezialdiät. Die atherosklerotischen Plaques in Aorten von CREM-KO x ApoE-KO und ApoE-KO Mäusen wurden mittels Oil-red-O Färbung nachgewiesen. Die meisten Plaques konnten im Bereich des Aortenbogens, den Abgängen der Carotisarterien und im distalen Bereich der abdominalen Aorta nachgewiesen werden (Pfeile).

Die meisten Oil-red-O gefärbten Arealen wurden im Bereich des Aortenbogens, den Abgängen der Carotisarterien und im distalen Bereich der abdominalen Aorta nachgewiesen.

Die Quantifizierung der Plaqueareale der Aorten (Abb. 4.4) zeigte bei den untersuchten Gruppen eine Zunahme der Fläche atherosklerotischer Plaques nach Fütterung der atherogenen Spezialdiät (30 Wochen), im Vergleich zur Standardfütterung.

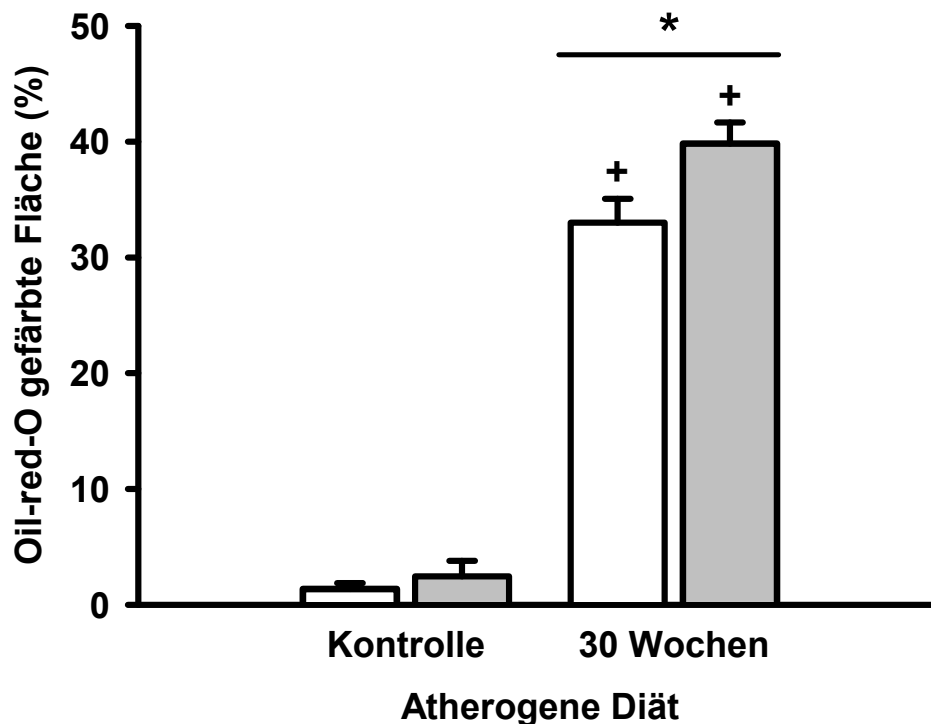


Abb. 4.4 Quantifizierung der Oil-red-O Lipidfärbung in Aorten von ApoE-KO (weiße Balken) und CREM-KO x ApoE-KO Mäusen (graue Balken). Die quantitative Analyse der Plaqueareale in Aorten von CREM-KO x ApoE-KO und ApoE-KO Mäusen nach 30 Wochen atherogener Spezialdiät zeigte in beiden Gruppen einen erhöhten Anteil atherosklerotischer Plaques im Vergleich zur Kontrolle (Standardfütterung). Die Aorten von CREM-KO x ApoE-KO Mäusen zeigten im Vergleich zu Aorten von ApoE-KO Mäusen nach 30 Wochen atherogener Spezialdiät einen erhöhten Anteil Oil-red-O gefärbter, atherosklerotischer Flächen. ApoE-KO n=29, CREM-KO x ApoE-KO n=26; +p<0,05 vs. Kontrolle (Standardfütterung); *p<0,05 vs. ApoE-KO.

Im Vergleich zum Anteil Oil-red-O gefärbter Flächen in Aorten von ApoE-KO Mäusen, wiesen Mäuse mit Inaktivierung von CREM einen signifikant erhöhten Anteil Oil-red-O-gefärbter Flächen nach 30 Wochen atherogener Spezialdiät auf. Bei Mäusen mit Standardfütterung konnte ein Einfluss der CREM-Inaktivierung auf die atherosklerotische Plaquebildung nicht beobachtet werden.

4.1.2 Ligation der Arteria carotis bei CREM-KO und WT-Mäusen

Mit einem *in vivo* Carotis-Ligations-Modell sollte der Einfluss von CREM auf die Pathophysiologie des Gefäßumbaus untersucht werden. In diesem Modell wurde, analog zu den Untersuchungen von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen (3.5.1), die Bildung einer Neointima hervorgerufen und in angefertigten Gefäßschnitten lichtmikroskopisch analysiert.

4.1.2.1 Quantifizierung der Neointimabildung

Um die Ausdehnung der Neointima ins Lumen und den Gefäßverlauf proximal zur Ligation bewerten zu können, wurden Gefäßschnitte verglichen, die in einem definierten Abstand zur Ligation (0, 200, 400, 700 und 1000 μm) angefertigt wurden. Abbildung 4.5 zeigt repräsentative Beispiele einer kombinierten Elastika-Färbung mit Resorcin-Fuchsin nach Weigert und Kernechtrot-Zellkernfärbung an Gefäßschnitten von CREM-KO und WT-Mäusen in 100 μm Entfernung zur Ligation.

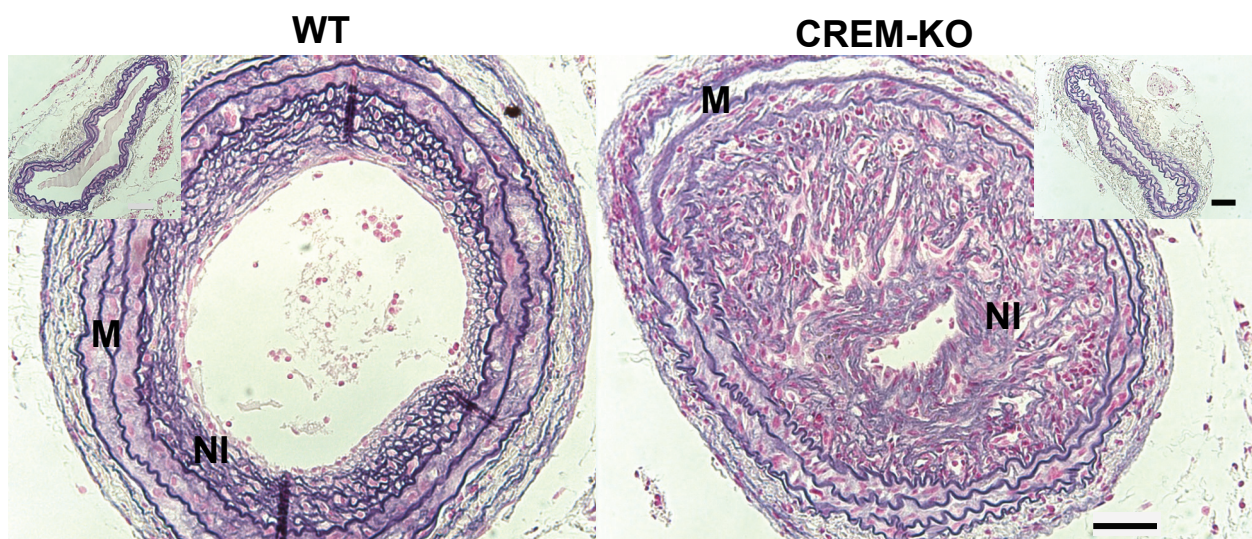


Abb. 4.5 Resorcin-Fuchsin und Kernechtrot-Färbung in Gefäßschnitten nach Ligation der A. carotis. Durch die Carotis-Ligation (große Bilder) kam es bei CREM-KO und WT-Mäusen zur Bildung einer Neointima (NI). Die Neointima in Carotisarterien von CREM-KO Mäusen war dabei im Vergleich zu WT-Mäusen deutlich vergrößert. Die scheinoperierten linken Carotisarterien (kleine Bilder) zeigten keine Neointimabildung. In der Färbung der Gefäßschnitte sind die elastischen Membranen in blau und die Zellkerne in rot dargestellt. M, Media, Größenbalken 50 μm .

Bei Mäusen beider Genotypen kam es nach der Ligation zur Ausbildung einer Neointima (NI). In Gefäßquerschnitten ligierter Carotisarterien von CREM-KO

Mäusen konnte im Vergleich zu WT-Mäusen eine deutlich vergrößerte Neointima beobachtet werden. Scheinoperierten Kontrollen wiesen keine Neointimabildung auf. Die quantitative Auswertung der Neointima-Fläche bestätigte die gesteigerte Neointimabildung bei CREM-KO Mäusen (Abb. 4.6). Die Neointima-Fläche der CREM-KO Mäuse ($3,9 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) war am deutlichsten in einem Abstand von 200 μm zur Ligation, im Vergleich zur Neointima-Fläche der WT-Mäuse ($0,9 \times 10^4 \pm 0,7 \times 10^4 \mu\text{m}^2$), signifikant vergrößert.

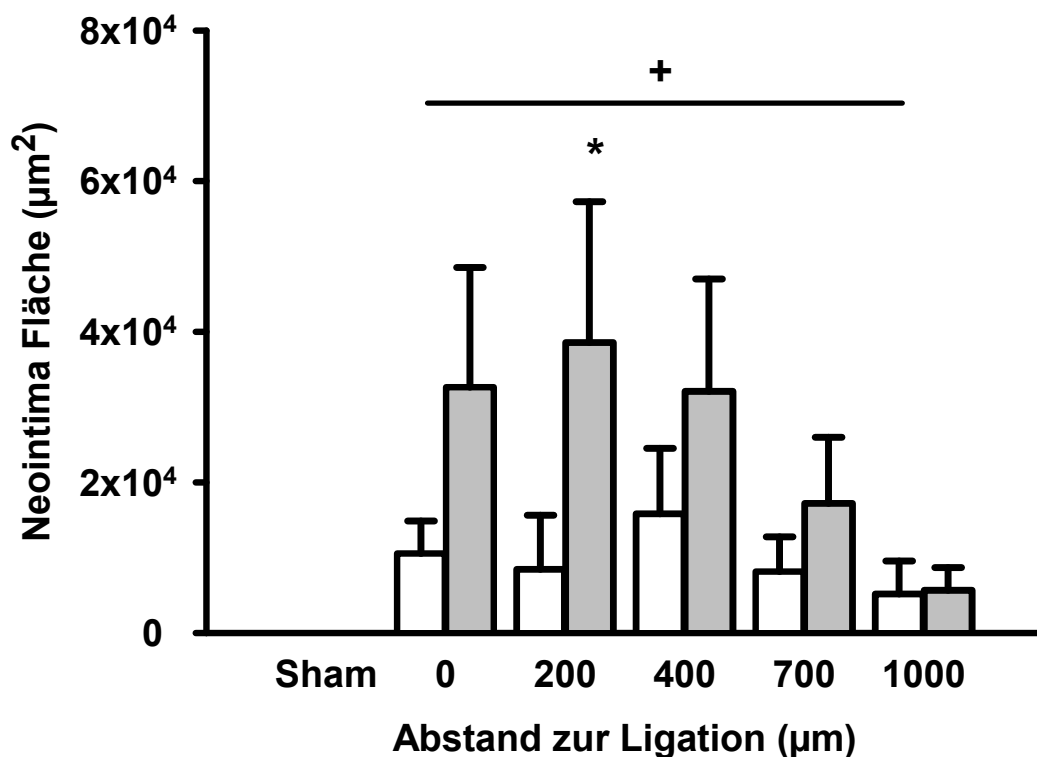


Abb. 4.6 Fläche der Neointima nach Ligation der A. carotis und Schein-Operation. Die Bildung einer Neointima konnte in ligierten Carotisarterien von CREM-KO (graue Balken) und WT-Mäusen (weiße Balken) beobachtet werden. Die Fläche der Neointima war bei CREM-KO Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant vergrößert (+ $p < 0,05$ KO vs. WT; * $p < 0,05$ vs. WT). In scheinoperierten Gefäßen (sham) trat keine Neointimabildung auf. WT $n=10$; CREM-KO $n=9$.

Die Media der Gefäßschnitte war nach Ligation der A. carotis im Vergleich zur Schein-Operation vergrößert. Ein Einfluss der CREM-Inaktivierung auf die Fläche der Media konnte weder nach Ligation noch nach Schein-Operation festgestellt (Abb. 4.7).

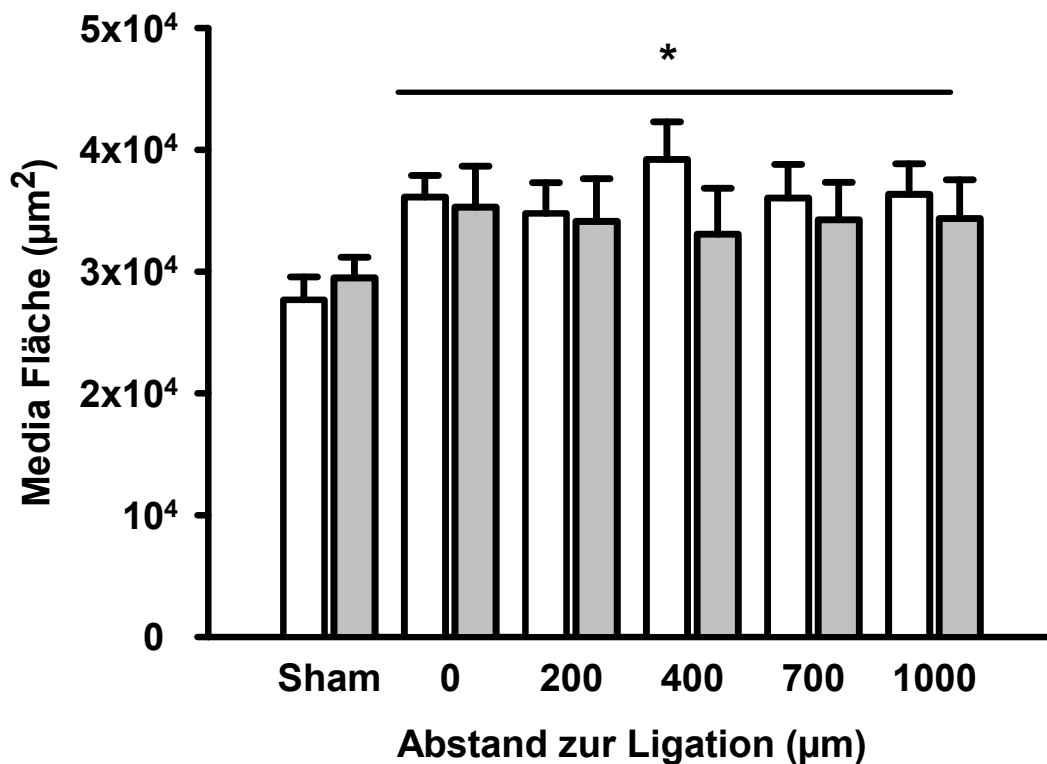


Abb. 4.7 Fläche der Media nach Ligation der A. carotis und Schein-Operation. Die Media ligierter Carotisarterien von CREM-KO (graue Balken) und WT-Mäusen (weiße Balken) war im Vergleich zur Media scheinoperierter Carotisarterien (sham) signifikant vergrößert. Innerhalb der untersuchten Gruppen zeigten sich keine Unterschiede. WT n=10; CREM-KO n=9; *p<0,05 ligiert vs. sham.

4.1.2.2 Identifizierung der Zell-Adhäsions-Moleküle VCAM-1 und ICAM-1

Die Infiltrierung von Leukozyten in verletztes oder infiziertes Gewebe ist notwendig für eine Entzündungsantwort. Dabei kommt es zum Auswandern von Leukozyten aus dem vaskulären Lumen, durch das Endothel, zum Entzündungsstimulus. Neben Zytokinen und chemoattraktiven Substanzen sind auch Zell-Adhäsions-Moleküle in diesen Prozess involviert. Diese spielen auch während der Bildung der Neointima eine wichtige Rolle (Schober und Weber 2005).

Das vaskuläre Adhäsions-Molekül-1 (VCAM-1; CD 106) und das interzelluläre Adhäsions-Molekül-1 (ICAM-1; CD54) werden auf der Oberfläche von Endothelzellen und VSMCs exprimiert und können mit Hilfe immunhistologischer Färbungen in entzündetem Gewebe nachwiesen werden (Newby und Zaltsman 2000, Braun et al. 1999). Gefäßschnitte ligierter Carotisarterien von CREM-KO und WT-Mäusen

wurden daher mittels VCAM-1- (Abb. 4.8, 4.9) und ICAM-1-spezifischer (Abb. 4.10, 4.11) Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Beispielbilder der VCAM-1-spezifischen Färbungen sind in Abbildung 4.8 dargestellt.

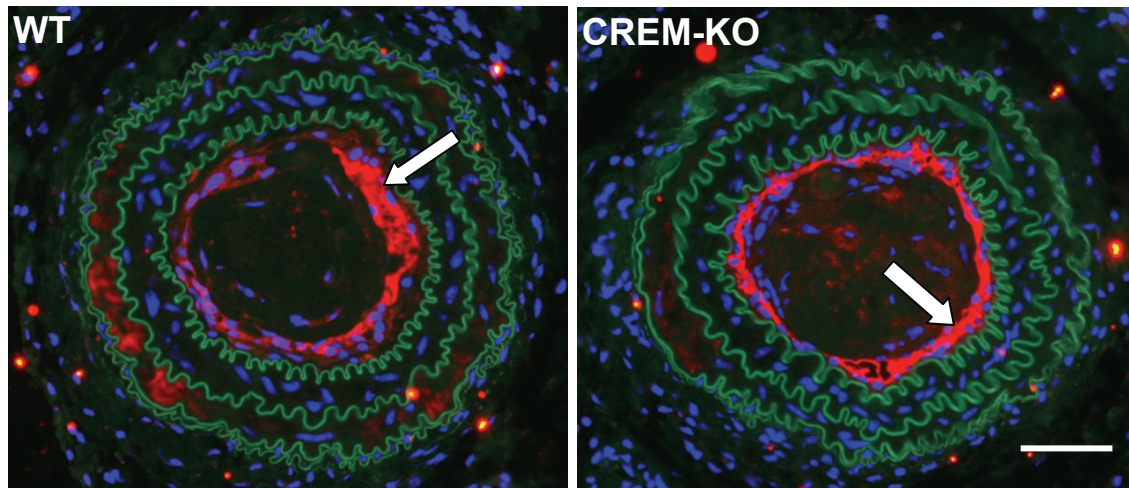


Abb. 4.8 VCAM-1-spezifische Immunfluoreszenzfärbung in Gefäßschnitten ligierter Carotisarterien, 200 μm entfernt von der Ligation. In der Überlagerung der Immunfluoreszenzbilder der VCAM-1-spezifischen Färbung (rote Fluoreszenz, Pfeil) und der DAPI-Zellkernfärbung (blaue Fluoreszenz) konnte eine VCAM-1-Expression hauptsächlich im Bereich der Neointima der Carotisarterien von CREM-KO und WT-Mäusen nachgewiesen werden. Im Bereich der Media waren dagegen kaum VCAM-1-positive Bereiche nachweisbar. Die Eigenfluoreszenz der Elastikas ist zur besseren Übersicht in grün dargestellt. Größenbalken 50 μm .

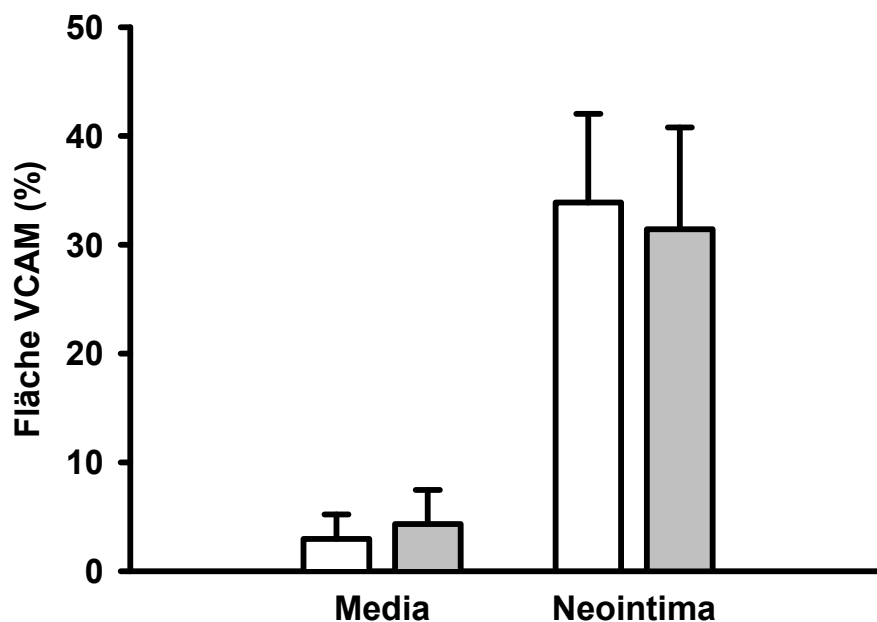


Abb. 4.9 Quantifizierung des Zell-Adhäsions-Moleküls VCAM-1 in ligierten Carotisarterien von CREM-KO (graue Balken) und WT-Mäusen (weiße Balken). Im Vergleich zur Media konnten in der Neointima erhöhte Raten einer VCAM-1-Expression nachgewiesen werden. Ein Unterschied hinsichtlich einer veränderten Expression von VCAM-1 lag zwischen den untersuchten Genotypen nicht vor. WT n=6, CREM-KO n=6.

Die Expression von VCAM-1 war hauptsächlich auf den Bereich der äußeren Neointima beschränkt. Dabei lag der VCAM-1-Anteil an der Gesamtfläche der Neointima bei den WT-Mäusen bei $33,9 \pm 8,2$ % und bei den CREM-KO Mäusen bei $31,4 \pm 9,4$ %. In der Media betrug der prozentuale Anteil von VCAM-1 an der Gesamtfläche $3,0 \pm 2,3$ % bei den CREM-WT Mäusen und $4,3 \pm 3,1$ % bei den CREM-KO Mäusen (Abb. 4.9). Ein Unterschied in der Expression von VCAM-1 lag zwischen den untersuchten Genotypen nicht vor.

Für die Untersuchungen der interzellulären Adhäsion von Entzündungszellen wurden Gefäßschnitte ligierter Carotisarterien von CREM-KO und WT-Mäusen mit Hilfe ICAM-1-spezifischer Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Beispielbilder dieser Färbungen sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Die Überlagerung der Fluoreszenzbilder einer ICAM-1-spezifischen Färbung und einer DAPI-Zellkernfärbung zeigte eine Expression von ICAM-1 in der Neointima ligierter Carotisarterien von CREM-KO und WT-Mäusen. In der Media wurde ICAM-1 nicht nachgewiesen.

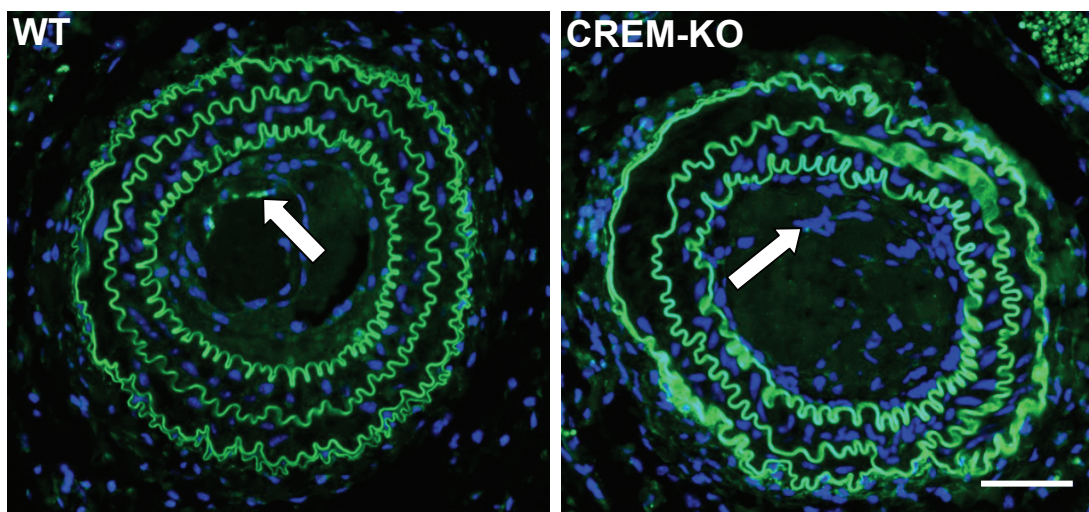


Abb. 4.10 ICAM-1-spezifische Immunfluoreszenzfärbung in Gefäßquerschnitten ligierter Carotisarterien, 200 μ m entfernt von der Ligation. Die Überlagerung der Immunfluoreszenzbilder einer ICAM-1-spezifischen Färbung (grüne Fluoreszenz, Pfeil) und einer DAPI-Zellkernfärbung (blaue Fluoreszenz) zeigte die ICAM-1-positiven Bereiche ausschließlich in der Neointima von CREM-KO und WT-Mäusen. Die Elastikas fluoreszieren zusätzlich hellgrün (Eigenfluoreszenz). Größenbalken 50 μ m.

Der prozentuale Anteil von ICAM-1 an der Gesamtfläche der Neointima betrug in ligierten Carotisarterien von WT-Mäusen $6,3 \pm 2,4$ % und in Carotisarterien von

CREM-KO Mäusen $11,5 \pm 5,0$ % (Abb. 4.11). Die Expression von ICAM-1 nach Ligation der A. Carotis unterschied sich zwischen den untersuchten Genotypen nicht.

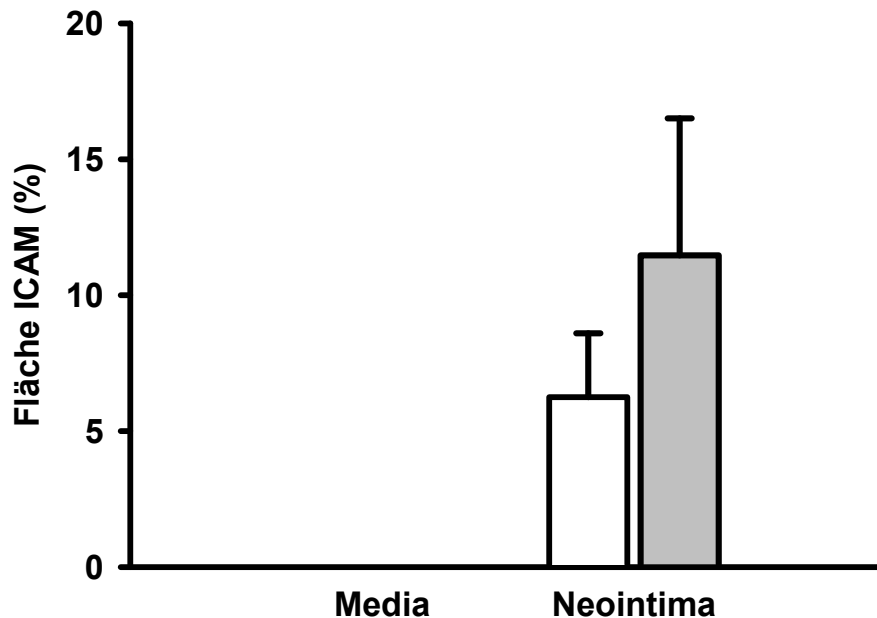


Abb. 4.11 Quantifizierung des Zell-Adhäsions-Moleküls ICAM-1 in ligierten Carotisarterien von CREM-KO (graue Balken) und WT-Mäusen (weiße Balken), 200 μ m entfernt von der Ligation. Die Untersuchung zur Expression mittels ICAM-1-spezifischer Färbung in Gefäßquerschnitten von CREM-KO und WT-Mäusen nach Ligation der A. Carotis zeigten zwischen den Gruppen keine Unterschiede. In der Media war keine ICAM-1-Färbung nachweisbar. WT n=7, CREM-KO n=7.

Die Inaktivierung von CREM hatte keinen Einfluss auf die Expression der Zell-Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1.

4.1.2.3 Quantifizierung proliferierender VSMCs

Um zu überprüfen, ob der Befund der gesteigerten Neointimabildung von CREM-KO Mäusen mit einer gesteigerten Proliferation von VSMCs assoziiert ist, wurde der prozentuale Anteil proliferierender VSMCs in Gefäßschnitten ligierter Carotisarterien von CREM-KO und WT-Mäusen bestimmt. Mit Hilfe von Ki67- und α -Glattmuskelaktin-spezifischen Doppelfärbungen konnten proliferierende VSMCs in den Gefäßschnitten nachgewiesen werden (Abb. 4.12).

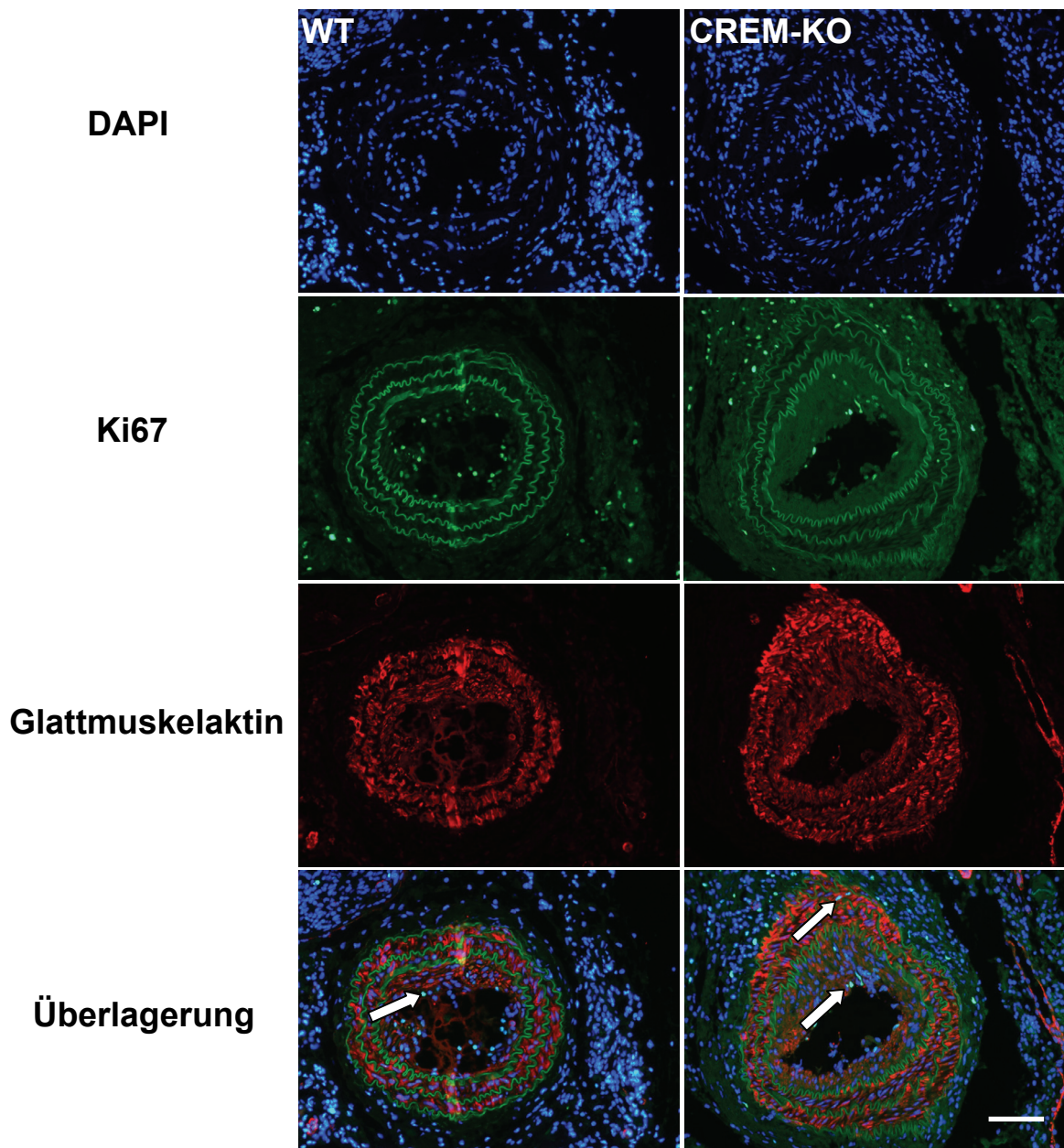


Abb. 4.12 Proliferierende VSMCs nach Ligation der A. carotis. Ki67 (grüne Fluoreszenz) und α -Glattmuskelaktin (rote Fluoreszenz) wurden mittels spezifischer Immunfluoreszenzfärbungen in Gefäßquerschnitten (100 μ m von der Ligation entfernt) der A. carotis von CREM-KO und WT-Mäusen nachgewiesen. In der Überlagerungsdarstellung mit der DAPI-Zellkernfärbung (blau) konnten die proliferierenden Glattmuskelzellen in Media und Neointima identifiziert werden (Pfeile). Größenbalken 50 μ m.

Im Zentrum der abgeschlossenen Neointimabildung, nahe der Ligation, muss von einer anderen zellulären Zusammensetzung der Neointima ausgegangen werden, als in Bereichen, die in weiterer Entfernung zur Ligation liegen. Aus diesem Grund wurden zusätzliche Ki67-/ α -Glattmuskelaktin-spezifische Doppelfärbungen an

Gefäßschnitten durchgeführt, die in einem Abstand von 700 µm zur Ligation, angefertigt wurden.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Doppelfärbungen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tab. 4.1 Prozentualer Anteil proliferierender VSMCs in Media und Neointima nach Ligation der A. carotis. Die Quantifizierungen der Ki67- und α -Glattmuskelaktin-spezifischen Doppelfärbungen in Gefäßschnitten (100 µm entfernt von der Ligation) von CREM-KO und WT-Mäusen zeigten in der Media von CREM-KO Mäusen neben der gesteigerten Proliferation aller Zellen der Media, auch eine gesteigerte Proliferation der VSMCs. Der prozentuale Anteil proliferierender VSMCs in der Neointima war zwischen den untersuchten Gruppen nicht verändert. Trotz der gesteigerten Proliferation in CREM-KO VSMCs der Media, kam es nicht zu einem erhöhten Anteil von Glattmuskelzellen. * $p < 0,05$ (rot); WT n=6, CREM-KO n=6.

NEOINTIMA

	100 µm				700 µm			
	WT		CREM-KO		WT		CREM-KO	
	MW	± SEM	MW	± SEM	MW	± SEM	MW	± SEM
Zelldichte (Zellen/mm²)	6373,8	487,6	6647,7	1484,3	6535,2	609,1	7347,3	643,7
Proliferationsrate Neointima (%)	20,9	6,8	10,3	1,9	10,5	2,4	8,6	1,8
VSMC total (µm²)	3613,5	2046,5	3249,0	1684,0	5656,6	3980,0	8305,6	5046,8
VSMC Area (%)	11,1	6,1	8,2	3,6	9,3	4,3	14,6	7,4
Proliferationsrate VSMCs (%)	4,5	2,5	1,9	0,7	4,1	3,1	3,2	1,5

MEDIA

	100 µm				700 µm			
	WT		CREM-KO		WT		CREM-KO	
	MW	± SEM	MW	± SEM	MW	± SEM	MW	± SEM
Zelldichte (Zellen/mm²)	4451,1	259,4	4930,9	195,0	4195,8	375,1	4955,8	398,8
Proliferationsrate Media (%)	0,14 *	0,07 *	1,36 *	0,42 *	0,88	0,40	1,73	0,65
VSMC total (µm²)	9214,1	2437,4	9538,9	1546,4	5990,4	1001,1	8706,3	1371,8
VSMC Area (%)	25,0	6,4	24,5	3,7	17,1	3,5	25,4	3,8
Proliferationsrate VSMCs (%)	0,11 *	0,06 *	0,79 *	0,26 *	0,71	0,31	1,24	0,54

Der prozentuale Anteil proliferierender VSMCs zeigte in der Neointima der Gefäßschnitte (100 µm und 700 µm entfernt von der Ligation) zwischen den untersuchten Genotypen keine Unterschiede. Im Anteil glattmuskulärer Zellen und in der Zelldichte der Neointima wurden ebenfalls keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt.

Die Quantifizierung proliferierender Zellen in der Media zeigte in den Gefäßschnitten aus dem Zentrum der Neointimabildung (100 µm) bei CREM-KO Mäusen, im Vergleich zu WT-Mäusen, neben der gesteigerten Proliferation aller Zellen der Media auch eine gesteigerte Proliferation der VSMCs. Die gesteigerte Proliferation im

Zentrum der Neointimabildung konnte im Randbereich der Neointimabildung (700 μm) nicht nachgewiesen werden.

Die gesteigerte Proliferation in der Media ligierter Carotisarterien von CREM-KO Mäusen, deutet auf einen anti-proliferativer Effekt von CREM hin.

4.2 Isolation und Kultivierung primärer Glattmuskelzellen aus der Aorta

Die Isolation glatter Gefäßmuskelzellen erfolgte durch Aussprossen der Zellen aus aortalen Gewebestückchen. Um den Anteil glattmuskulärer Zellen in der Zellkultur zu bestimmen, wurden kultivierte Zellen der ersten Passage mit einem gegen das α -Glattmuskelaktin gerichteten Antikörper gefärbt.

Abbildung 4.13 zeigt die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahme einer α -Glattmuskelaktin-spezifischen Färbung mit einer DAPI-Zellkernfärbung, mit deren Hilfe der Anteil α -Glattmuskelaktin-positiver Zellen in der Zellkultur quantifiziert werden konnte.

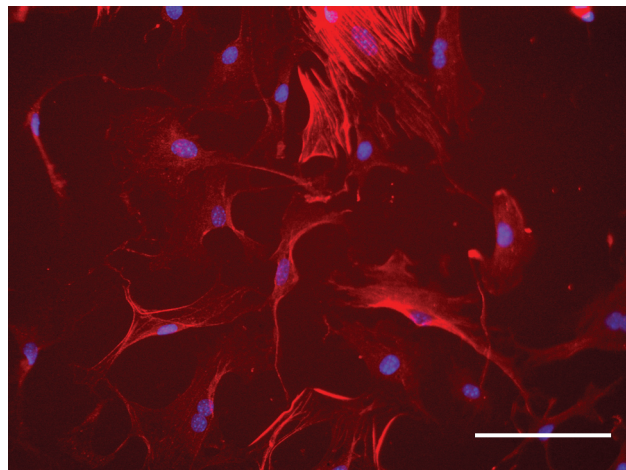


Abb. 4.13 α -Glattmuskelaktin-spezifische Immunfluoreszenzfärbung (rote Fluoreszenz) ausgesprossener Zellen aus der Mauseorta und DAPI-Zellkernfärbung (blaue Fluoreszenz). In der Zellkultur konnte ein Anteil glattmuskulärer Zellen von über 90 % nachgewiesen werden. Größenbalken 100 μm .

In der Zellkultur wurde ein Anteil von über 90 % glattmuskulärer Zellen nachgewiesen.

In den folgenden *in vitro* Untersuchungen wurden primär isolierte VSMCs der zweiten Passage eingesetzt.

4.3 Apoptose und Proliferation in kultivierten VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen

Vorausgegangene *ex vivo* Untersuchungen aortaler Gewebeschnitte von CREM-KO und WT-Mäusen konnten keinen Effekt der CREM-Inaktivierung auf die basale Apoptose und Proliferation zeigen (unveröffentlicht, M. Seidl, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Münster). In der Media ligierter Carotisarterien von CREM-KO Mäusen wurde allerdings ein gesteigerter Prozentsatz proliferierender VSMCs, im Vergleich zum WT festgestellt. Um die funktionelle Bedeutung von CREM für den Zellzyklus und den induzierten Zelltod der glatten Muskelzellen unter Stimulationsbedingungen *in vitro* näher zu untersuchen, wurde der prozentuale Anteil apoptotischer und proliferierender VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen nach Stimulation mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bzw. dem Wachstumsfaktor PDGF (platelet-derived growth factor) bestimmt.

4.3.1 Apoptose in VSMCs

Der Nachweis apoptotischer VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen erfolgte mit Hilfe des TUNEL-Assays. Zur Stimulation der Apoptose wurden die kultivierten VSMCs für 24 Stunden mit Wasserstoffperoxid (400, 600 und 800 μM H_2O_2) behandelt. Die Beispielfärbung in Abbildung 4.14 zeigt die Überlagerungsbilder einer TUNEL-Färbung und einer DAPI-Zellkernfärbung in kultivierten und fixierten VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen nach Kontroll-Behandlung mit Wasser und nach 600 μM H_2O_2 -Stimulation. Die Behandlung mit 600 μM H_2O_2 führte bei kultivierten VSMCs zu einer gesteigerten Anzahl TUNEL-positiver Zellen im Vergleich zur Kontroll-Behandlung. Für die Bestimmung des Prozentsatzes apoptotischer Zellkerne wurde der prozentuale Anteil TUNEL-positiver VSMCs an der Gesamtzellzahl (DAPI-gefärbte Zellen) von H_2O_2 - und Kontroll-behandelten Proben, aus je 6 unabhängigen Isolationen pro Genotyp ermittelt (Abb. 4.15). Die Stimulation mit H_2O_2 führte in den untersuchten Gruppen Dosis-abhängig zu einem signifikant gesteigerten Prozentsatz apoptotischer Zellkerne (600 μM und 800 μM H_2O_2), im Vergleich zur Kontroll-Behandlung. Ein Unterschied zwischen den Genotypen konnte nicht festgestellt werden. Die Inaktivierung von CREM hatte keinen Einfluss auf die Apoptose nach Stimulation mit H_2O_2 .

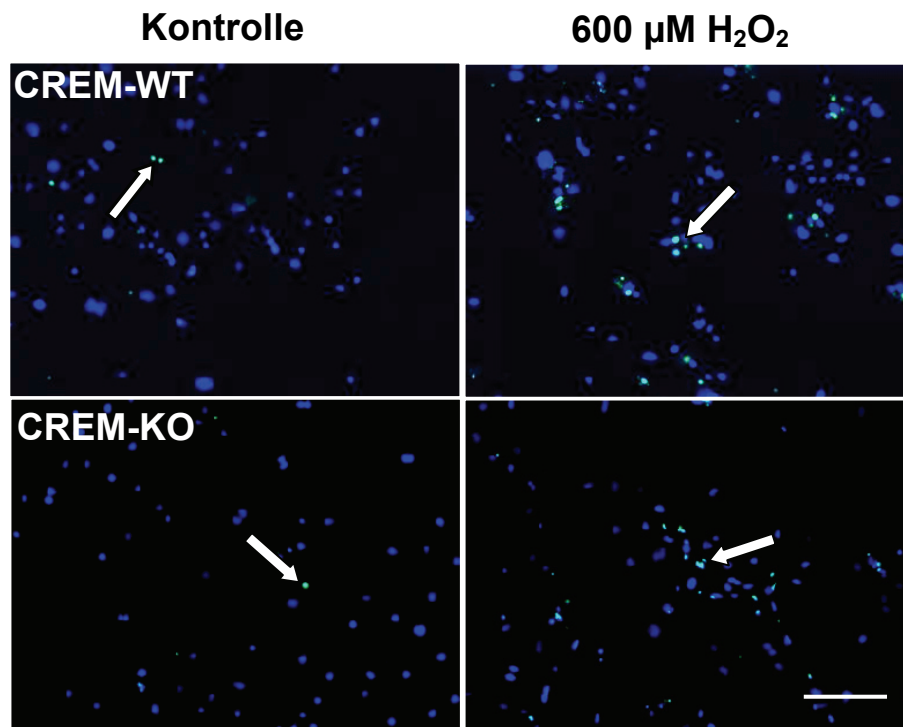


Abb. 4.14 TUNEL-Färbung kultivierter VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen. Die Pfeile zeigen apoptotische Zellen in der Überlagerungsdarstellung der Bilder einer TUNEL-Färbung (grüne Fluoreszenz) und einer DAPI-Zellkernfärbung (blaue Fluoreszenz) in VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen. Nach Behandlung mit 600 µM H₂O₂ konnte in VSMCs beider Genotypen ein gesteigerter Anteil TUNEL-positiver Zellen nachgewiesen werden. Größenbalken 100 µm.

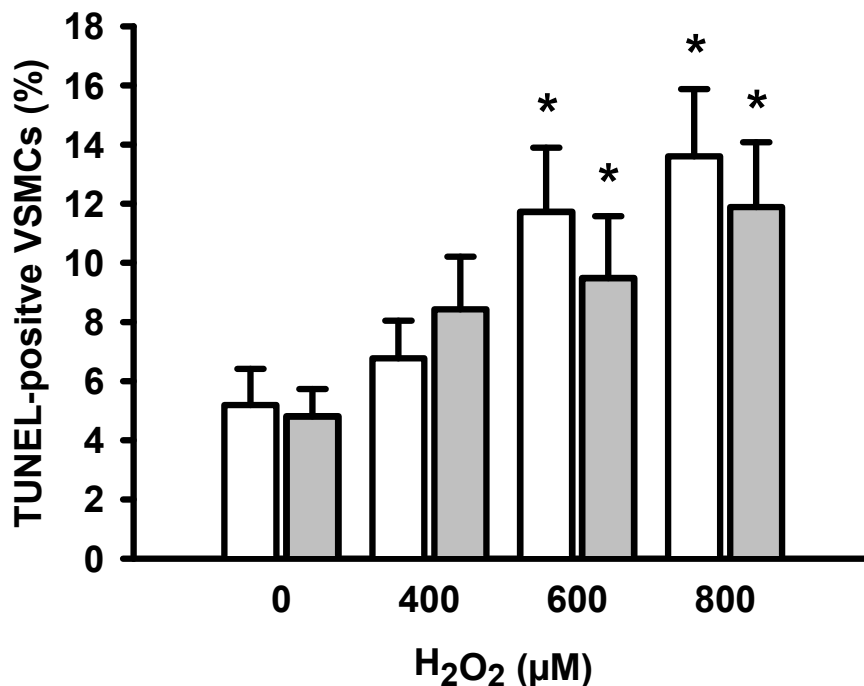


Abb. 4.15 Prozentsatz apoptotischer Zellkerne nach H₂O₂-Behandlung. Kultivierte VSMCs von CREM-KO (graue Balken) und WT-Mäusen (weiße Balken) zeigten eine Dosis-abhängige Steigerung des prozentualen Anteils apoptotischer Zellkerne nach Stimulation mit H₂O₂. Ein Unterschied im Prozentsatz apoptotischer Zellkerne konnte zwischen den untersuchten Genotypen nicht festgestellt werden. n=10 (je 370 ± 35 Zellen) aus 6 Isolationen. *p<0,05 bei 600, 800 µM H₂O₂ vs. 0 µM H₂O₂.

4.3.2 Proliferation in VSMCs

Der Nachweis proliferierender Zellen erfolgte durch immunhistologischen Nachweis von Ki67. Abbildung 4.16 zeigt die Überlagerungsbilder der Fluoreszenzaufnahmen einer Ki67-spezifischen Färbung (grüne Fluoreszenz) mit Bildern einer DAPI-Zellkernfärbung (blaue Fluoreszenz) in kultivierten VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen. Zur Steigerung der Proliferation wurden die Zellen zuvor mit dem Wachstumsfaktor PDGF behandelt. In Folge der PDGF-Behandlung konnte in den untersuchten Gruppen eine Erhöhung der Anzahl Ki67-positiver VSMCs, im Vergleich zur Kontroll-Behandlung (Behandlung mit Wasser) nachgewiesen werden. VSMCs von CREM-KO Mäusen zeigten einen deutlich erhöhten Anteil Ki67-positiver Zellen im Vergleich zu VSMCs von WT-Mäusen.

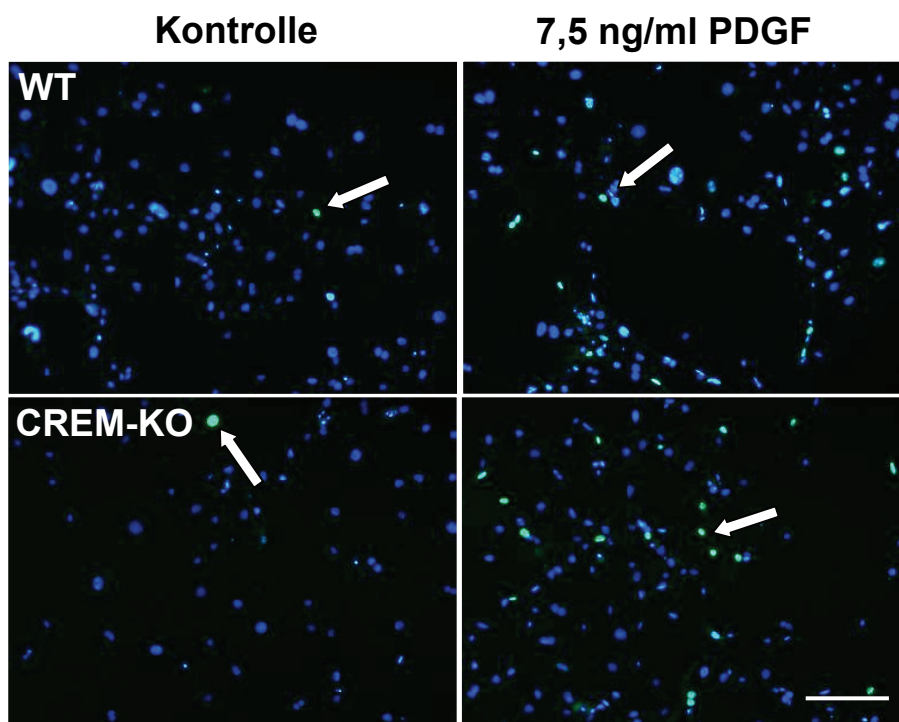


Abb. 4.16 Ki67-Färbung kultivierter VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen. Die Pfeile zeigen proliferierenden Zellen in der Überlagerungsdarstellung der Fluoreszenzbilder einer Ki67-spezifischen Färbung (grüne Fluoreszenz) und einer DAPI-Zellkernfärbung (blaue Fluoreszenz) in VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen. Nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor PDGF (7,5 ng/ml) konnte in VSMCs beider Genotypen ein gesteigerter Anteil Ki67-positiver Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich mit WT-Zellen war der Anteil Ki67-positiver Zellen in CREM-KO VSMCs nach Behandlung mit PDGF gesteigert. Größenbalken 100 μ m.

Für die Bestimmung des Prozentsatzes proliferierender VSMCs nach PDGF- und Kontroll-Behandlung, wurde der prozentuale Anteil Ki67-positiver VSMCs an der Gesamtzellzahl (DAPI-gefärbte Zellen), aus je 5 unabhängigen Isolationen pro Genotyp ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.17 dargestellt.

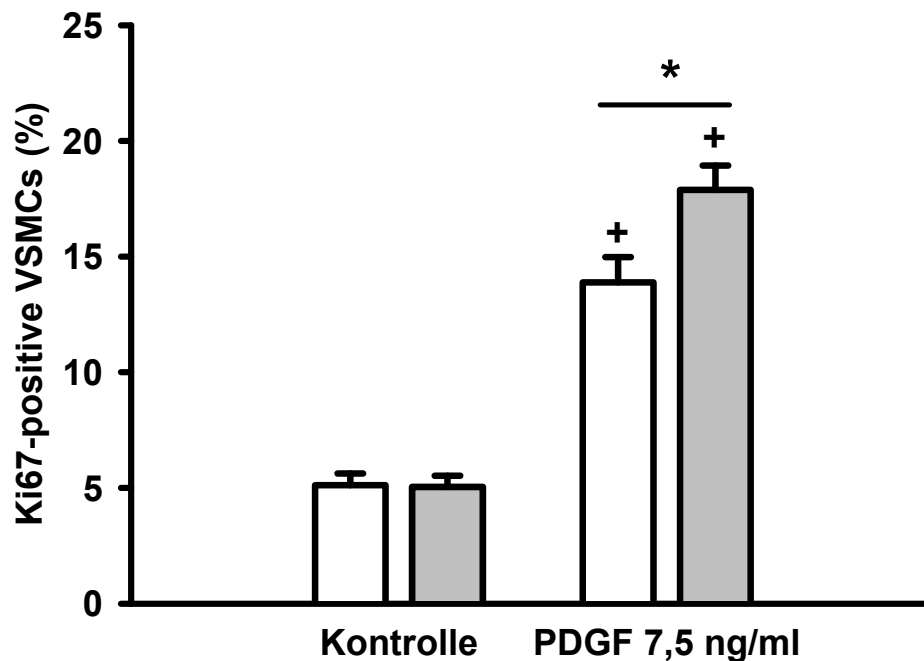


Abb. 4.17 Prozentsatz proliferierender Zellen nach PDGF-Behandlung. Die Quantifizierung Ki67-positiver VSMCs von CREM-KO (graue Balken) und WT-Mäusen (weiße Balken) zeigte einen gesteigerten Prozentsatz proliferierender Zellen nach PDGF-Behandlung. Im Vergleich zu WT-VSMCs wiesen CREM-KO VSMCs eine gesteigerte Proliferation nach PDGF-Behandlung auf. n=14 (je 450 ± 40 Zellen) aus 5 Isolationen. *p<0,05 CREM-KO vs. WT.

Die Stimulation mit PDGF führte in den untersuchten Gruppen zu einer Steigerung des Anteils proliferierender VSMCs. In PDGF-behandelten VSMCs von CREM-KO Mäusen konnte, mit einem Anteil proliferierender VSMCs von 17,9 ± 1,1 % im Vergleich zu WT-VSMCs (13,9 ± 1,1 %), eine signifikant gesteigerte Proliferation nachgewiesen werden. Innerhalb der Kontroll-behandelten Gruppen wurde kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt.

CREM hat auf PDGF-behandelte VSMCs einen anti-proliferativen Effekt.

4.4 Transiente Transfektion kultivierter VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen

Um den Einfluss des Transkriptionsfaktors CREM auf die CRE-vermittelte transkriptionelle Aktivität in VSMCs zu untersuchen, wurden primäre VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen mit einem CRE-kontrolliertem Luciferase-Reportergen-Konstrukt transient transfiziert. Zur näheren Untersuchung der Rolle von CREM wurden transfizierte VSMCs mit Aktivatoren der cAMP- bzw. cGMP-abhängigen Signalkaskaden sowie mit dem Wachstumsfaktor PDGF stimuliert.

Die CRE-abhängige transkriptionelle Aktivität der VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen wurde in mehreren unabhängigen Versuchen bestimmt und jeweils auf die gemessene Luciferase-Aktivität der Kontroll-behandelten WT-Probe normiert.

4.4.1 Stimulation der cAMP-abhängigen Transkription

Um den Einfluss der CREM-Inaktivierung auf die cAMP-abhängige Transkription zu untersuchen, wurden transient transfizierte VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen mit Forskolin stimuliert. Forskolin führt über eine direkte Stimulation der Adenylatzyklase zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Glattmuskelzelle.

Die Ergebnisse der gemessenen Luciferase-Aktivität und somit der cAMP-vermittelten transkriptionellen Aktivität nach Stimulation mit Forskolin über 12 Stunden sind in der folgenden Abbildung 4.18 dargestellt. Die Abbildung 4.18 stammt von M. Seidl (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Münster) und wurde für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Forskolin führte in kultivierten VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Luciferase-Aktivität (Kontrolle: WT $1,0 \pm 0,3$ RLU relativ zur WT-Kontrolle, CREM-KO $1,8 \pm 0,2$ RLU relativ zur WT-Kontrolle; 3×10^{-5} M Forskolin: WT $6,7 \pm 1,2$ RLU relativ zur WT-Kontrolle, CREM-KO $12,6 \pm 2,2$ RLU relativ zur WT-Kontrolle). In CREM-KO VSMCs konnte eine signifikante Steigerung der transkriptionellen Aktivität nach Stimulation mit der (Lösungsmittel-) Kontrolle und nach Stimulation mit 3×10^{-8} bis 3×10^{-5} M Forskolin im Vergleich zum WT festgestellt werden. CREM unterdrückte die CRE-vermittelten Transkription nach Stimulation mit Forskolin.

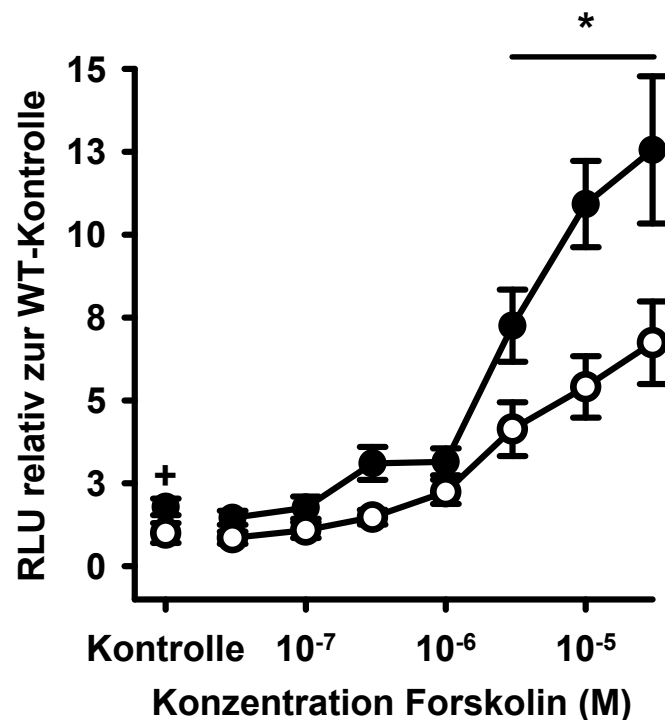


Abb. 4.18 CRE-vermittelte transkriptionelle Aktivität in kultivierten VSMCs von CREM-KO (gefüllte Kreise) und WT-Mäusen (offene Kreise). Die transiente Transfektion primärer VSMCs mit einem Luciferase-Reportergenkonstrukt und Stimulation mit Forskolin über 12 Stunden führte in beiden Gruppen zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Luciferase-Aktivität. Die Inaktivierung von CREM führte zu einer Steigerung der CRE-abhängigen Transkription basal (Kontrolle) und unter Stimulation mit 3×10^{-8} – 3×10^{-5} M Forskolin im Vergleich zum WT. Alle Daten wurden relativ zu den WT-Kontrollproben dargestellt. $n=5$, * $p<0,05$ CREM-KO vs. WT; + $p<0,05$ CREM-KO vs. WT. RLU, relative Lichteinheit.

In den nachfolgenden Versuchen betrug die Stimulationsdauer 9 Stunden. Die Stimulationsdauer wurde in Vorversuchen (nicht gezeigt) anhand der maximal gemessenen Luciferase-Aktivität nach Forskolin-Stimulation festgelegt.

4.4.2 Stimulation der cGMP-abhängigen Transkription

Um den Einfluss einer CREM-Inaktivierung auf die cGMP-abhängige Transkription zu untersuchen, wurden transient transfizierte VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen mit 8pCPT-cGMP (1×10^{-4} M), einem membranpermeablen cGMP-Analogen und Aktivator der Proteinkinase G, stimuliert. Die Ergebnisse der gemessenen Luciferase-Aktivität, relativ zur WT-Kontrolle, sind in Abbildung 4.19 dargestellt.

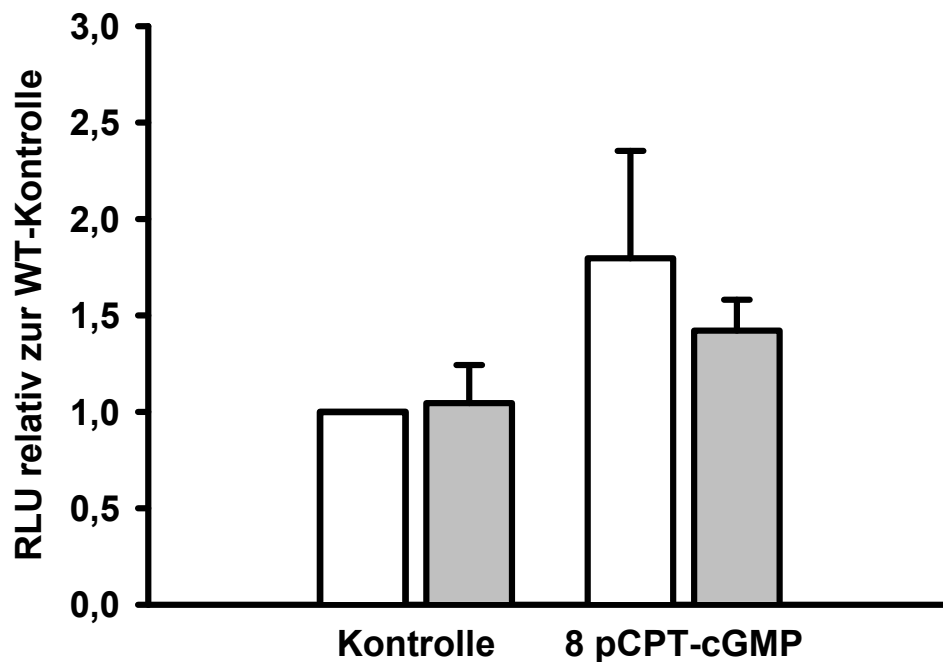


Abb. 4.19 CRE-vermittelte transkriptionelle Aktivität in kultivierten VSMCs von CREM-KO (graue Balken) und WT-Mäusen (weiße Balken). Die transiente Transfektion primärer VSMCs mit einem Luciferase-Reportergenkonstrukt und Stimulation mit 8pCPT-cGMP (1×10^{-4} M) über 9 Stunden führte in keiner der untersuchten Gruppen zu einem Anstieg der Luciferase-Aktivität. Die Daten wurden relativ zur jeweiligen WT-Kontrollprobe dargestellt; n=6; RLU, relative Lichteinheit.

Die Stimulation des cGMP-abhängigen Signalwegs mit 8pCPT-cGMP führte in den untersuchten Gruppen zu keinem Anstieg der CRE-vermittelten transkriptionellen Aktivität. CREM hatte keinen Einfluss auf die CRE-vermittelte Transkription nach Stimulation mit 8pCPT-cGMP.

4.4.3 Stimulation der NO-abhängigen Transkription

Um den Einfluss der CREM-Inaktivierung auf die NO-abhängige Transkription zu untersuchen, erfolgte die Stimulation mit dem NO-Donor S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) nach Transfektion der VSMCs mit einer Konzentration von 1×10^{-4} M für 9 Stunden. Die Freisetzung von NO bewirkt die Aktivierung der Proteinkinase G (PKG). Abbildung 4.20 zeigt die Ergebnisse der gemessenen Luciferase-Aktivität relativ zur WT-Kontrolle in transient transfizierten VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen nach Stimulation mit SNAP.

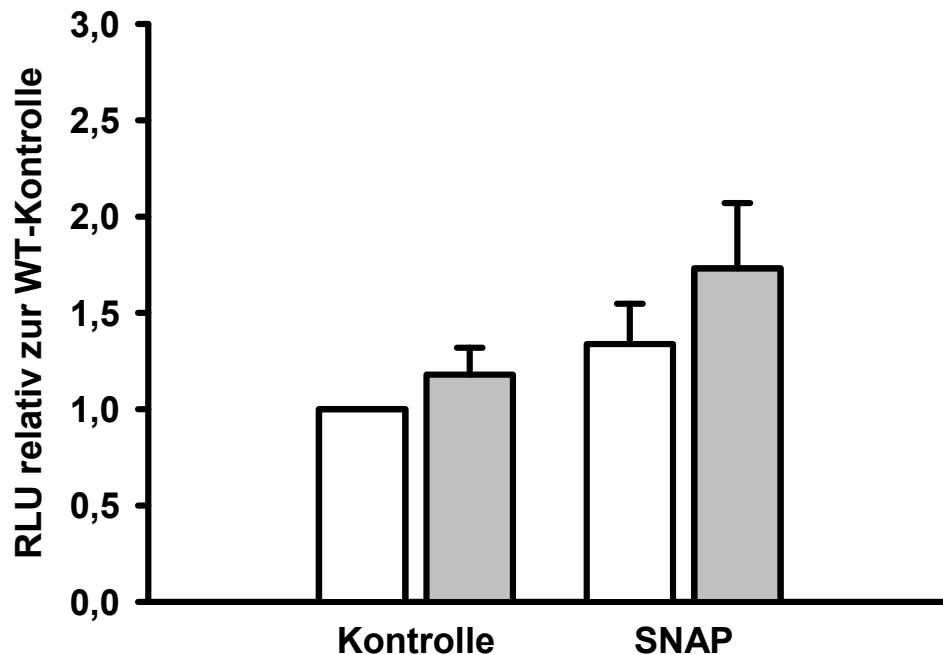


Abb. 4.20 CRE-vermittelte transkriptionelle Aktivität kultivierter VSMCs von CREM-KO (graue Balken) und WT-Mäusen (weiße Balken). Die transiente Transfektion primärer VSMCs mit einem Luciferase-Reportergenkonstrukt und Stimulation mit SNAP (1×10^{-4} M) über 9 Stunden führte in keiner der untersuchten Gruppen zu einem Anstieg in der CRE-vermittelten transkriptionellen Aktivität. Die Daten wurden relativ zur jeweiligen WT-Kontrollprobe dargestellt. $n=7$. RLU, relative Lichteinheit.

Die Stimulation des PKG-vermittelten Signalwegs mit SNAP führte in den untersuchten Gruppen zu keinem Anstieg der CRE-vermittelten transkriptionellen Aktivität. CREM hatte keinen Einfluss auf die CRE-vermittelte Transkription nach Stimulation mit SNAP.

4.4.4 Stimulation der Wachstumsfaktor-abhängigen Transkription

Die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF führte bei VSMCs von CREM-KO Mäusen zu einer gesteigerten Proliferation im Vergleich zum WT (siehe Abb. 4.17). Um einen Zusammenhang der anti-proliferativen Wirkung von CREM mit einer Wachstumsfaktor-abhängigen CRE-vermittelten transkriptionellen Aktivierung zu untersuchen, wurden transfizierte VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen für 9 Stunden mit PDGF (7,5 ng/ml) stimuliert (Abb. 4.21).

Die Stimulation mit PDGF führte im Vergleich zur (Lösungsmittel-) Kontrolle des WT, in CREM-KO VSMCs zu einem Anstieg der Luciferase-Aktivität (Kontrolle: WT = 1;

CREM-KO $1,3 \pm 0,2$ RLU relativ zur WT-Kontrolle; PDGF: WT $1,0 \pm 0,2$ RLU relativ zur WT-Kontrolle, CREM-KO $2,9 \pm 0,4$ RLU relativ zur WT-Kontrolle). Die Luciferase-Aktivität in WT-VSMCs war nach PDGF-Stimulation nicht gesteigert. CREM bewirkte somit die Repression der CRE-vermittelten transkriptionellen Aktivität nach Stimulation mit PDGF.

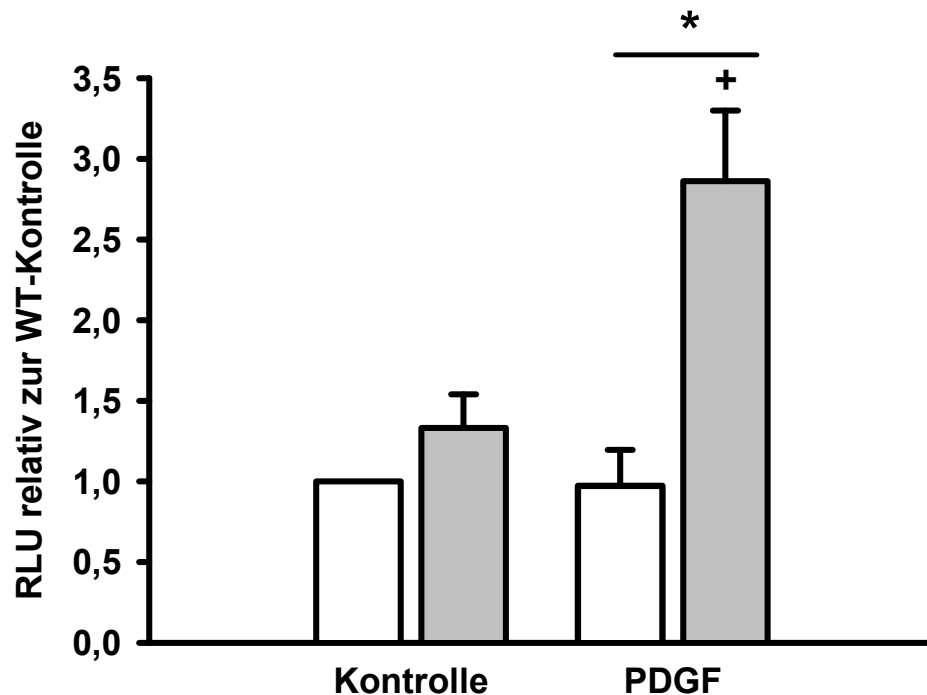


Abb. 4.21 CRE-vermittelte transkriptionelle Aktivität kultivierter VSMCs von CREM-KO (graue Balken) und WT-Mäusen (weiße Balken). Die transiente Transfektion primärer VSMCs mit einem Luciferase-Reportergenkonstrukt und Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF (7,5 ng/ml) über 9 Stunden führte ausschließlich bei CREM-KO VSMCs zu einem Anstieg der Luciferase-Aktivität. * $p < 0,05$ vs. WT (Mann-Whitney U-Test bei unabhängigen Stichproben); + $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Wilcoxon-Test bei abhängigen Stichproben). Die Daten wurden relativ zur jeweiligen WT-Kontrollprobe dargestellt. $n=5$; RLU, relative Lichteinheit.

4.5 Untersuchungen der Genregulation mittels RNA-Mikroarrays und quantitativer Real-Time PCR

Mittels Expressionsanalysen in Mikroarray-Untersuchungen PDGF-stimulierter VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen wurde nach Ziel-Genen der veränderten CRE-vermittelten transkriptionellen Aktivität gesucht. Durch die Expressionsanalysen sollten zusätzlich Ziel-Gene identifiziert werden, die in die anti-proliferativen Effekte

von CREM involviert sein könnten. Die Mikroarray-Analysen wurden als Dienstleistung im Leibniz-Zentrum für Atheroskleroseforschung (lifa) in Münster angefertigt. Die eingesetzten MouseWG-6 v2 Expressions BeadChips (Nr. BD-201-20202) der Firma Illumina decken über 34.000 annotierte Referenz-Sequenz-Transkripte der Maus (ProbeID) ab. Die relative mRNA-Expression der eingesetzten Proben wurde durch die Hybridisierung der Biotin-16-UTP-markierten cRNAs an komplementäre Bereiche der Referenz-Sequenzen, bestehend aus synthetischen 50-mer Oligonukleotiden bekannter RNA-Transkripte, ermittelt.

Mittels Mikroarray-Analyse wurden 319 mRNA-Transkripte identifiziert, deren Expressionen in CREM-KO VSMCs im Vergleich zum WT mindestens 1,4-fach hoch- bzw. 0,6-fach herabreguliert waren. Die Daten der Mikroarray-Untersuchung dieser mRNAs sind im Anhang (Tabelle 7.1) aufgeführt.

Zur weiteren Eingrenzung möglicher Ziel-Gene wurden Datensätze aussortiert, die aufgrund eines oder zweier falsch positiver Proben eine erhöhte oder verminderte RNA-Expression zeigten. Aus diesem Grund musste in der Auswertung der Mikroarray-Daten auch auf eine CREM-KO-Probe verzichtet werden, die zu mehreren falsch-positiven Daten führte. Weiterhin wurden Daten aussortiert bei denen keine ausreichende Signalstärke (im Vergleich zum jeweiligen Hintergrundsignal) nachweisbar war. Die Auswertung der Mikroarray-Untersuchungen wurde mit 5 unabhängigen CREM-KO-Proben und 6 unabhängigen WT-Proben durchgeführt.

Nach Auswertung der Mikroarray-Daten wurden ausgewählte RNA-Expressionen verschiedener Gene in quantitativen Real-Time PCRs, mittels LightCycler®-Analyse, validiert. Tabelle 4.2 zeigt die Ergebnisse der Mikroarray-Analyse für die in der Real-Time PCR validierten Gene. Für die Validierungen wurden RNA-Expressionen von 7 Genen (*Crem*, *Pnrc2*, *Zbtb38*, *Arhgap12*, *Taf12*, *Zmiz1* und *Twistnb*) ausgewählt, die im Mikroarray signifikant reguliert waren ($p < 0,05$). Weiterhin wurden 12 Gene (*Bat2d*, *Abhd1*, *Nfatc3*, *Pmaip1*, *Rgs5*, *Cxcl12*, *Cav2*, *Rock2*, *Pdgfra*, *Cacna2d1*, *Itga2* und *Agtrap*) validiert, deren RNA-Expressionen im Mikroarray zwar nicht signifikant verändert waren, die aber möglicherweise eine funktionelle Relevanz für die untersuchte Fragestellung darstellten. Als *Templates* der Real-Time PCRs dienten die, aus den isolierten Gesamt-RNAs synthetisierten, cDNA-Proben (siehe 2.7.3).

Anhand der Standardkurven konnten mit Hilfe der LightCycler®-Software die Konzentrationen der PCR-Produkte berechnet werden.

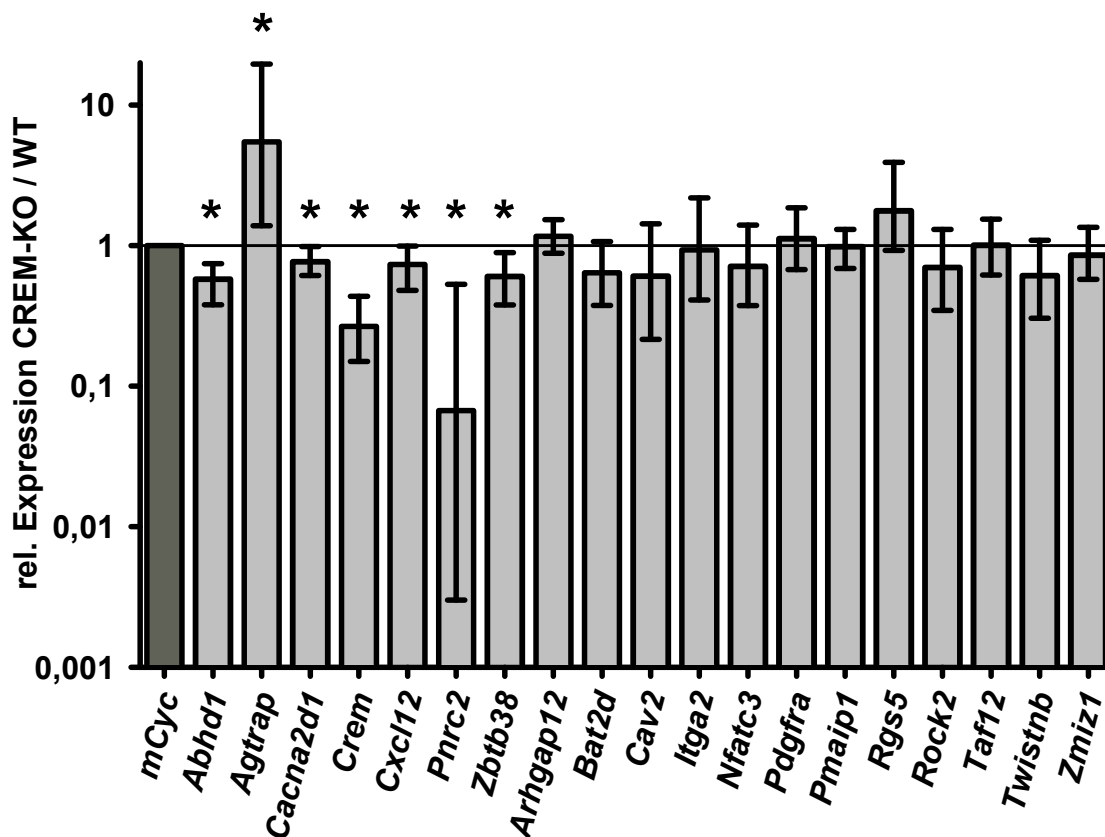
Tab. 4.2 Ausgewählte Ergebnisse der Mikroarray-Untersuchungen von CREM-KO und WT-VSMCs nach PDGF-Stimulation bezogen auf WT. Dargestellt sind RNA-Expressionen ausgewählter Gene aus der Mikroarray-Analyse, die mittels quantitativen Real-Time PCRs validiert wurden. Die mRNA-Spiegel dieser Gene waren in der statistischen Auswertung der Mikroarrays signifikant verändert ($p < 0,05$) oder waren im Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus von funktioneller Relevanz. CREM-KO n=5 Isolationen, WT n=6 Isolationen

Gen	ProbeID	P-Wert	KO/WT	DEFINITION
CREM	3130719	0,00	0,45	cAMP responsive element modulator (Crem), mRNA.
PNRC2	2850441	0,00	2,91	proline-rich nuclear receptor coactivator 2 (Pnrc2), mRNA.
ZBTB38	870040	0,00	1,77	zinc finger and BTB domain containing 38 (Zbtb38), mRNA.
ARHGAP12	5260114	0,01	0,57	Rho GTPase activating protein 12 (Arhgap12), transcript variant 2, mRNA.
TAF12	7040088	0,01	2,09	TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor (Taf12), mRNA.
ZMIZ1	5670523	0,01	1,63	zinc finger, MIZ-type containing 1 (Zmiz1), mRNA.
TWISTNB	5390129	0,02	1,72	TWIST neighbor (Twistnb), mRNA.
BAT2D	7000438	0,10	1,58	BAT2 domain containing 1 (Bat2d), mRNA.
ABHD1	5340500	0,15	0,62	abhydrolase domain containing 1 (Abhd1), transcribed RNA.
NFATC3	1050647	0,32	1,43	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3 (Nfatc3), mRNA.
PMAIP1	4060136	0,35	0,71	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (Pmaip1), mRNA.
RGS5	3170053	0,91	2,13	regulator of G-protein signaling 5 (Rgs5), mRNA.
CXCL12	20088	1,00	0,42	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (Cxcl12), transcript variant 3, mRNA.
CAV2	4480576	1,00	0,5	caveolin 2 (Cav2), mRNA.
ROCK2	2370575	1,00	0,65	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2 (Rock2), mRNA.
PDGFRA	5290521	1,00	1,41	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide (Pdgfra), transcript variant 1, mRNA.
CACNA2D1	4850156	1,00	1,45	calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1 (Cacna2d1), mRNA.
ITGA2	7400554	1,00	1,55	integrin alpha 2 (Itga2), mRNA.
AGTRAP	5260433	1,00	1,99	angiotensin II, type I receptor-associated protein (Agtrap), mRNA.

Bei der Untersuchung spezifischer mRNA-Spiegel mittels Real-Time PCR zeigte die CREM-KO-Probe, die in der Mikroarray-Untersuchung zu mehrfach falsch positiven Ergebnissen geführt hatte, im Vergleich zu Proben desselben Genotyps keine Unterschiede. Die Probe wurde deshalb in die Validierung der Mikroarray-Analysen einbezogen. Die Ergebnisse der Quantifizierung, der in den Real-Time PCRs validierten 19 Gene, sind in Abbildung 4.22 dargestellt.

Die mRNA-Expression des Cyclophilin A diente als interner Standard und war in den Quantifizierungen der Real-Time PCR nicht signifikant verändert. Die Expressionen der untersuchten Gene jeder Probe wurde auf das entsprechende Cyclophilin A (mCyc)-Signal derselben Probe standardisiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der REST®-Software.

Bei 8 Genen, die mittels Real-Time PCR validiert wurden (*Bat2*, *Cav2*, *Itga2*, *Nfatc3*, *Pdgfra*, *Pmaip1*, *Rgs5* und *Rock2*), zeigten die Mikroarray-Untersuchungen keine signifikant veränderten mRNA-Spiegel in CREM-KO VSMCs.



Gen	Expression	Std. Fehler	Real-Time-PCR	Mikroarray
<i>mCyc</i>	1		↔	↔
<i>Abhd1</i>	0,576	0,379 - 0,745	↓	↔
<i>Agtrap</i>	5,477	1,386 - 19,545	↑	↔
<i>Cacna2d1</i>	0,768	0,612 - 0,985	↓	↔
<i>Crem</i>	0,266	0,150 - 0,436	↓	↓
<i>Cxcl12</i>	0,734	0,480 - 0,992	↓	↔
<i>Pnrc2</i>	0,067	0,003 - 0,530	↓	↑
<i>Zbtb38</i>	0,602	0,378 - 0,892	↓	↑
<i>Arhgap12</i>	1,165	0,880 - 1,531	↔	↓
<i>Bat2d</i>	0,639	0,375 - 1,068	↔	↔
<i>Cav2</i>	0,606	0,215 - 1,429	↔	↔
<i>Itga2</i>	0,932	0,409 - 2,182	↔	↔
<i>Nfatc3</i>	0,712	0,374 - 1,397	↔	↔
<i>Pdgfra</i>	1,119	0,676 - 1,857	↔	↔
<i>Pmaip1</i>	0,982	0,686 - 1,302	↔	↔
<i>Rgs5</i>	1,767	0,924 - 3,908	↔	↔
<i>Rock2</i>	0,698	0,345 - 1,301	↔	↔
<i>Taf12</i>	1,006	0,617 - 1,542	↔	↑
<i>Twistnb</i>	0,611	0,304 - 1,091	↔	↑
<i>Zmiz1</i>	0,853	0,575 - 1,349	↔	↑

Abb. 4.22 Real-Time PCR zur Validierung der Mikroarray-Untersuchungen. Die in den Mikroarray-Analysen ausgewählten Gene wurden mittels Real-Time PCR validiert und auf die mRNA-Expression des internen Standards Cyclophilin A (*mCyc*) bezogen dargestellt. In den Real-Time PCRs waren die Expressionen von *Abhd1*, *Cacna2d1*, *Cxcl12*, *Crem*, *Pnrc2* und *Zbtb38*, in CREM-KO VSMCs im Vergleich zum WT signifikant herabreguliert. Die Expression von *Agtrap* war signifikant heraufreguliert. Die Tabelle zeigt zusätzlich die mRNA-Expression dieser Gene im Mikroarray. WT n=6, CREM-KO n=6, *p<0,05 KO/WT

Bat2, *Cav2*, *Itga2*, *Nfatc3*, *Pdgfra*, *Pmaip1*, *Rgs5* und *Rock2* waren in den Real-Time PCRs ebenfalls nicht signifikant reguliert. Die Inaktivierung von CREM hatte auf die Regulation dieser Gene keinen Einfluss.

Die in den Mikroarrays nachgewiesenen, gesteigerten Expressionen von *Taf12*, *Twistnb* und *Zmiz1* sowie die verminderte Expression von *Arhgap12* konnte in den Real-Time PCR-Analysen nicht bestätigt werden (siehe Tabelle in Abb. 4.22).

Die RNA-Expressionen von *Abhd1*, *Agtrap*, *Cacna2d1* und *Cxcl12* zeigten in den Mikroarray-Analysen in CREM-KO VSMCs keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem WT. In den Real-Time PCR-Untersuchungen waren die mRNAs dagegen signifikant verändert. In CREM-KO VSMCs waren *Abhd1*, *Cacna2d1* und *Cxcl12* im Vergleich zum WT signifikant herabreguliert. *Agtrap* war am stärksten in seiner Expression verändert und in CREM-KO VSMCs im Vergleich zum WT 5,5-fach heraufreguliert. Die Inaktivierung von CREM hatte einen Einfluss auf die Expression von *Abhd1*, *Agtrap*, *Cacna2d1* und *Cxcl12*.

Die mRNA-Expression von *Crem* war in den Mikroarray-Untersuchungen in den CREM-KO VSMCs signifikant erniedrigt. In der Real-Time PCR konnte eine Herabregulation der RNA-Expression von *Crem* bestätigt werden.

Die mRNA-Expressionen von *Pnrc2* und *Zbtb38* in CREM-KO VSMCs waren in den Mikroarray-Untersuchungen signifikant gesteigert. In den Real-Time PCR-Analysen war die Expression diese Gene dagegen herabreguliert (vgl. Tab. 4.2 und Abb. 4.22). Der Grund für diese Unstimmigkeit ist unklar. Die geringe Anzahl unabhängiger Proben pro Genotyp könnte in den Mikroarray-Untersuchungen zu diesen unklaren Ergebnissen geführt haben. Die limitierte Proben-Anzahl stellt ein bekanntes Problem bei Mikroarray-Analysen dar, denn die zeitgleiche Untersuchung tausender von Genen mit wenigen Replikaten kann dabei auf Kosten der Aussagekraft des Experiments ausfallen (Fan et al. 2010). Die Ergebnisse der Real-Time PCRs waren dagegen auch in einer Wiederholung reproduzierbar. Es musste daher von einer korrekten Expressionsanalyse durch die Real-Time PCRs ausgegangen werden. Ein Einfluss der CREM-Inaktivierung auf die Regulation von *Pnrc2* und *Zbtb38* wurde daher ebenfalls angenommen.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Rolle der Transkriptionsfaktoren CREB und CREM in Blutgefäßen, bzw. in vaskulären Glattmuskelzellen (vascular smooth muscle cells, VSMCs) unter physiologischen Bedingungen und im Zusammenhang mit Mechanismen zu untersuchen, die vaskuloproliferativen Erkrankungen zugrunde liegen. Die Transkriptionsfaktoren der CREB/CREM-Familie werden durch zyklische Nukleotide (z.B. cAMP- und cGMP-Analoga) und auch durch eine Vielzahl weiterer extrazellulärer Stimuli und Signalwege aktiviert. Extrazelluläre Stimuli, die über verschiedene Signalwege die Phosphorylierung von CREB bewirken, sind dabei u.a. Wachstumsfaktoren, z.B. PDGF, Zytokine, z.B. TNF β , und Steroid- und Peptidhormone, z.B. Östrogene und Angiotensin II. Viele dieser Signalwege führen z.B. über die Aktivierung von MAP-Kinasen (mitogen activated protein kinases), z.B. ERK (extracellular signal regulation kinase) und p38MAPK, zu einer CREB-Phosphorylierung (Johannessen et al. 2004). Weiterhin kann ein Anstieg des intrazellulären Kalzium-Spiegels die Phosphorylierung von CREB durch Calmodulin-abhängige Proteinkinasen bewirken (Wu et al. 2001).

CREB ist in die Regulation der Expression von Genen involviert, die eine Bedeutung für Proliferation, Differenzierung und das Überleben verschiedener Zelltypen haben. Mehrere Studien gaben Hinweise auf einen entsprechenden Einfluss von CREB auf die Wachstumsregulation von VSMCs und auf den vaskulären Umbauprozess nach Gefäßverletzungen (Ichiki 2006, Schauer und Reusch 2009). Die Befunde der vorliegenden Arbeit belegen erstmals anhand genetischer Mausmodelle, dass die Regulation der Genexpression durch CREB und CREM im vaskulären System eine bedeutende Rolle spielt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an glattmuskelzellspezifischen CREB-defizienten und CREM-defizienten Mäusen werden zur besseren Übersicht zunächst nach Modellen getrennt diskutiert.

5.1 Validierung der glattmuskelzellspezifischen Deletion von CREB in gmCREB-KO Mäusen

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von CREB im Gefäßsystem wurden in der vorliegenden Arbeit Mäuse mit induzierter, glattmuskelzellspezifischer Deletion des *Creb*-Gens eingesetzt. Die glattmuskelzellspezifische Inaktivierung von CREB erfolgte mit Hilfe des *Cre/loxP*-Systems und basiert auf der Verwendung von Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinasen. Tamoxifen-aktivierbare Cre-Rekombinasen (CreER-Rekombinasen) entstehen durch Fusion von Cre mit mutierten Ligandenbindungs-Domänen (LBD) des Östrogenrezeptors (ER). CreER-Rekombinasen liegen zunächst in inaktiver Form vor, können aber durch den partiellen ER-Antagonisten Tamoxifen aktiviert werden (Feil et al. 1996, Feil et al. 1997). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Mauslinie SM-iCRE-ER^{T2}-Cre-Creb^{fl/fl} wurde generiert durch Kreuzung von Mäusen der Linie CREB^{loxP}, in deren Genom das Exon 10 des *Creb*-Genes durch *loxP*-Elemente flankiert wird (Mantamadiotis et al. 2002), mit Mäusen der Linie SM-iCRE-ER^{T2}, die das Fusionsprotein der Cre-Rekombinase und des modifizierten Östrogenrezeptors unter Kontrolle des glattmuskelzellspezifischen SMMHC (smooth muscle myosin heavy chain)-Promotors exprimieren (Wirth et al. 2008). Diese Kreuzung ermöglicht eine glattmuskelzellspezifische, Tamoxifen-abhängige Aktivierung der Cre-Rekombinase und dadurch die spezifische und kontrollierte Exzision des Exon 10 des *Creb*-Gens. Durch die Exzision des Exon 10 kommt es zu Bildung eines CREB-Null-Allels, welches für ein trunkiertes und instabiles CREB Protein kodiert, dem die Dimerisations- und DNA-Bindungsdomänen fehlen (Mantamadiotis et al. 2002).

Die Inaktivierung von CREB bei Mäusen der Linie SM-iCRE-ER^{T2}-Cre⁺-Creb^{fl/fl} (gmCREB-KO) erfolgte durch interperitoneale Injektionen von Tamoxifen (1 mg in Neutralöl) an fünf aufeinander folgenden Tagen. Nach Ende der Behandlung fällt der Serumspiegel von Tamoxifen bei Mäusen mit einer Halbwertszeit von 7-14 Tagen ab (Fromson et al. 1973, Jordan 1982). Um mögliche anti-östrogene Effekte des Tamoxifens in den verschiedenen Versuchen ausschließen zu können, sollte das Tamoxifen vor Versuchsbeginn vollständig metabolisiert sein. Aus diesem Grund wurden die Versuchstiere erst 8 Wochen nach Behandlungsende in Versuchen eingesetzt. Es wurden ausschließlich männliche Versuchstiere untersucht, um eine

Aktivierung der Cre-Rekombinase durch körpereigene Östrogene auszuschließen. Männliche Wurfgeschwister Tamoxifen-behandelter Mäuse wurden analog mit Neutralöl behandelt und dienten als Kontrollen (Kontroll-Mäuse). Die Überprüfung der *Creb*-Exzision in glattmuskelzellulärem Gewebe erfolgte anhand des Nachweises des Null-Allels mittels PCR in verschiedenen Organen Tamoxifen- bzw. Neutralöl-behandelter SM-iCRE-ER^{T2}-Cre-*Creb*^{fl/fl}-Mäuse.

In glattmuskelzellreichen Organen Neutralöl-behandelter Kontroll-Mäuse wurde das Null-Allel mittels PCR erwartungsgemäß nicht nachgewiesen. Stattdessen konnte das *loxP*-Allel, als Nachweis der *Creb*-Genmodifikation, identifiziert werden. In glattmuskelzellreichen Organen Tamoxifen-behandelter gmCREB-KO Mäuse wurde das Null-Allel dagegen nachgewiesen. Die zusätzliche Amplifizierung des *loxP*-Allels in Lunge und Skelettmuskel kann durch die Expression CREB-positiver Fibroblasten, Endothelzellen und anderer, nicht-glatter Muskelzellen, wie sie in Skelettmuskel und Lunge zahlreich vertreten sind, erklärt werden. Durch die Ergebnisse der PCR konnte somit die Gewebespezifität des Knockouts sowie die Abhängigkeit der Deletion von der Tamoxifen-abhängigen Aktivierung der Cre-Rekombinase belegt werden.

CREB-spezifische Immunfluoreszenz-Färbungen bestätigten ebenfalls die erfolgreiche, glattmuskelzellspezifische Inaktivierung von CREB in aortalen Gewebeschnitten von gmCREB-KO Mäusen. Dabei wurden CREB-positive Zellkerne in Endothelzellen und im anhaftenden Gewebe, aber nicht in der glattmuskelzellreichen Media nachgewiesen. Aortale Gewebeschnitte Neutralöl-behandelter Kontroll-Tiere zeigten in immunhistologischen Untersuchungen neben CREB-positiven Zellkernen der Endothelzellen und Fibroblasten des anhaftenden Gewebes, auch CREB-positive Zellkerne in den Glattmuskelzellen der Media.

Anhand der PCR und der immunhistologischen Befunde kann somit für die nachfolgenden *ex vivo* bzw. *in vivo* Untersuchungen von einer erfolgreichen glattmuskelzellspezifischen CREB-Inaktivierung ausgegangen werden.

5.2 Untersuchungen an gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen

Mäuse mit glattmuskelzellspezifischer CREB-Inaktivierung zeigten im Vergleich zu Kontroll-Mäusen in gefäßmyographischen Untersuchungen von Aortenringen eine verminderte Potenz von Isoprenalin in der β -Adrenozeptor-vermittelten Relaxation

sowie eine gesteigerte Apoptose in Gefäßschnitten der Aorta. In einem Modell der Atherogenese führte die glattmuskelzellspezifische CREB-Inaktivierung zu einer vermehrten atherosklerotischen Plaquebildung.

Die Identifizierung apoptotischer VSMCs erfolgte mit Hilfe des TUNEL-Assays in aortalen Gefäßschnitten von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen. Der Anteil apoptotischer Zellen in Aorten von gmCREB-KO Mäusen war dabei im Vergleich zu Aorten von Kontroll-Mäusen gesteigert. In verschiedenen Studien wurde ein anti-östrogener Einfluss von Tamoxifen auf die Regulation des Zellzyklus und der Apoptose diskutiert (Feng et al. 2010, Dalvai und Bystricky 2010). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit C57Bl6-Wildtyp-Mäuse, analog zu den gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen, mit Tamoxifen bzw. Neutralöl behandelt und hinsichtlich der Apoptose untersucht. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen in Aorten Tamoxifen-behandelter C57Bl6-Mäuse war dabei im Vergleich zu Aorten Neutralöl-behandelter C57Bl6-Mäuse nicht verändert. Ein Einfluss des Tamoxifens auf die gesteigerte Apoptose in Aorten von gmCREB-KO Mäusen konnte somit ausgeschlossen werden. Ein Effekt der CREB-Inaktivierung auf die gesteigerte Apoptose ist somit anzunehmen. In Studien wurde die Bedeutung von CREB für die Regulation der Apoptose, neben verschiedenen anderen Zelltypen, auch in VSMCs beobachtet (Schauer et al. 2010, Tokunou et al. 2003, Enis et al. 2008). Tokunou et al. (2003) zeigten, dass die Überexpression einer dominant-negativen Isoform von CREB in VSMCs zu einer erhöhten Apoptoserate führt. Die gesteigerte Apoptose korreliert dabei mit einer erniedrigten Expression von Bcl-2, einem anti-apoptotisch wirkenden Protein und CREB Ziel-Gen (Tokunou et al. 2003, Zhang et al. 2005). Es könnte somit angenommen werden, dass die Inaktivierung von CREB in der vorliegenden Arbeit zu einer Steigerung des Prozentsatzes apoptotischer Zellen durch eine Hemmung der Bcl-2-Expression führte. Weitere Untersuchungen müssen allerdings einen möglichen Zusammenhang zwischen CREB und Bcl-2-Expression in Aorten von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen klären.

Untersuchungen der Proliferation in Aorten von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen zeigten keine Unterschiede im Anteil proliferierender Zellen unter basalen Bedingungen. Zahlreiche Studien belegen, dass CREB an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist und korrelieren dabei sowohl pro- als auch anti-proliferative

Effekte mit einer vermehrten Phosphorylierung von CREB. Einige Studien, die einen pro-proliferativen Einfluss von CREB vermuten, assoziieren eine vermehrte Phosphorylierung und eine damit einhergehende Aktivierung von CREB mit einer Aktivierung der Proliferation von VSMCs (Jiang et al. 2008, Wang und Murphy 2000; Ono et al. 2004, Tokunou et al. 2001).

Ein anti-proliferativer Einfluss von CREB wird dagegen ebenfalls postuliert. Kamiya et al. (2007) korrelieren eine verminderte VSMC-Proliferation, hervorgerufen durch Stimulation mit dem Zytokin TGF β (transforming growth factor β), mit einer vermehrten Phosphorylierung von CREB. Eine Studie von Klemm et al. (2001) zeigte einen anti-proliferativen Einfluss von CREB durch die Korrelation von CREB-Spiegeln und VSMC-Proliferation *in vivo* und *in vitro*. In *in vitro*-Untersuchungen waren die CREB-Spiegel kultivierter Kälber VSMCs unter Serumentzug erhöht und unter Stressbedingungen (Hypoxie und PDGF-Stimulation) reduziert. Da Serumentzug eine gehemmte und Hypoxie-Bedingungen und Stimulation mit PDGF eine gesteigerte Proliferation der VSMCs bewirkten, wurde ein anti-proliferativer Effekt von CREB postuliert (Klemm et al. 2001). Im Weiteren konnte diese Arbeitsgruppe in bovinen aortalen Gewebeschnitten einen erhöhten Anteil CREB-positiver VSMCs in der adulten, nicht-proliferativen, Media nachweisen. In Bereichen proliferierender VSMCs des Subendothels war der Anteil CREB-positiver Zellen dagegen erniedrigt. Somit wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf eine negative Korrelation zwischen CREB-Spiegel und Proliferationsrate geschlossen. In weiteren Untersuchungen, bei denen die Überexpression von konstitutiv aktiven CREB-Konstrukten mit einer verminderten Expression verschiedener Zellzyklus- und Wachstums-abhängiger Genprodukte (z.B. Zyklin D2 und PDGF- α -Rezeptor) einherging, wurde ebenfalls ein anti-proliferativer Effekt von CREB assoziiert (Klemm et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte ein Einfluss von CREB auf die Proliferation dagegen nicht festgestellt werden. Dies könnte in Spezies- bzw. Zelltyp-abhängigen Unterschieden begründet sein. Wie bereits diskutiert, wiesen Klemm et al. (2001) erhöhte Proliferationsraten in subendothelialen VSMCs boviner Aorten nach. Murine Aorten verfügen aber, im Gegensatz zu bovinen, nicht über subendotheliale VSMCs. Daher war die Bewertung der basalen Proliferation in der vorliegenden Arbeit nur auf den Bereich der adulten Media beschränkt. Der Prozentsatz proliferierender Zellen wurde in murinen Gefäßschnitten von je 6 gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen bestimmt.

Dabei wurden im Mittel 4250 VSMCs pro Tier ausgewertet. Aufgrund der niedrigen Proliferationsrate ausdifferenzierter VSMCs der Media, konnten dabei nur vereinzelt proliferierende Zellen nachgewiesen werden (<0,05 % proliferierende VSMCs). Es können daher nur starke Veränderungen in der Proliferation detektiert werden. Die Inaktivierung von CREB bewirkte demnach keine starken Veränderungen der Proliferation, kleine Veränderungen können aber aufgrund der niedrigen Fallzahlen nicht ausgeschlossen werden.

Mit Hilfe eines etablierten Atherogenese-Modells wurde die Rolle von CREB in der Pathogenese der Atherosklerose untersucht. SM-iCRE-ER^{T2}-Cre-Cre^{fl/fl}-Mäuse wurden mit Apolipoprotein E (ApoE)-defizienten Mäusen gekreuzt und zur Inaktivierung von CREB, analog zu den bereits beschriebenen Versuchen, mit Tamoxifen bzw. Neutralöl behandelt. Mäuse mit homozygoter ApoE-Mutation weisen, unabhängig von Alter und Geschlecht, stark erhöhte Plasmacholesterinspiegel sowie eine erhöhte atherosklerotische Plaquebildung auf (Zhang et al. 1992). Sie sind deshalb für die Untersuchungen der atherosklerotischen Plaqueentwicklung gut geeignet. Zur weiteren Steigerung der Plaquebildung wurden gmCREB-KO x ApoE-KO und ApoE-KO Kontroll-Mäuse zusätzlich für 30 Wochen mit einer atherogenen Spezialdiät gefüttert. In Aorten beider Genotypen wurden, in Folge der atherogenen Spezialdiät, mittels Oil-red-O Färbungen lipidreiche Areale nachgewiesen. Diese lipidreichen Areale sind Zeichen einer atherosklerotischen Plaquebildung. Bei gmCREB-KO x ApoE-KO Mäusen war der Anteil lipidreicher Flächen und damit die atherosklerotische Plaquebildung im Vergleich zu ApoE-KO Kontroll-Mäusen gesteigert. Dieser Befund spricht somit für einen protektiven Einfluss von CREB auf die atherosklerotische Plaquebildung. Verschiedene Studien zur Atherogenese postulieren ebenfalls einen gefäßprotektiven Einfluss von CREB. Dieser protektive Einfluss wurde auf anti-oxidative Effekte von CREB zurückgeführt, denn die Reduktion von oxidativem Stress, der z.B. durch Oxidation von LDL entsteht, kann das Fortschreiten der Atherosklerose verlangsamen (Schauer et al. 2010). Eine Heraufregulation der oxidativen Abwehr durch CREB, z.B. durch die Heraufregulation der Hämoxxygenase-1 (HO-1), bewirkt daher eine Verminderung der atherosklerotischen Plaquebildung (Krönke et al. 2003, Schauer et al. 2010). Neben einer anti-oxidativen Wirkung konnten u.a. auch anti-apoptische Eigenschaften von

HO-1 nachgewiesen werden (Krönke et al. 2003, Kie et al. 2008). In einer Studie an einem Ratten-Modell einer obstruktiven Nephropathie wurde eine erhöhte HO-1-Expression mit einer gesteigerten Bcl-2-Expression korreliert. Bcl-2 wirkt anti-apoptotisch und stellt, wie bereits beschrieben, ebenfalls ein Ziel-Gen von CREB in Gefäßen dar (Kim et al. 2006, Tokunou et al. 2003). Es könnte somit spekuliert werden, dass die in der vorliegenden Arbeit gezeigten anti-apoptotischen Eigenschaften von CREB zu der gefäßprotektiven Wirkung von CREB beitragen. Ein Verlust der CREB-Funktion in VSMCs könnte somit möglicherweise durch die Hemmung von anti-oxidativen und anti-apoptotischen Mechanismen zu einer gesteigerten atherosklerotischen Plaquebildung geführt haben.

Neben der Rolle von CREB in der Atherogenese wurde, in einem weiteren vaskulären Stressmodell, die Rolle von CREB bei Gefäßverletzungen untersucht. In diesem Modell wurde durch Ligation der A. carotis die Bildung einer Neointima hervorgerufen (Ip et al. 1990). Dabei wurde, 3 Wochen nach Ligation, kein Unterschied in der Neointimafläche in Gefäßschnitten der Carotisarterien von gmCREB-KO Mäusen und Kontroll-Mäusen festgestellt.

Dieser Befund steht im Gegensatz zu experimentellen Daten verschiedener Studien, bei denen, nach Hemmung der *Creb*-Funktion mittels adenoviraler Transduktion von dominant-negativen CREB-Isoformen in Ballon-Katheter-verletzten Carotisarterien von Ratten, eine verminderte Neointimabildung beobachtet wurde (Tokunou et al. 2003, Chava et al. 2009). Tokunou et al. (2003) zeigten, konsistent mit den Befunden dieser Arbeit, eine gesteigerte Apoptose der VSMCs und erklärten damit die verminderte Neointimabildung. Chava et al. (2009) erklärten den von ihnen beobachteten Effekt der verminderten Neointimabildung mit einer gehemmten Migration und Proliferation von VSMCs, hervorgerufen durch die Hemmung der *Creb*-Funktion.

Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Befunde hinsichtlich der Neointimabildung in den gezeigten Studien und der vorliegenden Arbeit, könnte im experimentellen Ansatz der Inaktivierung von CREB liegen. Die Überexpression von dominant-negativem CREB blockiert die CRE-Bindungsstelle und hemmt so prinzipiell nicht nur die Funktion von *Creb*, sondern auch die Funktion von *Crem* und *Atf-1*. Das eingesetzte Modell in der vorliegenden Arbeit ist dagegen zur Beurteilung

der *Creb*-Funktion spezifischer, da die Exzision des Exons 10 des *Creb*-Gens ausschließlich die Inaktivierung von CREB bewirkt (Mantamadiotis et al. 2002). Die Ergebnisse hinsichtlich der Neointimabildung sind daher zwischen den verschiedenen Modellen nur schwer zu vergleichen.

CREB-spezifische Immunfluoreszenzfärbungen an Gefäßschnitten ligierter Carotisarterien von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen dienten der Überprüfung der glattmuskelzellspezifischen CREB-Inaktivierung in der Neointima. In Gefäßschnitten von Kontroll-Mäusen konnte CREB erwartungsgemäß in den Zellen der Media und Neointima nachgewiesen werden. In der Neointima ligierter Carotisarterien von gmCREB-KO-Mäusen wurden allerdings ebenfalls CREB-positive Zellen detektiert. Gleichzeitig wurde in VSMCs der Media dieser Tiere kein CREB nachgewiesen, so dass die erfolgreiche, glattmuskelzellspezifische CREB-Inaktivierung in der Media bestätigt wurde. Anhand weiterer Untersuchungen in dieser Arbeit, bei denen der VSMC-Anteil in der Neointima ligierter Carotisarterien von CREM-KO und WT-Mäusen bestimmt wurde, ist von einem gewissen Anteil glattmuskulärer Zellen in der Neointima auszugehen. Demnach müssten auch VSMCs in der Neointima von gmCREB-KO Mäusen vorhanden sein. Diese VSMCs sollten dann eine CREB-Inaktivierung aufweisen. Bei dem in der vorliegenden Arbeit angewendeten Modell der glattmuskelzellspezifischen CREB-Inaktivierung durch Liganden-aktivierte Cre-Rekombinasen kann allerdings nicht von einer 100%igen CREB-Inaktivierung aller VSMCs ausgegangen werden (Feil et al. 1996). Da in den Zellen der Neointima keine CREB-Inaktivierung gezeigt werden konnte, muss also angenommen werden, dass nur CREB-positive VSMCs von der Media in die Neointima migriert sind und es damit zu einer Selektion CREB-positiver VSMCs kam. Die Selektion CREB-positiver VSMCs würde auch eine Erklärung für den erfolglosen Versuch der primären Kultivierung von gmCREB-KO VSMCs darstellen. Die Isolation primärer VSMCs erfolgte durch Aussprossen aus aortalem Gewebepulver. Bei der VSMC-Isolation aus Aorten von gmCREB-KO Mäusen waren alle ausgesprossenen VSMCs ausschließlich CREB-positiv. CREB ist somit möglicherweise für die Migration von VSMCs essentiell. Eine weitere Begründung für das Auftreten CREB-positiver VSMCs in der Neointima von gmCREB-KO Mäusen könnte im Nachweis des trunkierten CREB-Proteins zu suchen sein. Mantamadiotis et al. (2002) gingen bei der CREB-Inaktivierung zwar von einer Instabilität des trunkierten CREB-Proteins aus, dennoch

wäre es möglich, dass es nicht, bzw. erst zu einem späteren Zeitpunkt, zu einem Abbau des trunkierten CREB-Proteins kommt. CREB wäre dann trotzdem immunhistologisch nachweisbar, obwohl es nicht funktionell aktiv ist.

Mit einem Myographen nach Mulvany (Mulvany und Halpern 1977) können vom Gefäß erzeugte Wandspannungen nach Zugabe vasoaktiver Substanzen gemessen werden. Das Kontraktionsverhalten isolierter Gefäßringe von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen wurde auf diese Weise myographisch untersucht. Die Stimulation mit Phenylephrin, einem α_1 -Adrenozeptor-Agonisten, bewirkt eine Vasokonstriktion der Gefäße. Die einmalige Gabe von 1×10^{-6} M Phenylephrin führte in Aortenringen von gmCREB-KO Mäusen zu einer gesteigerten Vasokonstriktion im Vergleich zu Aortenringen von Kontroll-Mäusen. Die gesteigerte Vasokonstriktion korrelierte dabei mit der gemessenen Vasokonstriktion der vorausgegangenen Kalium-Stimulation. Die Kalium-korrigierten Wandspannungen zeigten daher keine Unterschiede zwischen gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen. In weiteren Untersuchungen der α_1 -Adrenozeptor-vermittelten Vasokonstriktion wurden nach Stimulation mit steigenden Phenylephrin-Konzentrationen (1×10^{-9} bis 1×10^{-5} M) keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt. Ein Einfluss von CREB auf die α_1 -Adrenozeptor-vermittelte Vasokonstriktion konnte somit ausgeschlossen werden.

Die β_2 -Adrenozeptor-vermittelte Relaxation wird über die Aktivierung der Adenylatzyklase und die Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Glattmuskelzelle vermittelt. In gefäßmyographischen Untersuchungen wurde bei gmCREB-KO Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen eine verminderte Potenz des β -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin hinsichtlich der Relaxation der Aortenringe festgestellt. Um, analog zu vorangegangenen Untersuchungen, eine anti-östrogene Wirkung des Tamoxifens als mögliche Ursache für die verminderte Potenz von Isoprenalin auszuschließen, wurden C57Bl6-Mäuse mit Tamoxifen und Neutralöl behandelt. Isolierte Aortenringe dieser Mäuse wiesen keine Unterschiede in der Potenz von Isoprenalin hinsichtlich der Relaxation auf, so dass die Tamoxifen-Behandlung als Ursache für die verminderte Relaxation ausgeschlossen werden kann. Veränderungen des Blutdrucks und der Herzfrequenz von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen, die die Aorten-Physiologie beeinflussen würden, konnten mittels Links-Herz-Katheterisierung ebenfalls ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt,

Messungen von K. Schulte, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Münster). Die verminderte β -Adrenozeptor-vermittelte Relaxation, entsprechend einer verminderten Potenz von Isoprenalin, in den gmCREB-KO Mäusen, kann somit auf die Inaktivierung von CREB zurückgeführt werden.

Um den Einfluss des cAMP-abhängigen Signalwegs auf die Relaxation der Aortenringe näher zu charakterisieren, wurde weiterhin ein Effekt der direkten Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin untersucht. Die Effekte einer Forskolin-Stimulation auf die Relaxation waren in Aorten von gmCREB-KO und Kontroll-Mäusen nicht verschieden. Es ist also davon auszugehen, dass die Befunde in der Relaxation nach Isoprenalin-Stimulation durch funktionelle Mechanismen hervorgerufen werden, die in Betrachtung des Signalwegs oberhalb der Adenylatzyklase liegen. Prinzipiell denkbar ist, dass die Inaktivierung von CREB eine verminderte Expression von β_2 -Adrenozeptoren in VSMCs bewirkt. Aus der Literatur ist bekannt, dass das Gen des β_2 -Adrenozeptors ein CRE-Element, 270 Basenpaare oberhalb des Start-Codons, aufweist (Scott et al. 1999). Es stellt somit ein potentiell Ziel-Gen von CREB dar. Durch die Inaktivierung von CREB in VSMCs könnte es somit zu einer Herabregulation von β_2 -Adrenozeptoren kommen, was eine Erklärung für die verminderte Potenz von Isoprenalin hinsichtlich der Relaxation darstellen würde.

Carbachol vermittelt die Freisetzung des ERDFs (endothelial derived relaxing factors; NO) aus Endothelzellen. Dadurch kommt es zu einer Stimulation der löslichen Guanylatzyklase in VSMCs und schließlich zur Vasodilatation der Gefäße (Furchgott und Zawadzki 1980, Bolton und Clapp 1986). In gefäßmyographischen Untersuchungen zeigte die Stimulation mit steigenden Carbachol-Konzentrationen bei gmCREB-KO Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen eine verminderte Effektivität von Carbachol auf die Relaxation. Die Potenz von Carbachol war dabei unverändert. In gefäßmyographischen Untersuchungen mit dem NO-Donor Nitroprussid-Natrium (SNP) konnten dagegen keine Veränderungen der Relaxation festgestellt werden. Ein NO-Effekt auf die Vasodilatation, entsprechend der cGMP-abhängigen Signaltransduktion in VSMCs, konnte daher ausgeschlossen werden.

Eine Möglichkeit, die die verminderte Effektivität von Carbachol auf die Relaxation erklären würde, stellt die Wirkung von Carbachol auf muskarinerge M-

Cholinozeptoren der glatten Muskelzellen dar. Carbachol vermittelt dabei durch Aktivierung der M₃-Cholinozeptoren und der Komponenten des PLC/IP₃-vermittelten Signalwegs eine Kontraktion der glatten Muskulatur (van Zwieten und Doods 1995, Klinke / Pape / Silbernagl; 2005, Lehrbuch der Physiologie 5. Auflage). Der Befund einer verminderten Effektivität von Carbachol auf die Relaxation in gmCREB-KO Mäusen könnte daher im Sinne eines funktionellen Antagonismus zu der NO-Wirkung verändert sein. Ein Einfluss von CREB auf die M₃-Cholinozeptoren oder Komponenten des PLC/IP₃-vermittelten Signalwegs kann somit ebenfalls angenommen werden.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass CREB in der Physiologie von VSMCs eine wichtige Rolle spielt. Darüber hinaus scheint CREB im vaskulären Umbauprozess der Atherosklerose und möglicherweise auch in anderen gefäßproliferativen Erkrankungen relevant zu sein.

5.3 Untersuchungen an CREM-KO und WT-Mäusen

In Voruntersuchungen an CREM-KO und WT-Mäusen konnte ein Einfluss einer CREM-Inaktivierung auf die Gefäßkontraktilität nicht nachgewiesen werden. Die basale Proliferation und Apoptose in aortalen Gefäßschnitten von CREM-KO und WT-Mäusen war ebenfalls nicht verschieden (unveröffentlichte Daten von M. Seidl, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Münster). In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss der CREM-Inaktivierung auf die Regulation der Genexpression im vaskulären System und auf die Pathophysiologie vaskulärer Erkrankungen charakterisiert werden. Hauptbefunde dieser Arbeit waren eine gesteigerte Neointimabildung bei CREM-KO Mäusen in einem Modell einer Gefäßschädigung (Carotis-Ligation) sowie eine gesteigerte PDGF-vermittelte Proliferation in kultivierten CREM-KO VSMCs *in vitro*. In einem Atherogenese-Modell bewirkte die Inaktivierung von CREM eine vermehrte atherosklerotische Plaquebildung.

Mit einem *in vivo* Carotis-Ligations-Modell sollte der Einfluss von CREM auf die Pathophysiologie des Gefäßumbaus untersucht werden. Dabei führt die Ligation der

Carotisarterie zur Bildung einer Neointima. In Carotisarterien von CREM-KO Mäusen wurde, 3 Wochen nach Ligation, eine signifikant gesteigerte Neointimabildung im Vergleich zu Carotisarterien von WT-Mäusen festgestellt. Dieser Befund lässt auf eine inhibierende Rolle von CREM in der Neointimabildung schließen.

Da es bei der Neointimabildung zur Infiltration von Entzündungszellen und damit zur veränderten Expression von Zell-Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und VSMCs kommen kann (Newby und Zaltsman 2000, Braun et al. 1999), wurden Gefäßschnitte ligierter Carotisarterien von CREM-KO und WT-Mäusen immunhistologisch auf die Expression der Zell-Adhäsionsmoleküle VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) untersucht. VCAM-1 vermittelt den Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen und ICAM-1 den Kontakt zwischen Endothelzellen und Leukozyten mit Zellen der extrazellulären Matrix (Yang et al. 2005, Carlos und Harlan 1994). Weiterhin konnten die Adhäsionsmoleküle auch in VSMCs atherosklerotischer Läsionen sowie in der Media und Neointima nach Gefäßverletzungen nachgewiesen werden. Die Bedeutung der VCAM- und ICAM-Expression auf VSMCs ist dabei weitgehend ungeklärt. Neben einer Beteiligung an der Akkumulierung infiltrierter Leukozyten in der Gefäßwand wird auch eine Bedeutung als VSMC-Differenzierungsmarker diskutiert (Braun et al. 1999, Libby und Li 1993, Wolfgruber et al. 2003). Der immunhistologische Nachweis von VCAM-1 und ICAM-1 in der vorliegenden Arbeit unterschied nicht zwischen einer Expression auf Endothelzellen bzw. VSMCs. Die nachgewiesene Expression von VCAM-1 und ICAM-1 gibt daher nur einen Hinweis auf die Aktivierung des Endothels sowie die Leukozyten-Infiltration und Akkumulierung bei der Neointimabildung. In der vorliegenden Arbeit konnten beide Adhäsionsmoleküle in der Neointima ligierter Carotisarterien von CREM-KO und WT-Mäusen nachgewiesen werden. Die Inaktivierung von CREM hatte auf die VCAM-1 und ICAM-1 Expression dabei keinen Einfluss. Eine Expression von Adhäsionsmolekülen und damit die Infiltration von Leukozyten in die Gefäßwand kann daher die gesteigerte Neointimabildung nach CREM-Inaktivierung nicht erklären.

Die Entstehung einer Neointima beruht weiterhin auf einer gesteigerten Proliferation von VSMCs (Clowes et al. 1983). Um zu überprüfen, ob der Befund der gesteigerten Neointimabildung von CREM-KO Mäusen mit einer gesteigerten Proliferation von VSMCs assoziiert ist, wurde der prozentuale Anteil proliferierender VSMCs in

Gefäßschnitten ligierter Carotisarterien von CREM-KO und WT-Mäusen bestimmt. Dazu wurden Ki67- und α -Glattmuskelaktin-spezifische Doppelfärbungen durchgeführt, um proliferierende Glattmuskelzellen in Media und Neointima zu identifizieren. Der Prozentsatz proliferierender VSMCs in der Neointima zeigte zwischen den untersuchten Gruppen keine Unterschiede. Dagegen konnte in VSMCs der Media von CREM-KO Mäusen eine signifikant gesteigerte Proliferation im Vergleich zu VSMCs von WT-Mäusen festgestellt werden. Damit kann auf einen anti-proliferativen Effekt von CREM in VSMCs der Media geschlossen werden. Eine Steigerung der VSMC-Proliferation, hervorgerufen durch die Inaktivierung von CREM, stellt damit eine mögliche Erklärung für den Befund der CREM-vermittelten Hemmung der Neointimabildung dar.

Ohtsubo et al. (2007) untersuchten die Rolle von ICER, einer induzierbaren, repressorischen CREM-Isoform, in der Neointimabildung. Die adenovirale Überexpression von ICER führte in Ballon-Katheter-verletzten Carotisarterien von Ratten zu einer Verminderung der Neointimabildung im Vergleich zur *LacZ*-Überexpression der Kontrollen. Daraus wurde auf eine inhibierende Rolle von ICER auf die Neointimabildung geschlossen. Die Befunde der vorliegenden Arbeit, die eine hemmende Wirkung von CREM auf die Neointimabildung nachwiesen und die Befunde von Ohtsubo et al. (2007) zeigen somit übereinstimmende Ergebnisse. Der versuchsmethodische Ansatz der Arbeiten war allerdings unterschiedlich. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden an Mäusen mit globaler Inaktivierung aller CREM-Isoformen durchgeführt. ICER war damit bei diesen Mäusen ebenfalls inaktiviert. Der Versuchsansatz von Ohtsubo et al. (2007) beruhte dagegen auf einer adenoviralen Überexpression von ICER. Die Studie an Mäusen mit CREM-Inaktivierung ist daher nicht durch unspezifische Effekte einer adenoviralen Transduktion, die u.a. auch Einfluss auf die transkriptionelle Regulation haben kann, limitiert.

In den Studien von Ohtsubo et al. (2007) wurde die verminderte Neointimabildung in AdICER-transduzierten Ballon-Katheter-verletzten Arterien mit einer erniedrigten Rate proliferierender und einer erhöhten Rate apoptotischer Zellen in der Neointima in Verbindung gebracht. Ohtsubo et al. (2007) gingen daher von einem anti-proliferativen und pro-apoptotischen Einfluss von ICER als Erklärung für die unterdrückte Neointimabildung aus. In den *in vitro* Untersuchungen der vorliegenden

Arbeit konnte ein Einfluss der CREM-Inaktivierung auf die Apoptose in primär isolierten VSMCs nicht festgestellt werden. Die H₂O₂-Behandlung der VSMCs führte zwar zu einem gesteigerten Anteil apoptotischer Zellen, zwischen den untersuchten Genotypen zeigten sich jedoch keine Unterschiede. Ein Einfluss von CREM auf die Apoptose von VSMCs konnte damit nicht nachgewiesen werden. Die Aussagekraft der Apoptose-Befunde von Ohtsubo et al. (2007), im Modell der adenoviral AdICER-transduzierten Arterien, ist allerdings dadurch begrenzt, dass in den mit *LacZ* transduzierten Arterien ebenfalls ein erhöhter Anteil apoptotischer Zellen nachgewiesen wurde. Der virus-abhängige Einfluss auf den programmierten Zelltod macht die Beurteilung dieser Daten daher schwierig.

Übereinstimmend mit den Befunden von Ohtsubo et al. (2007) wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein anti-proliferativer Einfluss von CREM *in vivo* gezeigt. Zur Unterstützung dieser *in vivo* Befunde wurden *in vitro* Untersuchungen zur Proliferation primär isolierter VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen durchgeführt. Zur Stimulation der Proliferation wurden die Zellen mit dem Wachstumsfaktor PDGF behandelt. Die Behandlung mit PDGF führte bei beiden Gruppen zu einem gesteigerten Anteil proliferierender Zellen im Vergleich zur Kontroll-Behandlung. In CREM-KO VSMCs konnte eine Steigerung des Prozentsatzes proliferierender Zellen im Vergleich zu WT-VSMCs festgestellt werden. Kontroll-behandelte VSMC zeigten diese Unterschiede, analog zu den Voruntersuchungen der basalen Proliferation (s.o.), dagegen nicht. Die Befunde der *in vitro* Untersuchung nach PDGF-Behandlung bestätigen damit, den aus den *in vivo* Untersuchungen abgeleiteten, anti-proliferativen Effekt von CREM in VSMCs. Eine mögliche Erklärung für die anti-proliferative Wirkung von CREM könnte in einer CREB-abhängigen Expression von Zellzyklus-regulierenden Proteinen, z.B. Zyklin A, in VSMCs zu suchen sein (Kamiya et al. 2007). So könnte angenommen werden, dass CREM/ICER, als Repressor der CRE-vermittelten Transkription, die Hemmung der Zyklin A-Expression vermitteln könnte. Eine ICER-vermittelte Herabregulation von Zyklin A in β -Zellen des Pankreas wurde bereits in anderen Studien beobachtet und mit einer reduzierten Proliferation der β -Zellen korreliert (Inada et al. 2004, Inada et al. 2005).

Um Signalwege zu identifizieren, die in den postulierten anti-proliferativen Effekt von CREM involviert sind, wurde die CRE-vermittelte transkriptionelle Aktivität in CREM-

KO und WT-VSMCs untersucht. Dazu wurden kultivierte VSMCs mit einem CRE-kontrollierten Luciferase-Reporter-Konstrukt transient transfiziert. Zur näheren Identifizierung der Rolle von CREM in CRE-abhängigen Signalwegen, wurden die transfizierten VSMCs mit Aktivatoren der cAMP- bzw. cGMP-abhängigen Signalkaskaden sowie mit dem Wachstumsfaktor PDGF stimuliert. Forskolin, ein Aktivator der Adenylatzyklase, steigerte die CRE-vermittelte transkriptionelle Aktivität in CREM-KO VSMCs im Vergleich zu WT-VSMCs. Die Stimulation mit 8pCPT-cGMP, einem cGMP-Analogon und die Stimulation mit dem NO-Donor S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) hatten dagegen keinen Effekt. Die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF führte ausschließlich in CREM-KO VSMCs zu einer gesteigerten CRE-vermittelten transkriptionellen Aktivität. CREM unterdrückt somit die cAMP- und PDGF-abhängige CRE-vermittelte Transkription. Dieser Befund spiegelt dabei die bereits beschriebene Repression der CRE-vermittelten Transkription durch inhibitorisch wirkende CREM-Isoformen, z.B. ICER (siehe Einleitung), wieder. Die vollständige Repression des PDGF-abhängigen CRE-vermittelten Signalwegs durch CREM könnte daher sowohl die erhöhte Proliferation nach PDGF-Behandlung als auch die gesteigerte Proliferation von VSMCs in der Media ligierter Carotisarterien von CREM-KO Mäusen erklären.

In verschiedenen Studien wurde allerdings auch gezeigt, dass eine Erhöhung des cAMP-Spiegels, z.B. durch Forskolin, die PDGF-vermittelte Proliferation von VSMCs hemmt. Dieser Signalweg stellt damit einen Gegenspieler zu der PDGF-vermittelten Proliferation dar (Hayashi et al. 2000, Koh et al. 1993, Nilsson et al. 1984). Indolfi et al. (1997) gingen hinsichtlich der cAMP-vermittelten Hemmung der Proliferation von einer negativen Modulation cAMP-steigernder Substanzen auf den MAPK-(mitogen-activated protein kinase) Signalweg aus, da gezeigt werden konnte, dass die Stimulation mit Aktivatoren des cAMP/PKA-Signalwegs eine verminderte Proliferation in VSMCs und eine verminderte Neointimabildung nach Ballon-Angioplastie in Ratten bewirkte. Der Effekt einer CREM-Inaktivierung auf die Proliferation nach Stimulation mit Aktivatoren des cAMP-abhängigen Signalwegs wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Ein Einfluss von CREM kann daher nur spekuliert werden. Da CREM aber in der vorliegenden Arbeit sowohl die Hemmung des cAMP- als auch die vollständige Repression des PDGF-vermittelten Signalwegs bewirkte, ist es denkbar, dass die Art des Stimulus den Effekt einer gesteigerten bzw. gehemmten

Proliferation Kontext-abhängig induziert. CREM würde dann Stimulus-abhängig die Expression unterschiedlicher Gene hemmen, die einen pro- bzw. anti-proliferativen Effekt in VSMCs haben (Abb. 5.1).

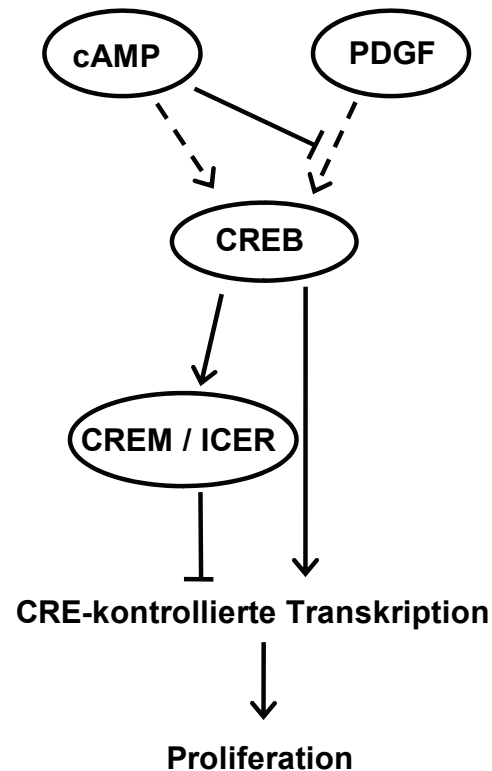


Abb. 5.1 Stimulus-abhängige Induktion von CREM/ICER bei der VSMC-Proliferation. CREM/ICER bewirkt die Hemmung der PDGF-vermittelten Proliferation möglicherweise über die Repression des PDGF-vermittelten Signalwegs in VSMCs. Eine Inaktivierung von CREM/ICER führt daher zu einer gesteigerten CRE-kontrollierten Transkription und einer gesteigerten Proliferation. Die Stimulation mit Aktivatoren des cAMP-Signalwegs führt in VSMCs zu einer verminderten Proliferation (Hayashi et al. 2000, Koh et al. 1993, Nilsson et al. 1984). Zusätzlich führt die Erhöhung des cAMP-Spiegels zur Hemmung der PDGF-vermittelten Proliferation (Indolfi et al. 1997). CREM/ICER bewirkt ebenfalls die Hemmung der cAMP-abhängigen Transkription. Daher kommt es möglicherweise über eine CREM/ICER-Induktion zu einer verminderten Proliferation. CREM könnte daher möglicherweise Kontext- und Stimulus-abhängig die Expression unterschiedlicher Gene hemmen, die einen pro- bzw. anti-proliferativen Effekt in VSMCs haben.

Um mögliche Ziel-Gene von CREM zu identifizieren, die die aus den Versuchen abgeleiteten anti-proliferativen Eigenschaften nach Stimulation mit PDGF vermitteln, wurden Untersuchungen zur Genexpression in kultivierten VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen durchgeführt. Die VSMCs wurden dazu, analog zu den Untersuchungen der CRE-vermittelten Transkription, mit PDGF stimuliert. Die Genexpression in CREM-KO und WT-VSMCs wurde mit Hilfe von mRNA-Mikroarrays untersucht und die Ergebnisse dieser Untersuchungen mittels quantitativer Real-Time PCRs validiert. Die Real-Time PCR zur Validierung der

Regulation von *Agtrap* zeigte eine Heraufregulation in CREM-KO VSMCs. *Crem*, *Pnrc2*, *Abhd1*, *Cacna2d1*, *Cxcl12* und *Zbtb38* waren in CREM-KO VSMCs herabreguliert.

Die Untersuchung der *Crem*-Genexpression diente als Kontrolle. Die Herabregulation von *Crem* bewies dabei die Integrität der CREM-Inaktivierung in CREM-KO VSMCs. Mit Ausnahme von CREM- τ stellen alle Isoformen von CREM Repressoren der CRE-vermittelten Transkription dar (Mayr und Montminy 2001, Abb. 1.4). Die fehlende Hemmung der CRE-vermittelten Genexpression würde damit eine Heraufregulation möglicher CREM-Ziel-Gene bewirken. Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass Gene, die in CREM-KO VSMCs herabreguliert sind, potentielle CREM-Ziel-Gene darstellen.

In der Promotorregion des *Agtrap*-Gens konnte, mit Hilfe der genomweiten Suche von CREB-Ziel-Genen der Arbeitsgruppe Montminy, im Genom von Mäusen ein halbes CRE-Element (half-site CRE; TGACG/CGTCA) nachgewiesen werden (Zhang et al. 2005). Die fehlende Hemmung der *Agtrap* Genexpression durch CREM/ICER könnte daher möglicherweise für die Heraufregulation von *Agtrap* in CREM-KO VSMCs verantwortlich sein. *Agtrap* (angiotensin II, type 1 receptor-associated protein) kodiert für ein Protein, das mit der carboxy-terminalen zytoplasmatischen Domäne des Angiotensin-1-Rezeptors (AT₁-Rezeptor) interagiert und dessen Internalisierung und Desensitivierung vermittelt (Cui et al. 2000). Verschiedene Studien zeigten, dass die Überexpression von AGTRAP zu einer Reduktion von AT₁-Rezeptoren auf der Zelloberfläche führte (Daviet et al. 1999, Oppermann et al. 2010). Die transgene Überexpression von AGTRAP in Mäusen, bewirkte über die Reduktion der AT₁-Rezeptoren eine reduzierte Zellproliferation und Neointimabildung nach Ballon-Angioplastie (Oshita et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings eine gesteigerte Proliferationsrate und Neointimabildung in CREM-KO Mäusen nachgewiesen, obwohl *Agtrap* nach PDGF-Stimulation in CREM-KO VSMCs hochreguliert war. Eine mögliche Erklärung für diesen Zusammenhang könnte mit Hilfe der Studien von Nickenig et al. (1995) und Wang und Murphy (2000) gefunden werden. In diesen Studien wurde eine PDGF-vermittelte Proliferation von VSMCs mit einer Herabregulation von AT₁-Rezeptoren in kultivierten VSMCs korreliert (Nickenig und Murphy 1994, Nickenig et al. 1995, Nickenig und Murphy 1996). Wang und Murphy zeigten in dem Zusammenhang weiterhin, dass die adenovirale Expression

von ICERIIy die Herabregulation der AT₁-Rezeptor-Genexpression in VSMCs nicht beeinflusst (Wang und Murphy 2000). Somit bewirkt das Fehlen von CREM/ICER in der vorliegenden Arbeit zwar die Heraufregulation von *Agtrap*, diese steht aber wahrscheinlich nicht mit einer Hemmung der Zellproliferation, z.B. hervorgerufen durch Reduktion der AT₁-Rezeptoren, im Zusammenhang. AGTRAP spielt daher wahrscheinlich bei der PDGF-vermittelten Proliferation eine untergeordnete Rolle und kann den anti-proliferativen Einfluss von CREM nicht erklären.

Pnrc2 (proline-rich nuclear receptor coactivator 2) wurde von der Arbeitsgruppe Montminy als CREB-Ziel-Gen identifiziert (Zhang et al. 2005). In den Real-Time PCRs war dieses Gen in CREM-KO VSMCs herabreguliert. CREM, z.B. die aktivierende Isoform CREM- τ , könnte somit möglicherweise für die Genexpression von *Pnrc2* notwendig sein. Die Regulation von PNRC2, einem nukleären Koaktivator der Transkription, wurde mit dem Transkriptionsfaktor E2F-1 in Verbindung gebracht. (Zhou et al. 2005). E2F-1, ein weiteres Ziel-Gen von CREB (Zhang et al. 2005), ist in die Regulation des Zellzyklus involviert und induziert die DNA-Polymerase zur Initiation der S-Phase. Verschiedene Zyklone, z.B. Zyklin D1 und Zyklin-abhängige Proteine (cdks) sind dabei in die Abspaltung von E2F-1 vom Retinoblastoma Protein (Rb) involviert. Diese Abspaltung von E2F-1 bewirkt die Aktivierung der Zellteilung (Bell und Ryan 2004). Da *Pnrc2* ein Ziel-Gen von E2F-1 darstellt, wird seine Beteiligung an der Regulation des Zellzyklus ebenfalls angenommen (Zhou et al. 2005). Welche Rolle er in der Regulation des Zellzyklus spielt ist dabei nicht bekannt. Eine Beteiligung von PNRC2 an der anti-proliferativen Wirkung von CREM ist somit prinzipiell denkbar.

Ein weiteres Gen, das mittels Real-Time PCR validiert wurde, stellt *Abhd1* ($\alpha\beta$ hydrolase domain containing 1) dar. In den Genom-Untersuchungen der Arbeitsgruppe Montminy konnte ein halbes CRE-Element in der Promotorregion des *Abhd1*-Gens nachgewiesen werden (Zhang et al. 2005). Eine Regulation dieses Gens durch CREM ist somit ebenfalls denkbar. ABHD1 steht in Verbindung mit der Reduktion von oxidativem Stress und spielt möglicherweise eine protektive Rolle in der Pathogenese der Hypertension und bei kardiovaskulären Erkrankungen wie der Atherosklerose (Stoelting et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die protektive Rolle von CREB bei der Atherosklerose u.a. auf die Reduktion von oxidativem Stress durch Heraufregulation der anti-oxidativen Abwehr zurückzuführen ist (Krönke et al.

2003). Da eine Expression von ABHD1 möglicherweise mit einer CREM-Expression korreliert ist, ist eine Bedeutung von ABHD1 für die Entwicklung vaskulärer Erkrankungen bei CREM-KO bzw. CREM-KO x ApoE-KO Mäusen ebenfalls denkbar. CACNA2D1 (calcium channel voltage-dependent alpha2/delta subunit 1) bildet, die spannungsabhängige α_2/δ_1 -Untereinheit des Kalziumkanals Ca_v 1.2 (Catterall 2000), der neben neuronalen und kardialen Zellen auch in VSMCs exprimiert wird (Ravindran et al. 2009). Eine Herabregulation dieser Untereinheit vermindert die Funktion des Ca_v 1.2 Kanals (Ravindran et al. 2009). In Untersuchungen der Arbeitsgruppe Montminy wurde *Cacna2d1* als CREB-Ziel-Gen identifiziert (Zhang et al 2005). Die verminderte Expression von *Cacna2d1* in CREM-KO VSMCs deutet somit ebenfalls auf eine Bedeutung von CREM für die *Cacna2d1*-Expression hin. Eine funktionelle Bedeutung von CACNA2D1 für die Proliferation ist nicht bekannt, allerdings konnten verminderte Expressionen des Ca_v 1.2-Kanals bei proliferierenden und differenzierten VSMCs nach mitogener Stimulation beobachtet werden (Tiwari et al. 2006, Gollasch et al. 1998). Aus diesem Grund wurde eine Bedeutung von Ca_v 1.2 als VSMC-Differenzierungsmarker diskutiert, denn die Differenzierung geht u.a. mit der Herabregulation von Genen einher, die für Proteine kodieren, die an der Kontraktion von VSMCs beteiligt sind (Tiwari et al. 2006, Shanahan et al. 1993, Nickenig und Murphy 1996). Im Zusammenhang mit dem Befund einer gesteigerten VSMC-Proliferation in der vorliegenden Arbeit, könnte eine verminderte *Cacna2d1*-Expression somit ebenfalls als Marker der VSMC-Differenzierung angenommen werden. CACNA2D1 stellt damit zwar einen möglichen Differenzierungsmarker von VSMCs dar, kann den Befund einer gesteigerten Proliferation von CREM-KO VSMCs aber nicht erklären.

Cxcl12 konnte in der Datenbank der Arbeitsgruppe Montminy ebenfalls als CREB-Ziel-Gen identifiziert werden (Zhang et al. 2005). CXCL12 (chemokine C-X-C motif ligand 12) entspricht dem Chemokin SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), welches einen wichtigen Faktor der Regeneration und Differenzierung von Organen und Geweben nach Verletzung darstellt und in atherosklerotischen Läsionen und der Neointima ligierter Carotisarterien vermehrt nachgewiesen werden konnte (Stellos et al. 2009; Schober et al. 2003). Deng et al. (2006) konnten in Mikroarray-Untersuchungen kultivierter VSMCs aus Koronararterien in Folge einer PDGF-Stimulation eine Heraufregulation von *Cxcl12* in proliferierenden VSMCs beobachten.

Eine Heraufregulation von *Cxcl12* in CREM-KO VSMCs wäre daher insofern zu erwarten gewesen, da CREM-KO VSMCs ebenfalls eine gesteigerte Proliferation im Vergleich zum WT zeigten. In der vorliegenden Arbeit war *Cxcl12* in CREM-KO VSMCs im Vergleich zum WT nach PDGF-Stimulation allerdings herabreguliert. CREM scheint somit für die PDGF-abhängige Expression von CXCL12 keine Rolle zu spielen. Die Genexpression in CREM-KO und WT-VSMCs wurde allerdings unter nicht-stimulierten Bedingungen nicht untersucht. Daher kann spekuliert werden, dass die Herabregulation von *Cxcl12* in CREM-KO VSMCs auch unabhängig von der PDGF-Stimulation unter basalen Bedingungen aufgetreten wäre. Die Expression von *Cxcl12* wird damit zwar möglicherweise durch CREM beeinflusst, eine Bedeutung für den Befund der gesteigerten Proliferation in CREM-KO VSMCs ist allerdings unter den vorliegenden Bedingungen nicht anzunehmen.

ZBTB38 (zinc finger and BTB domain containing 38) war in den Real-Time PCRs in CREM-KO VSMCs im Vergleich zum WT herabreguliert. ZBTB38 kann an DBDs (DNA-binding domain) binden und wird häufig in Verbindung mit Transkriptionsfaktoren gefunden (Pabo et al. 2001). Seine Funktion, insbesondere in Bezug auf die Proliferation von VSMCs, ist unbekannt. Die, von Oikawa et al. (2008) beschriebene, anti-apoptotische Funktion von ZBTB38 ist in diesem Zusammenhang allerdings nicht relevant, da in den *in vitro* Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit keine Veränderungen im Anteil apoptotischer Zellen zwischen CREM-KO und WT-VSMCs nachgewiesen werden konnten.

Zusammengefasst konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals Gene identifiziert werden, die nach PDGF-Stimulation durch CREM beeinflusst sind. Diese Auswahl von möglichen CREM-Ziel-Genen ist nicht vollständig, trägt aber trotzdem zu einem besseren Verständnis der PDGF-vermittelten Effekte während der Proliferation bei. Für eine eindeutige Erklärung der anti-proliferativen Effekte von CREM bedarf es daher der Identifizierung weiterer Ziel-Gene.

5.3.1 Bedeutung von CREM für die atherosklerotische Plaquebildung und die Pathophysiologie vaskulärer Erkrankungen

Für Untersuchungen zur Bedeutung von CREM für die atherosklerotische Plaquebildung wurden Apolipoprotein E-defiziente Mäuse mit CREM-KO und WT-

Mäusen gekreuzt und für 30 Wochen mit einer atherogenen Spezialdiät gefüttert. Der Versuchsablauf erfolgte dabei analog zu den Untersuchungen an gmCREB-KO x ApoE-KO und ApoE-KO Kontroll-Mäusen. Die Fütterung mit einer atherogenen Spezialdiät führte sowohl bei CREM-KO x ApoE-KO als auch bei ApoE-KO Mäusen zu einer gesteigerten Plaquebildung im Vergleich zu Mäusen mit Standardfütterung. Die atherosklerotische Plaquebildung war in Aorten von CREM-KO x ApoE-KO Mäusen im Vergleich zu Aorten von ApoE-KO Mäusen signifikant gesteigert. Mäuse der gleichen Genotypen, die mit Standardfutter gefüttert wurden, zeigten diese Unterschiede nicht. Mäuse mit CREM-Inaktivierung zeigten somit den gleichen Befund einer gesteigerten atherosklerotischen Plaquebildung wie Mäuse mit glattmuskelzellspezifischer CREB-Inaktivierung. Ein Zusammenhang zwischen diesen Befunden liegt somit nahe, obwohl eine offensichtliche Diskrepanz zwischen der Bedeutung von CREB als Aktivator der CRE-vermittelten Transkription und CREM/ICER als Repressor der CRE-vermittelten Transkription besteht. Dennoch können die Befunde beider Genotypen auf eine gemeinsame Erklärung zurückgeführt werden, die auf der fehlenden Induktion von ICER durch CREB beruht (siehe Einleitung, Abb. 1.5). So könnten z.B. Mäuse mit gefäßspezifischer CREB-Inaktivierung durch die fehlende, CREB-abhängige Induktion von ICER eine gesteigerte atherosklerotische Plaquebildung entwickeln, die auch dem Effekt der CREM/ICER-Inaktivierung auf die Atherosklerose entspricht. Ein möglicher Erklärungsansatz für die gesteigerte atherosklerotische Plaquebildung bei CREM- und CREB-defizienten Mäusen könnte eine gesteigerte Proliferation von VSMCs darstellen. Für CREM-defiziente Mäuse wurde die gesteigerte Proliferation in der vorliegenden Arbeit *in vitro* nach PDGF-Stimulation und *in vivo* in VSMCs der Media ligierter Carotisarterien nachgewiesen. Die basale Proliferation war in Aorten von Mäusen mit CREM-Inaktivierung dagegen nicht verändert (unveröffentlichte Daten von M. Seidl, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Münster). Dieser Befund korreliert mit dem fehlenden Einfluss der CREB-Inaktivierung auf die basale Proliferation. Unter mitogenen Stimulationsbedingungen wurde die Proliferation in gmCREB-KO Mäusen allerdings nicht untersucht. Verschiedene Studien zeigen aber einen anti-proliferativen Einfluss von CREB nach Stimulation mit PDGF *in vitro* (Klemm et al. 2001, Kamiya et al. 2007). Eine gemeinsame Rolle von CREB und CREM in der Proliferation nach PDGF-Stimulation

könnte somit ebenfalls angenommen werden (vgl. Abb. 5.1). Ein Beispiel stellt die bereits beschriebene, CREB-abhängige Herabregulation von Zyklin A in VSMCs dar (Kamiya et al. 2007, Inada et al. 2005). Ein Fehlen von CREB oder ICER führt dann, durch die fehlende negative Autoregulation der cAMP-abhängigen Transkription durch ICER, zu einer vermehrten Expression von Zyklin A und dadurch zur Steigerung der Proliferation. Die VSMC-Proliferation steht weiterhin in direktem Zusammenhang mit der Differenzierung von VSMCs, die mit dem Wechsel des VSMC-Phänotyps vom kontraktilen zum migratorischen Typ einhergeht und in der Atherosklerose eine wichtige Rolle spielt (Klemm et al. 2001). Die Stimulation mit zyklischen Nukleotiden, z.B. cAMP, bewirkt dabei die Erhaltung des kontraktilen, im Ruhezustand vorliegenden, VSMC-Phänotyps *in vitro* und *in vivo*. Die β -adrenerge Stimulation des cAMP-Signalwegs ist für die kontraktile Funktion der VSMCs unter basalen Bedingungen notwendig. Es wird daher angenommen, dass cAMP die mitogene Antwort der VSMCs auf Wachstumsfaktoren unterdrückt (Owens 1995, Owens et al. 1996, Iyengar 1996; Abb. 5.1). CREB gilt dabei als bestimmender Faktor (Klemm et al. 2001). Anhand der Effekte der CREB-Inaktivierung auf die atherosklerotische Plaquebildung könnte damit ebenfalls eine CREB-vermittelte Hemmung der Differenzierung von VSMCs, bzw. die Erhaltung des „ruhenden“ VSMC-Phänotyps spekuliert werden. Die Hemmung der VSMC-Differenzierung könnte dann möglicherweise ebenfalls durch die negative Autoregulation von ICER vermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CREM in die Pathophysiologie vaskulärer Erkrankungen involviert ist und vor allem unter Stimulationsbedingungen in Bezug auf anti-proliferative Prozesse eine wichtige Rolle spielt. Dabei scheinen die anti-proliferativen Effekte von CREM mit der vollständigen Repression der CRE-vermittelten transkriptionellen Aktivität nach Stimulation mit PDGF in Verbindung zu stehen.

6 Zusammenfassung

Vaskuläres Remodeling ist ein aktiver Prozess des Gefäßumbaus, der durch Gefäßverletzung und pro-atherogene Faktoren, z.B. cholesterin- und fettreiche Ernährung, hervorgerufen werden kann. Dabei kommt es in Gefäßen zur Proliferation, Apoptose und Differenzierung von vaskulären Glattmuskelzellen (vascular smooth muscle cells, VSMCs).

Transkriptionsfaktoren der CREB/CREM-Familie (cAMP response element binding protein und cAMP response element modulator) binden als Homo- oder Heterodimere an CRE (cAMP-response element)-Bindungsstellen in der Promotorregion verschiedener Gene und regulieren so die transkriptionelle Antwort extrazellulärer Stimuli. Dadurch sind sie u.a. in die Regulation der Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung involviert.

Um die Bedeutung von CREB und CREM für die vaskuläre Funktion und die Pathogenese gefäßproliferativer Erkrankungen zu charakterisieren, wurden Mäuse mit glattmuskelzellspezifischer CREB-Inaktivierung und Mäuse mit einer globalen Inaktivierung von CREM untersucht. Die Charakterisierung der beiden Mausmodelle wurde an aortalen Gefäßringen und bei Mäusen mit globaler CREM-Inaktivierung zusätzlich an primär isolierten VSMCs durchgeführt. Die Untersuchungen der Pathogenese gefäßproliferativer Erkrankungen erfolgten mit Hilfe eines Modells der Gefäßschädigung (Ligation der A. carotis) und einem Modell zur Atherogenese.

In Aorten von Mäusen mit glattmuskelzellspezifischer CREB-Inaktivierung konnte im Vergleich zur Kontroll-Gruppe unter basalen Bedingungen eine gesteigerte Apoptose nachgewiesen werden. In gefäßmyographischen Untersuchungen nach Mulvany bewirkte die Inaktivierung von CREB eine verminderte Effektivität und Potenz des β -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin sowie eine verminderte Effektivität des M-Cholinozeptor-Agonisten Carbachol bei der Relaxation. Die Neointimabildung nach Ligation der A. carotis zeigte zwischen den untersuchten Gruppen keine Unterschiede. Die Kreuzung Apolipoprotein E (ApoE)-defizienter Mäuse mit glattmuskelzellspezifischen CREB-KO und Kontroll-Mäusen und die Fütterung einer atherogenen Spezialdiät führten in Aorten von Mäusen mit glattmuskelzellspezifischer CREB-Inaktivierung zu einer gesteigerten atherosklerotischen Plaquebildung. Die Befunde dieser Arbeit belegten eine anti-

apoptische und anti-atherogene Rolle von CREB in Gefäßen und deuten erstmals auf eine funktionelle Bedeutung von CREB für die Relaxation hin.

Mäuse mit globaler Inaktivierung von CREM zeigten, nach mitogener Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF, in primär isolierten VSMCs eine Steigerung der Proliferation im Vergleich zu WT-VSMCs. Im Modell der Carotisligation konnte bei CREM-KO Mäusen eine gesteigerte Neointimabildung beobachtet werden. Diese ging mit einer gesteigerten Proliferation glattmuskulärer Zellen in der Media ligierter Carotisarterien einher. Die Kreuzung von ApoE-defizienten Mäusen mit CREM-KO und WT-Mäusen und die Fütterung einer atherogenen Spezialdiät, führte in Aorten von Mäusen mit CREM-Inaktivierung zu einer gesteigerten atherosklerotischen Plaquebildung. Die Ergebnisse der Untersuchungen deuten damit auf eine anti-proliferative und anti-atherogene Wirkung von CREM unter vaskulären Stressbedingungen hin. Die transiente Transfektion kultivierter VSMCs von CREM-KO und WT-Mäusen mit einem CRE-kontrollierten Luciferase-Konstrukt und die Stimulation des cAMP- und PDGF-vermittelten Signalwegs bewirkten die Repression der CRE-vermittelten transkriptionellen Aktivität durch CREM. Die vollständige Repression der CRE-vermittelten transkriptionellen Aktivität nach PDGF-Stimulation stellt damit eine mögliche Erklärung für die anti-proliferativen Effekte von CREM dar. Mittels Mikroarray-Untersuchungen und Validierungen durch Real-Time PCRs von PDGF-stimulierten CREM-KO und WT-VSMCs konnten erstmals Gene identifiziert werden, die nach PDGF-Stimulation durch CREM beeinflusst sind (*Pnrc2*, *Abhd1*, *Cacna2d1*, *Cxcl12* und *Agtrap*). Die Funktionen dieser Gene sind mit vaskulären Erkrankungen und der Proliferation von VSMCs assoziiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit gezeigt, dass die Transkriptionsfaktoren CREB und CREM in den vaskulären Umbauprozess gefäßproliferativer Erkrankungen involviert sind und möglicherweise unter Stimulationsbedingungen in anti-proliferativen und anti-atherogenen Prozessen im Gefäßsystem eine gemeinsame Rolle spielen.

7 Anhang

7.1 Oligonukleotide und PCR-Programme für die Genotypisierung

7.1.1 Genotypisierung CREM-KO:

Oligonukleotide CREM-Genotypisierung			
Crem-GT for	TGG ATT GTG CTG GGA GGT TGT TC		
Crem-GT rev	TCT TTA AGG GCC TTG AGT TCC TC		
LacZ-GT rev	CGC CAT TCG CCA TTC AGG CTG C		
Programm			
Denaturierung		94°C	1 min
Denaturierung	35 Zyklen	94°C	30 sek
Annealing		60°C	40 sek
Elongation		72°C	1 min
Elongation		72°C	3 min
Pause		4°C	unendlich
Produktgröße			
	WT: 173 bp		
	HZ: 173, 332 bp		
	KO 332 bp		

7.1.2 Genotypisierung ApoE-KO:

Oligonukleotide ApoE-Genotypisierung			
oIMR0180 for	GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG		
oIMR0181 rev	TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C		
oIMR0182 rev	GCC GCC CCG ACT GCA TCT		
Programm			
Denaturierung		94°C	3 min
Denaturierung	35 Zyklen	94°C	40 sek
Annealing		64°C	1 min
Elongation		72°C	2 min
Elongation		72°C	7 min
Pause		4°C	unendlich
Produktgröße			
	WT: 155 bp		
	HZ: 155, 245 bp		
	KO: 245 bp		

7.1.3 Genotypisierung CREB-loxP: Nachweis der loxP-Sequenz

Oligonukleotide CREB-loxP-Genotypisierung			
CREB loxP sense	TAT GTA AAG CAA GGG AAG ATA CTG		
CREB loxP antisense	TAT ACA TAC TTG ACC CAT AGC ATT		
Programm			
Denaturierung		95°C	5 min
Denaturierung	35 Zyklen	95°C	45 sek
Annealing		56°C	55 sek
Elongation		72°C	2 min
Elongation		72°C	5 min
Pause		4°C	unendlich
Produktgröße			
			fl/fl: 600 bp
			fl/+: 600, 550 bp
			+/: 550 bp

7.1.4 Genotypisierung CREB-flox: Nachweis der CRE-Rekombinase

Oligonukleotide CRE-Rekombinase			
SMWT-1	TGA CCC CAT CTC TTC ACT CC		
SMWT-2	AAC TCC ACG ACC TCA TC		
pH Creas 1	AGT CCC TCA CAT CCT CAG GTT		
Programm			
Denaturierung		95°C	5 min
Denaturierung	30 Zyklen	95°C	45 sek
Annealing		58°C	45 sek
Elongation		72°C	2 min
Elongation		72°C	5 min
Pause		4°C	unendlich
Produktgröße			
			CRE +: 225, 287 bp
			CRE -: 225 bp

7.2 Nachweis des Null-Allels bei SM-iCre-ER^{T2}-CREB^{fl/fl}-Mäusen

Oligonukleotide Nachweis des Null-Allels			
CREB loxP sense	TAT GTA AAG CAA GGG AAG ATA CTG		
CREB loxIR2	GCC CAA GGT TGT GAT TCC AGC ACT		
Programm			
Denaturierung		95°C	5 min
Denaturierung	9 Zyklen	94°C	1 min
Annealing		step-down	60°C
Elongation	1°C pro Zyklus	72°C	1:30 min
Denaturierung	30 Zyklen	94°C	1 min
Annealing		53°C	1 min
Elongation		72°C	1:30 min
Elongation		72°C	5 min
Pause		4°C	unendlich
Produktgröße			
	loxP-Allel: 1260 bp		
	Nullallel: 700 bp		

7.3 Verwendete Oligonukleotide und Programme der quantitativen Real-Time PCR im LightCycler® mittels SYBR Green

LightCycler® Programm zur quantitative Real-Time PCR			
Denaturierung		95°C	5 min
Denaturierung	50 Zyklen	95°C	5 sek
Annealing		60°C	15 sek
Elongation		72°C	15 sek
Kühlung		40°C	1 min
Schmelzkurve			
Beginn des Temperaturgradienten	kontinuierliche Messung		
Ende des Temperaturgradienten	je 0,5°C Temperaturanstieg		

Oligonukleotide	Sequenz FOR	Sequenz REV
mCyc	TTATCTGCACTGCCAAGACTG	GGGGAATGAGGAAAATATGGAA
Rgs5	GGGTGAGAAGGGTAGGAAGG	CATTTGGCTTTTCTTTTGA
Taf12	CACAGGGTGCATAGCTGAGA	GGCAGAGAAAGTGCTCCAAC
Twistnb	TGCTGGAGTGTTCTGCATTC	GTTTCTTCTGTGGCGTGAC
Zbtb38	TTGCCAGGCTGAATGTGTAG	CTTATCTGGGGGCAGTTTCA
Zmiz	CAGCTTAGAGTCCCCTGCTG	TGACCGATGACAAATGAGGA
Abhd1	TGCCCAGAAGTCTCCCTATG	CCCAGCAGTCTCTTGTGTCAG
Bat2d	GAAATGGAGAGGGCAAGACA	AGGCTCTTGGGGTTCAACTT
Crem	CCAGGGGAAGAGGTTAGAGG	GCCAGCCTAACCTACGTGA
Nfat3	TCCTTAAGCCACAGGCAGAT	GGGCTCTTCAAATGACCAGA
Pmaip1	GGCCAGCAGATACGTGATTC	TGGGACAGCTGGATTTAAGG
Pnrc2	CACATGTCCCAGTGGTCATT	GGTGAGGCCAGGATCACTT
Arhgap12	TGGGGAACAATTTGTGTGTG	AGAGCCCTAAAGCACACTGC
CxCL12	GCTCTGCATCAGTGACGGTA	TAATTTCCGGTCAATGCACA
CaV2	CTCAAGCTAGGCTTCGAGGA	ATGGCCAGAAATACGGTCAG
ROCK2	GTGGAACCAGTGGGAGAAAA	TGCAGGGCGCTATAATCTCT
PDGFRa	GGCACGTTAACTGTTGCACT	GGGGTATCTGGAAGCCATCT
Cacna2d1	AGTTGACTGTTGCACGGTTG	TGCAGCAGGTTGAAATGCTA
ltga2	AAATTGTGGGTGGTGTGGTT	TATCCCATCGCCCTGTTAGA
Agtrap	CTGATGACCTGGGTTTCGAGT	CCATCGAGGTTCCACTATTCTC

7.4 Ergebnisse der Mikroarray-Untersuchungen

Tab. 7.1 Ausgewählte Ergebnisse der Mikroarray-Untersuchungen von CREM-KO und WT-VSMCs nach PDGF-Stimulation bezogen auf WT. Dargestellt sind die 319 Transkripte (TargetID), deren Expressionen in CREM-KO VSMCs im Vergleich zum WT (KO/WT) mindestens 1,4-fach hoch- bzw. 0,6-fach herabreguliert waren. MW, Mittelwert; STDEV, Standardabweichung; CREM-KO n=5 Isolationen, WT n=6 Isolationen

TargetID	ProbeID	WT-MW	WT-min	WT-max	WT-STDEV	KO-MW	KO-min	KO-max	KO-STDEV	P-Wert	KO/WT
BC099439	1710687	1150,8	567,3	1742,3	515,657	97,7	88,3	111,5	8,716	0,01757	0,08
OTTMUSG00000025408	4850270	1077,6	548,6	1630,8	451,936	91	83,2	95,3	5,19	0,00572	0,08
LOC100046049	1340630	182,7	114,4	241,5	47,382	73	61,8	85,5	8,673	0,007	0,4
LYZ2	830240	4538,9	2745,2	6743,4	1522,015	1832,8	657	3735,5	1409,034	0,99998	0,4
OTTMUSG00000000971	5360370	374,1	290,5	497,7	80,159	148,6	67,1	323,1	94,788	0,06048	0,4
CXCL12	20088	3710	508,8	6911,3	2881,818	1546,8	534,8	3771,2	1165,435	0,99998	0,42
UPK3B	6270670	900,7	224,9	3160,4	1267,117	380,4	216,3	524,4	128,032	0,99998	0,42
CREM	3130719	193,8	166,4	216,5	21,326	87,3	74,5	108,9	11,676	0	0,45
UPK3B	520333	971,4	292,6	3201,2	1254,53	438,4	218,9	695,2	174,305	0,99998	0,45
CALU	1410091	391,4	135,6	786,7	270,374	183,3	100,4	311,3	92,842	0,99998	0,47
USP9Y	4880397	150	66,6	466,6	177,048	70,7	62	78,1	5,783	0,99998	0,47
VAT1L	450452	264,1	74,1	895	353,903	125,1	96,9	193,2	36,031	0,99998	0,47
LYZ5	1940608	2177,7	1402,2	3405,1	776,533	1049,6	437,5	2199,1	782,593	0,99998	0,48
ANGPTL7	6520451	350	94,4	875,4	315,455	173,2	129,7	221,9	37,998	0,99998	0,49
EIF4G2	6520484	991,2	413,7	1625,9	499,015	488,3	156,8	1076,4	360,271	0,99998	0,49
UPK3B	4040243	321	105,6	1062,1	415,926	156,9	107,4	202,4	33,96	0,99998	0,49
CAV2	4480576	415,2	191,8	771,4	235,383	207,6	117	323,6	81,786	0,99998	0,5
CXCL12	1030025	4979,8	774,3	9179,7	3536,165	2467,6	947,8	5667,8	1747,376	0,99998	0,5
LAPTM5	940438	1303,3	902,3	2223,9	524,212	647,5	137,3	1756,5	622,05	0,99998	0,5
TPM4	7210747	1450,9	708,9	2561,3	832,702	730,9	304	1542,7	468,696	0,99998	0,5
LYZ	5720609	12804,9	9869	18192,9	3215,477	6655,1	2383,4	16149,9	5580,084	0,99998	0,52
C1QB	580332	404,7	250,4	771,7	209,066	213,5	82,2	532,4	185,276	0,99998	0,53
C1QC	3710170	314,9	212,1	588,7	154,409	168,3	79,7	403	129,624	0,99998	0,53
HSPD1	5670192	1306,2	624	2333,8	755,947	695,4	226,5	1305,8	457,006	0,99998	0,53
YBX3	6510112	6794,7	3098,2	12426,5	3725,367	3607,5	1452,3	7932,1	2500,825	0,99998	0,53

ASAH1	130121	2447	1335,9	3599,9	1080,048	1315,5	482,9	2803	928,923	0,99998	0,54
CREM	3840112	153,8	142,5	163,8	8,683	82,5	70,9	111,4	15,247	0,00033	0,54
HSPA8	2030593	7397,3	3729,7	12476,8	3722,48	4015,7	986,8	7658,2	2596,942	0,99998	0,54
PRL2C2	2450215	4648,7	2419,6	7757,6	2159,409	2504,5	1174,1	4501,2	1381,233	0,99998	0,54
RAET1C	6960162	391,8	239,1	744,9	203,273	210,6	69,9	309,5	80,965	0,99998	0,54
9930013L23RIK	60474	456,5	200,6	862	266,966	250,2	114,1	492,5	132,757	0,99998	0,55
MSN	2850133	5215,6	2747,2	8367,9	2288,495	2870	1437,7	4417,8	1262,966	0,99998	0,55
OTTMUSG0000010673	4640639	431,5	314	489,7	69,223	239,1	130	352	96,259	0,2705	0,55
ATP6AP2	5360338	1065,6	752,9	1514,8	335,335	599,9	305,4	1139,4	316,854	0,99998	0,56
ATP6AP2	6020593	954,5	617,1	1644	472,814	537,9	275,2	990,9	290,017	0,99998	0,56
CCK	430025	1134,3	334,4	1468,2	453,879	640,1	166	986,8	306,825	0,99998	0,56
LOC380706	1110445	194,7	137,4	248,9	41,049	109,1	90,3	131,1	14,885	0,09403	0,56
ARHGAP12	5260114	294,1	235,5	323,3	34,082	167,5	130,3	218,5	39,376	0,00523	0,57
PRL2C4	6590435	9523	5610	14266,3	3723,763	5456,7	2186,1	11331,1	3239,623	0,99998	0,57
SEC23A	1980072	670,8	294,5	1153	351,561	382,9	216,6	794,3	229,366	0,99998	0,57
TGOLN1	3520630	468,4	321,6	805,3	198,47	269,1	197,8	333,7	53,423	0,99998	0,57
TNIK	4060626	420,3	155,1	1287,3	486,924	240,6	179,6	395,1	79,36	0,99998	0,57
WISP1	2600356	496,9	262,8	779,9	221,775	282,2	131,1	607,1	202,449	0,99998	0,57
YME1L1	6900377	428,1	212,8	645,7	207,098	242	115,9	484,8	152,519	0,99998	0,57
CALU	2320356	1460,7	844,4	2377,9	688,843	852,6	313,8	1495,1	487,949	0,99998	0,58
CLEC4D	10170	365,6	234,4	564,2	121,073	212,7	88	532	169,05	0,99998	0,58
LPCAT2	4670390	158,5	88,3	321,4	95,448	91,8	70,6	123,7	18,828	0,99998	0,58
NCOA4	7610307	205,1	94,5	378,5	117,585	119,4	84,7	177,5	44,744	0,99998	0,58
XKR8	770133	524,9	362,6	665,9	122,469	304,1	157,2	464,6	112,134	0,99998	0,58
ABHD1	1030253	245,8	172,6	327,3	57,082	145	104,3	227,2	44,317	0,99998	0,59
ABHD1	6040731	249,2	180,4	343,7	60,568	145,8	108,6	228,2	43,558	0,99998	0,59
HNRNPK	2970408	1463,7	748,3	2191,4	658,605	859,7	374,5	1663,2	522,827	0,99998	0,59
LGSN	4560538	232,3	121,1	403,7	117,958	137,1	94,6	205,3	48,492	0,99998	0,59
MMP12	6420687	264,2	169,3	399,4	107,759	156,1	80,7	319	88,211	0,99998	0,59
PRL2C3	1570059	11505,3	7223	17001,5	4298,918	6816,7	2868	14431,7	4114,861	0,99998	0,59
RBBP7	670711	1183,3	597,6	2135,5	647,519	694,6	235,9	1173,7	377,361	0,99998	0,59
SLC17A6	6840709	415,4	189,5	1174,1	425,677	245,2	166,9	326	64,443	0,99998	0,59
TCF21	5490563	149,1	83,8	367,5	122,689	87,7	73,1	100,7	10,78	0,99998	0,59
BSDC1	2680040	842,4	568,1	1039,2	174,709	505,2	295,6	680,8	136,007	0,52737	0,6
EIF4A2	4850747	2914,9	1592,2	4419,7	1164,417	1735,9	747,3	3497,8	1020,763	0,99998	0,6
LOC385632	2450673	631	354	894,6	248,619	378,2	169,6	707,1	240,333	0,99998	0,6
SPNB2	650630	1965,9	1052,1	3271,8	907,296	1169,8	807,9	1663,8	382,306	0,99998	0,6
ZBTB8OS	4040253	173,6	118,8	221	41,322	105	73,9	157	28,899	0,99998	0,6
0610010I05RIK	3990427	13206,5	9881,8	19425,4	3871,227	8069,2	4946,3	10550,5	2038,586	0,99998	0,61
ADSS	2750091	723,6	461,2	1157,2	289,57	442,5	248,1	727,6	179,502	0,99998	0,61
CSDE1	6840458	258,5	127	417,5	130,925	157,5	94,6	304,3	77,526	0,99998	0,61
FCGR3	3830678	254,6	203	358,9	62,699	155,9	91,3	327,5	91,856	0,99998	0,61
LOC669660	4640717	841,4	453,7	1793,2	551,332	511,1	257,4	1088,2	311,37	0,99998	0,61
SLMAP	6900228	518,7	280,8	979,9	279,943	317,5	210,9	489,4	105,964	0,99998	0,61
SRP54	1050273	898,8	409,5	1415,3	448,599	549,8	203,2	1277,4	416,657	0,99998	0,61
TMEM68	4830458	674,8	404,7	1190,3	314,045	414,9	78,7	738,5	251,428	0,99998	0,61
2010001H16RIK	7100475	839,8	497,7	1208,6	310,948	517,2	296,7	871,1	221,425	0,99998	0,62
A630042L21RIK	4050324	2585,9	2320,1	2757	176,782	1594,6	979,1	2016,7	358,304	0,06048	0,62
ABHD1	5340500	387	320,5	448,3	57,87	239,1	163,7	338,5	62,808	0,14752	0,62
ATP6AP2	5570068	1229,9	823	1794,2	426,577	768,4	458,6	1346,7	343,904	0,99998	0,62
CCDC109B	6620609	515,5	301,6	683,6	176,452	318,5	74	485,1	182,893	0,99998	0,62
CXADR	5810414	217,6	96,5	386,4	122,52	134,6	86,8	194,7	40,239	0,99998	0,62
GJB2	2230730	1029	545,2	2799,5	990,342	639,6	268,1	1117,8	286,55	0,99998	0,62
GPNMB	10193	807,5	551,8	1022,6	194,033	500,9	414,7	677,6	91,95	0,99998	0,62
LOC269859	4220551	1648,9	1093,4	2251,3	552,324	1022,8	574,6	2066,8	601,168	0,99998	0,62
1500003O03RIK	6560593	451,3	287,6	592,9	148,838	282,6	140,2	496,6	166,617	0,99998	0,63
LOC100043821	3930093	321,6	228,2	482,1	108,641	204,1	130,7	384	95,963	0,99998	0,63
LOC209281	1110068	512,3	283,7	751,6	214,873	321,1	143,2	675,9	209,514	0,99998	0,63
LOC432730	4830201	477,2	328,5	593,8	116,057	301,1	181,9	479	115,085	0,99998	0,63
MPEG1	4010221	277,3	180,3	521,9	138,917	175,1	87,6	412	134,689	0,99998	0,63
PPP1CB	6580685	1283,8	743,9	1931,3	531,129	815,1	365,7	1434,5	461,134	0,99998	0,63
RAB7	870167	715,7	481,5	1139,6	266,528	448,4	231,8	771,5	226,85	0,99998	0,63
DARS	6200121	1076,8	613,9	1513,9	391,046	693,8	361,6	1123,7	278,911	0,99998	0,64
LOC100046320	4120669	525,4	308,9	802,1	198,165	336,2	195,4	635,7	165,17	0,99998	0,64
LOC100048622	4860014	257	171,7	380,9	88,417	164,3	106,8	266,6	68,738	0,99998	0,64
LOC381285	830703	469,2	250,7	760,9	213,657	301,2	146,2	619,4	182,113	0,99998	0,64
LYPLA1	6560543	604,4	337,8	862,8	250,162	388	193,3	716,7	210,914	0,99998	0,64
MEX3C	1010446	236,3	142,1	360,4	95,754	151,7	105,1	250,3	57,007	0,99998	0,64
PVR	2630209	525,5	321,2	750,3	198,456	334,9	199,7	583,3	164,359	0,99998	0,64
SCL0001905_1_3	3400709	680,7	343,9	1123	288,666	433,4	277	723,6	177,128	0,99998	0,64
CLEC4N	5360056	199,2	126,2	249,1	48,163	130,3	84,5	234,3	60,969	0,99998	0,65
CXADR	5420047	127,6	70,2	206,8	54,462	83,3	70,2	95,2	9,358	0,99998	0,65

EG633692	3370400	1929,6	1270,9	2580	555,637	1263,3	864,7	1983,2	450,725	0,99998	0,65
GDI2	380279	444,6	260,4	712,5	209,779	286,9	160,2	526,7	153,717	0,99998	0,65
GJB2	6280382	463,4	261,4	1223,1	424,883	302	158,5	513,9	121,784	0,99998	0,65
LOC270491	6550221	614,4	383,3	863	199,468	400,7	220,7	717,8	186,314	0,99998	0,65
MMP13	2490131	418,3	353,3	522,6	84,74	273,2	136,1	492,1	131,882	0,99998	0,65
MS4A6D	3180025	245	151,6	404	96,974	158,5	90,1	293,8	80,248	0,99998	0,65
PPP1CB	610202	1329,1	794,9	2071,2	556,744	863	391,5	1457,6	424,214	0,99998	0,65
PTP4A2	5820646	1309,3	968,1	1839,1	368,698	855,7	483,2	1417,3	358,903	0,99998	0,65
ROCK2	2370575	873,6	604,8	1324,5	293,297	568,8	374,2	937,8	228,11	0,99998	0,65
SFRS10	2600102	554,9	343,3	790	200,251	360,7	175	654,9	180,808	0,99998	0,65
SH3KBP1	2900129	825,5	461,1	1514,2	434,246	540,6	384,1	672,6	128,18	0,99998	0,65
SQLE	290168	792,1	533,3	1146,9	254,236	516,5	324,1	865,4	220,76	0,99998	0,65
TM9SF2	1580343	196,7	131,2	323,4	81,36	127,8	74,8	199,6	49,111	0,99998	0,65
ZC3H14	4730048	149,7	94,2	237,2	60,779	97,3	69,5	142,4	29,305	0,99998	0,65
ZDHC13	5560079	213,9	132,4	302,7	71,802	138,8	80,2	213,5	54,678	0,99998	0,65
4933427D14RIK	6860446	267,6	242	279,6	14,746	176	111,7	221,2	48,651	0,65101	0,66
AKAP2	1820402	2888,9	2227,1	3946,8	762,144	1901,6	1230,7	2985,4	688,552	0,99998	0,66
CLCNKB	2570086	410	306	650,8	139,551	271,7	180,8	441	114,115	0,99998	0,66
DDX5	2900224	227,1	127,7	313,2	78,067	149,5	91	238,6	56,777	0,99998	0,66
ESD	5860491	9549,8	6915,9	12624,1	2032,414	6291,1	4613,4	8359,3	1381,825	0,99998	0,66
FUSIP1	6650561	674,1	414,3	854	185,283	447,4	320,5	740,8	172,929	0,99998	0,66
GBP1	5690246	317,1	233,4	379,1	62,195	208,6	65	454,4	137,914	0,99998	0,66
LGSN	1470554	1968,2	1273,2	2592,1	611,555	1308	690,3	2264,5	608,13	0,99998	0,66
LHFP	4260544	1540,1	1041,6	2566,9	620,228	1020,5	537,2	1944,8	619,155	0,99998	0,66
RBBP4	7160392	136,6	118,1	148,5	14,147	90,2	78,3	108,5	11,697	0,1053	0,66
SLC17A6	1780433	352	171,7	995,3	360,162	230,8	141,8	287,2	64,72	0,99998	0,66
SNX2	7560110	355,2	264,5	469,6	92,535	235,8	153,7	386,8	94,178	0,99998	0,66
TCP1	5820672	788,4	463,5	1090,2	265,252	520,4	288,3	772,3	220,774	0,99998	0,66
TINAGL	1740338	2669,9	1868,8	3199,9	555,967	1774,9	1091,6	2912,4	608,565	0,99998	0,66
TTC15	5700612	137,8	99,3	176,8	31,87	90,3	78,5	109,1	11,419	0,99998	0,66
2310035C23RIK	4590014	263,4	174,9	396	85,643	176	134	235,9	43,895	0,99998	0,67
9530055J05RIK	6370347	92,9	79,3	104	9,739	130,6	112,1	160,6	19,363	0,99998	1,41
BMP8A	2340333	175	116	216,7	40,811	246,8	136,9	339,4	78,213	0,99998	1,41
DHCR24	6560382	382,7	252,6	454,6	77,675	537,9	411,3	758,2	154,613	0,99998	1,41
EBF3	6770497	254	176,8	367	70,498	358,9	189,2	771	207,558	0,99998	1,41
HOXC10	4810735	113,8	102,3	124,2	8,925	160	115,1	360	98,05	0,99998	1,41
LATS1	770634	118,3	89	167,2	30,435	166,4	145,5	205	21,128	0,99998	1,41
LOC100038894	2570707	384,4	143,7	511,6	150,898	540,8	150,9	1036,8	328,217	0,99998	1,41
LOC100046781	6940731	163,6	136,8	206,1	27,387	230,1	192,7	291,5	35,978	0,99998	1,41
MLLT4	6940136	1929,4	1370,2	2393,1	396,531	2713,9	2140,4	3269	425,558	0,99998	1,41
PDGFRA	5290521	600,9	318,6	827,1	190,23	849,7	621,5	1170,6	198,906	0,99998	1,41
PKP2	3710594	261	171,8	300,5	52,307	367,2	247,2	678,2	173,354	0,99998	1,41
5830417110RIK	2630736	185	147,8	216,6	25,201	262,4	197,8	305,2	43,785	0,62714	1,42
AEBP1	2190435	117,3	86	154,5	29,594	166,9	116,6	187,7	26,342	0,99998	1,42
ALDH4A1	6480288	197,1	154,6	255,8	37,863	280,5	216,4	348,8	56,101	0,99998	1,42
DDX21	3120484	456,7	386,7	588,4	78,32	649,2	484	754,6	106,791	0,85148	1,42
NCALD	5860609	122,2	91,8	173,1	32,233	173	90	482,7	152,457	0,99998	1,42
NFIC	3840059	225,4	170,3	258,1	37,542	320	262,4	377,4	48,217	0,67889	1,42
PDPK1	730280	362,5	235,6	494,3	92,899	513,1	442,4	607,8	58,982	0,99998	1,42
A230021118RIK	610347	102,4	92,3	110,7	6,687	146,5	132,4	158,1	12,211	0,31197	1,43
BMP8A	4390438	200,7	126,8	248,9	51,699	286,6	182	421,8	93,636	0,99998	1,43
CFI	4200195	164,1	119,4	245,8	49,504	234	123,8	343,6	87,142	0,99998	1,43
LOC100043822	1090725	329,5	215,7	415,2	84,897	471,7	282,8	671,5	131,362	0,99998	1,43
MRPS12	1450379	3233	2370,2	4082	761,459	4626,4	4022,8	5124,4	432,898	0,99998	1,43
NFATC3	1050647	215,1	201,9	234,9	12,532	307,5	257,4	338,4	31,353	0,31724	1,43
NPY1R	5260202	162,1	130,9	192,2	23,631	231,9	168,2	407,4	87,613	0,99998	1,43
PCYT1A	150475	480,3	338,8	621,9	107,444	684,9	433,9	833,6	148,385	0,99998	1,43
POLR1A	270274	187,9	177	202,5	12,647	268,8	225,1	314,3	36,096	0,30384	1,43
SLC4A7	6590154	785,4	493,7	978,5	197,003	1126,4	955,1	1248	115,112	0,99998	1,43
SVOP	5270520	501	233,8	831,1	221,74	714,4	379,2	1336,4	353,391	0,99998	1,43
TBX3	2970687	161	103,9	289,1	73,252	229,5	162,2	427,4	99,896	0,99998	1,43
ANKRD11	4610307	455,7	307,1	524,9	86,514	656,8	524,6	849,8	120,671	0,99998	1,44
FGF10	2600286	905,6	668,1	1144	194,967	1303,4	551	2001,8	520,57	0,99998	1,44
GCC2	20450	108,8	94,1	127	14,588	156,4	129,4	176,6	17,672	0,41289	1,44
GLI3	2710544	501,9	404,3	651,9	91,93	724	650,2	790	58,097	0,76802	1,44
NCAM1	6270521	2036,2	1605,4	2459,1	393,594	2931,1	2301,2	3863	563,326	0,99998	1,44
PLVAP	3290239	131,4	101,4	166,2	23,215	188,7	113,7	399,8	107,832	0,99998	1,44
S3-12	2760437	199,4	115,5	312,3	73,31	287,2	106,5	695,7	215,783	0,99998	1,44
SEC16B	4050601	117,6	97,5	126,9	12,154	168,7	123,2	333,4	81,45	0,99998	1,44
TNFSF15	450189	370,3	254,3	588,3	127,226	533,8	223,9	981,7	262,944	0,99998	1,44
ZFP326	4230735	239	197,5	285,6	38,591	343,1	255,8	377,5	45,127	0,49549	1,44
CACNA2D1	4850156	345,9	236,9	425,2	74,994	502,3	404,1	630,9	78,753	0,99998	1,45

SEMA5A	6020274	371,6	225,3	474,6	101,852	539,6	401	683,2	113,882	0,99998	1,45
4930572J05RIK	450180	222,6	185,9	272,2	38,752	324,9	227,3	720,3	194,655	0,99998	1,46
CCND2	1580088	8534,4	4814,4	11621,9	2676,276	12476	11621,9	15517,7	1501,759	0,99998	1,46
CDA	2350066	103,1	91,4	114,3	9,315	150,4	117,7	245,4	47,827	0,99998	1,46
CHD1	2750682	198,5	143,2	232,5	34,316	290,2	208,3	370	56,909	0,99998	1,46
COL7A1	3290209	249,6	233,2	279,1	18,622	364,2	194,4	783,9	214,858	0,99998	1,46
EBF2	6940044	135,6	93,8	173,2	30,546	197,4	123,1	332,4	71,041	0,99998	1,46
GNB4	1580133	509,6	472,4	548	33,672	744,4	434,4	1262,1	298,355	0,99998	1,46
HMGCL	7050612	2053,1	1767,1	2243,1	233,463	3003	2427,6	3681	502,323	0,45277	1,46
MYO18B	4560070	87,2	72	94,2	8,976	127,1	82,3	167,5	33,694	0,99998	1,46
SLC16A9	7320008	151	107,3	197,3	33,099	221,1	173,5	382,3	80,041	0,99998	1,46
SPON2	7570292	471,1	262	741,2	173,621	687,9	205,4	867,7	250,674	0,99998	1,46
2610103J23RIK	4230376	133,3	112,2	164,8	20,087	195,6	126,5	288	64,749	0,99998	1,47
A730054J21RIK	650435	198,1	114,6	294,3	67,335	291,6	173,8	466,6	97,955	0,99998	1,47
CCND2	1260324	6070,6	3503,5	7999,3	1913,354	8930,9	8056,4	9795,7	583,073	0,99998	1,47
NRG1	2490039	292,8	181,2	341,8	64,576	429,5	347,8	493,3	55,394	0,91453	1,47
SCL0001284.1_18	1300630	466,5	379,3	586,6	83,514	683,8	568,9	1001,6	173,972	0,99998	1,47
SERPINE2	870309	2714,8	1256,7	3716,9	1032,327	3990,4	1739,2	6050,3	1579,057	0,99998	1,47
SNX27	2570082	392,1	306	542,1	90,949	577,8	301,6	889,3	231,21	0,99998	1,47
TSLP	6960520	274,5	209,5	315,7	47,282	402,8	193,1	691,5	187,392	0,99998	1,47
ELTD1	4560121	101,8	81,3	140,2	22,994	150,4	95,8	321,5	86,323	0,99998	1,48
KLRA20	770193	81,9	68,8	93,4	9,129	121,3	79,6	189,1	46,606	0,99998	1,48
LOC380781	4670296	78	68,2	87,2	7,819	115,1	69,8	218,5	63,582	0,99998	1,48
MEGF10	4480373	209,2	164,7	258,5	43,968	309,2	209,5	699,7	191,885	0,99998	1,48
PRKG1	1450519	165,8	112,5	205,3	35,453	245,2	173,5	329,9	70,113	0,99998	1,48
NOTCH4	4250059	298	214	454,7	97,534	443,8	274,7	643,4	165,069	0,99998	1,49
TMEM14C	4200348	3370,2	1551,6	6236	1800,523	5011,6	2425,9	6250,8	1433,321	0,99998	1,49
CDH5	1030273	101,4	89,5	117,9	12,321	152,2	84,6	352,2	106,443	0,99998	1,5
CSNK2A1-RS3	430243	505,6	382,4	631,8	110,521	758	601,8	902,1	131,765	0,6282	1,5
DUSP16	7160397	248,7	119,5	336,4	88,212	374,1	245	459,3	72,757	0,99998	1,5
MLL5	4200706	375	277	483,7	74,776	563,1	466,5	766,7	118,84	0,99998	1,5
SOX5	4880553	140,9	117	168	20,8	211,8	157,8	327,2	58,88	0,99998	1,5
AW049604	3360411	158	112,1	226,4	44,937	238,5	142,5	515,7	138,238	0,99998	1,51
EGFL7	2060328	222,6	187,6	287,4	41,622	336,7	196,1	630,3	170,534	0,99998	1,51
EIF2S3Y	6960730	1008,1	66,2	2230,5	1058,778	1525,9	506	2507,3	705,509	0,99998	1,51
ELA1	5290438	139,1	114,9	161,2	18,734	209,9	139,4	429,2	110,943	0,99998	1,51
GLDN	1260021	411,7	171,6	542,5	153,116	622,5	232,9	935,3	291,165	0,99998	1,51
KLRA16	3710673	76,8	73,3	80	2,536	116,1	70,6	183,7	49,488	0,99998	1,51
LOC100047583	1400053	143,9	78,6	243,2	75,653	216,9	84,5	567,3	195,069	0,99998	1,51
MFP2	5820537	153,1	127,5	171	18,717	231,6	137,1	428,8	102,28	0,99998	1,51
PKP4	3310437	510,4	364,8	620,9	92,878	769,3	568,8	1016	169,412	0,99998	1,51
RIOK3	4290411	3994,4	3646,2	4285,2	275	6044,6	4745,9	7390,8	859,06	0,25612	1,51
DDX6	2940156	165,7	94,8	212	49,383	251,8	240,5	288	18,1	0,99998	1,52
GM949	4230379	133,8	97,8	162,3	23,994	203,4	122	326,9	69,03	0,99998	1,52
MED18	1580184	496,6	319,7	619,2	110,491	755,3	544,2	963,7	181,478	0,99998	1,52
COL6A2	1440189	442,8	234,4	723,8	180,437	676	431,1	1577,3	450,003	0,99998	1,53
FGF18	3310717	169,3	110,4	229,3	44,905	259,8	222,9	337,9	44,006	0,99998	1,53
IL1RL1	3870291	2926	1169,2	4716,4	1292,414	4475,6	1904,5	9095,1	2710,309	0,99998	1,53
ARC	3060180	156,9	125,9	182,4	28,069	242,3	138,5	563	160,426	0,99998	1,54
SNX27	1340079	309,5	260,3	429,5	69,177	475,3	282,9	735,8	169,023	0,99998	1,54
SP5	4290300	113,3	75,7	143,2	29,448	174,5	86	470,4	148,819	0,99998	1,54
ITGA2	7400554	156,6	124,2	187,8	26,171	242,6	154,2	322,6	66,64	0,99998	1,55
LOC100043822	2030131	1140,3	736,6	1502,7	307,604	1762,5	1161,1	2547,7	521,975	0,99998	1,55
PITX2	1820746	125,4	91	166,6	27,503	194,5	105,6	411,6	115,392	0,99998	1,55
ZFP326	6510524	235,5	158,8	313,1	57,399	366,2	317,7	401,7	36,084	0,41289	1,55
HOOK3	4230326	220,3	170,2	260,3	45,877	344,1	234,8	434,6	68,145	0,53245	1,56
NKX2-2	4880367	71,2	61,5	83,8	8,47	111,4	63,8	304,2	94,659	0,99998	1,57
BAT2D	7000438	178	146,8	233,6	35,612	281,2	229,3	351,7	43,655	0,09543	1,58
CCRN4L	3360553	1884,6	1460,6	2278,2	384,462	2973,5	2341,8	4281,6	759,604	0,99998	1,58
DDX6	2350243	625,5	341,6	946,5	231,564	989	845,5	1302,1	168,145	0,99998	1,58
LOC100046781	4920075	183,2	151,2	210,2	26,027	289,8	259,6	331,3	28,15	0,01709	1,58
LOC641366	3890376	134,2	87	170,2	38,129	211,4	123,4	318,2	81,378	0,99998	1,58
ADAP1	160471	480,8	235,3	734,3	178,725	763,1	382,6	1124	305,61	0,99998	1,59
GLI2	5670279	80,7	71,3	97,8	10,963	128,3	81,7	334	100,94	0,99998	1,59
LOC100048436	4760424	537,2	223,9	819,1	211,377	852,2	592,5	1145,1	205,133	0,99998	1,59
TCOF1	5270563	493,4	308,8	615,8	123,519	786,8	676,6	1234,9	219,833	0,99998	1,59
PPP1R1A	1300288	328,2	260,7	514,3	105,052	525,6	219,4	1575,4	519,844	0,99998	1,6
SLITRK5	7610246	301,5	184,5	443,8	95,714	482,7	263,9	799,5	180,678	0,99998	1,6
IL1RN	3390131	102	90,2	122,6	13,218	164,4	93,1	406,1	120,1	0,99998	1,61
MEGF10	4120300	269,2	204	359,3	77,135	433,9	288,8	974,3	266,508	0,99998	1,61

SYNM	1740364	153,5	123,2	191,5	29,213	247,5	164,7	377,9	96,707	0,99998	1,61
2810408P10RIK	4490192	124	68,8	221,7	58,568	201,3	115,8	327,1	87,366	0,99998	1,62
LUZP1	2320221	91,5	85,9	104,1	7,266	148	130,1	167,9	15,637	0,00572	1,62
RELN	7610484	94,8	77,9	125,2	19,148	153,7	74,4	299,7	102,026	0,99998	1,62
EAR11	1980095	122,2	95,2	177,8	32,528	199,5	90,3	322,4	90,775	0,99998	1,63
GABRB3	4640653	220	151,9	327,7	71,333	359,4	152,7	865,7	259,945	0,99998	1,63
TCEA3	2650372	148,3	117,6	195	36,43	241,7	190,2	298	46,683	0,45277	1,63
ZMIZ1	5670523	229,8	190,5	276,7	34,42	375,3	295,4	460	61,055	0,007	1,63
CCL7	4670674	7228,9	4188,9	9016,2	1967,004	11852,2	7223	21034,6	5003,542	0,99998	1,64
LOC381284	7100747	88,9	77	105,2	10,168	145,5	88,7	370,4	110,432	0,99998	1,64
RPS4Y2	6590008	130,2	85	160,8	30,046	213,9	118,7	397,5	107,595	0,99998	1,64
COMP	4900242	135,1	105,9	171,2	27,192	222,5	138,9	408,5	99,297	0,99998	1,65
CX3CL1	7650746	327,1	287,4	356	31,109	540,3	315,4	1431,2	438,244	0,99998	1,65
SFRP1	4060398	699,7	461,1	912,7	195,732	1156,6	282	2830,4	898,24	0,99998	1,65
SOX10	4260301	84,6	70,3	103	16,867	140,4	74,9	249	79,429	0,99998	1,66
DEADC1	2810139	1411,8	1010,5	2101,3	446,863	2361,9	1463,5	3731,1	883,799	0,99998	1,67
ZC3H13	2680746	214,7	145,9	273,9	48,229	358,8	260,8	419,5	61,958	0,06048	1,67
CUEDC1	1050020	229,3	133,8	333,6	76,581	385,3	282,5	469,1	69,313	0,59769	1,68
MEOX1	610678	77,2	62,4	87,3	9,489	129,5	80,8	329,3	98,075	0,99998	1,68
IRX5	6560021	135,7	111	168,7	24,193	229,7	134,1	453,6	113,14	0,99998	1,69
NGFR	4050064	149,2	95,2	237,9	62,658	252,3	100,1	542,5	214,442	0,99998	1,69
SFRP1	1070670	1199,5	738,6	1811,6	520,664	2027,7	657,3	4152,1	1308,419	0,99998	1,69
PPARG	2320402	206,5	158,8	244	36,178	350,5	212,3	940,4	289,462	0,99998	1,7
SCL0001849.1_2273	6370020	1209,8	734,1	1665,7	394,943	2060,9	1199,7	4532,9	1238,042	0,99998	1,7
ETV4	270010	351,2	279,8	418,6	51,49	599,1	273,4	2033,3	704,404	0,99998	1,71
PLAT	2760561	406,8	264,4	498,9	96,724	697,6	292,1	1851,8	584,973	0,99998	1,71
TWISTNB	1340408	294,5	191,2	341,4	64,494	505,6	373,2	630,3	93,579	0,04056	1,72
TWISTNB	5390129	253,2	192,3	329,8	55,965	434,8	342,2	553,7	75,529	0,02341	1,72
IRX3	60703	325,9	178,6	575,6	157,141	563,1	253,7	1192,1	326,857	0,99998	1,73
COL15A1	3850438	216,2	149,2	292,7	60,72	379	203,7	493,7	100,26	0,91453	1,75
LOC665506	6760735	142,1	117,1	163,7	19,021	249,2	107,1	708,4	228,807	0,99998	1,75
CCL17	6620437	124,9	86,8	139,4	21,636	219,8	115,3	367,2	109,468	0,99998	1,76
HOXC10	4730551	75,9	64,6	82,1	7,013	133,3	68,8	424,8	142,879	0,99998	1,76
ZBTB38	870040	208,8	138	240,9	41,52	369,1	313,9	430,3	42,854	0,00405	1,77
DLX1	2030592	130,9	115,7	154,9	17,543	233	143,7	441,4	105,517	0,99998	1,78
MRPS10	6400372	1490,6	1025,8	1902,8	423,668	2671,3	2151	4279,4	828,346	0,99998	1,79
RIOK1	3460070	541,5	157,6	1038,4	349,449	968,1	426,6	1226	287,921	0,99998	1,79
SAMD5	4890678	320,9	196,7	641,9	184,011	575,9	417,6	709,8	113,881	0,99998	1,79
SRPX2	2190139	208,1	102,3	258,1	61,057	371,7	196,4	1019,5	318,921	0,99998	1,79
NDUFB10	2100386	578,5	215,9	1200,5	456,418	1051,3	652,2	1591,4	403,675	0,99998	1,82
POU6F1	6040142	106,7	72,7	128,5	26,361	194,2	120,8	319,7	72,363	0,99998	1,82
ESAM	6550681	245,3	141	302,5	66,455	449,1	216,9	1018,7	298,973	0,99998	1,83
WNT10A	6510053	149	107	189	30,861	273	159	468,9	106,266	0,99998	1,83
HOXC9	3400368	210,5	149,9	269,4	52,704	387,6	176,2	1145,1	376,37	0,99998	1,84
KLK8	6200446	2517,2	1393,6	3550,2	796,448	4654,3	1066,1	8401,2	3214,189	0,99998	1,85
COL18A1	5690270	821	597,1	1268,7	265,046	1535,9	734	2370,2	674,087	0,99998	1,87
IFI202B	450040	78,6	74,3	82,6	3,173	146,5	75,2	258,9	60,963	0,99998	1,87
SERPINA3G	1050092	179	98,8	229,2	53,96	335,3	171	508,8	150,845	0,99998	1,87
ANK	3800670	2833,6	2283,8	3825,7	585,628	5319,3	2621,2	16557,9	5517,724	0,99998	1,88
PDE1B	3360343	516,8	352	725,2	135,291	971,1	464,7	2402,3	711,917	0,99998	1,88
SRPX2	4120719	426,5	224,9	533,7	125,218	818,8	338,9	2297,1	733,146	0,99998	1,92
CYGB	5360735	359,8	274,7	481,1	91,914	697	309,5	1005,7	312,969	0,99998	1,94
GP38	1340446	7943,2	5400,4	12048,1	2833,335	15417,3	6812,5	22625,5	5895,188	0,99998	1,94
PDE1B	3420056	558,6	384,3	768,7	139,201	1082,3	538,5	2831,9	865,722	0,99998	1,94
LOC100044842	1940059	131,1	112,7	146,1	12,311	255,4	215,4	296,4	31,808	0	1,95
CYP7B1	360187	124,5	107,4	163,3	22,435	243,4	109	830,7	288,092	0,99998	1,96
VSTM2B	4040674	136,9	95,1	170,9	36,515	269,9	114,5	918	318,108	0,99998	1,97
AGTRAP	5260433	247,6	126,1	445,6	124,397	493,7	237,6	796	239,072	0,99998	1,99
DLK1	4260241	1294,7	362,9	4067,3	1559,213	2603,6	347,4	12699,2	4951,374	0,99998	2,01
TCEA3	3780300	473,2	325	653,7	160,932	965,2	661,2	1479,2	314,133	0,7705	2,04
RGS4	4780128	206,5	147,3	258,7	48,643	425,6	254,5	923,1	249,232	0,99998	2,06
TAF12	7040088	404,9	161,8	514,7	144,632	845,9	600	1009,4	151,539	0,00572	2,09
DLK1	2850020	345,4	123	1019,3	378,606	731	135,1	3505,5	1360,272	0,99998	2,12
RGS5	3170053	126,9	96,7	169,3	27,247	270,4	134	392,8	101,005	0,90634	2,13
MMRN2	430451	87,5	69,7	126,6	23,868	189,9	68	577,7	200,753	0,99998	2,17
SP7	5260619	83	74,5	99	9,855	185,7	78,4	678,5	241,468	0,99998	2,24
IFI202B	650601	88,5	73	100,5	9,888	201,3	82,6	270,2	70,632	0,31197	2,27
COMP	3440538	374,5	170,2	743,9	229,339	885,5	345,2	1713,7	504,117	0,99998	2,36

TCEA3	2650372	148,3	117,6	195	36,43	241,7	190,2	298	46,683	0,45277	1,63
ZMIZ1	5670523	229,8	190,5	276,7	34,42	375,3	295,4	460	61,055	0,007	1,63
CCL7	4670674	7228,9	4188,9	9016,2	1967,004	11852,2	7223	21034,6	5003,542	0,99998	1,64
LOC381284	7100747	88,9	77	105,2	10,168	145,5	88,7	370,4	110,432	0,99998	1,64
RPS4Y2	6590008	130,2	85	160,8	30,046	213,9	118,7	397,5	107,595	0,99998	1,64
COMP	4900242	135,1	105,9	171,2	27,192	222,5	138,9	408,5	99,297	0,99998	1,65
CX3CL1	7650746	327,1	287,4	356	31,109	540,3	315,4	1431,2	438,244	0,99998	1,65
SFRP1	4060398	699,7	461,1	912,7	195,732	1156,6	282	2830,4	898,24	0,99998	1,65
SOX10	4260301	84,6	70,3	103	16,867	140,4	74,9	249	79,429	0,99998	1,66
DEADC1	2810139	1411,8	1010,5	2101,3	446,863	2361,9	1463,5	3731,1	883,799	0,99998	1,67
ZC3H13	2680746	214,7	145,9	273,9	48,229	358,8	260,8	419,5	61,958	0,06048	1,67
CUEDC1	1050020	229,3	133,8	333,6	76,581	385,3	282,5	469,1	69,313	0,59769	1,68
MEOX1	610678	77,2	62,4	87,3	9,489	129,5	80,8	329,3	98,075	0,99998	1,68
IRX5	6560021	135,7	111	168,7	24,193	229,7	134,1	453,6	113,14	0,99998	1,69
NGFR	4050064	149,2	95,2	237,9	62,658	252,3	100,1	542,5	214,442	0,99998	1,69
SFRP1	1070670	1199,5	738,6	1811,6	520,664	2027,7	657,3	4152,1	1308,419	0,99998	1,69
PPARG	2320402	206,5	158,8	244	36,178	350,5	212,3	940,4	289,462	0,99998	1,7
SCL0001849_1_2273	6370020	1209,8	734,1	1665,7	394,943	2060,9	1199,7	4532,9	1238,042	0,99998	1,7
ETV4	270010	351,2	279,8	418,6	51,49	599,1	273,4	2033,3	704,404	0,99998	1,71
PLAT	2760561	406,8	264,4	498,9	96,724	697,6	292,1	1851,8	584,973	0,99998	1,71
TWISTNB	1340408	294,5	191,2	341,4	64,494	505,6	373,2	630,3	93,579	0,04056	1,72
TWISTNB	5390129	253,2	192,3	329,8	55,965	434,8	342,2	553,7	75,529	0,02341	1,72
IRX3	60703	325,9	178,6	575,6	157,141	563,1	253,7	1192,1	326,857	0,99998	1,73
COL15A1	3850438	216,2	149,2	292,7	60,72	379	203,7	493,7	100,26	0,91453	1,75
LOC665506	6760735	142,1	117,1	163,7	19,021	249,2	107,1	708,4	228,807	0,99998	1,75
CCL17	6620437	124,9	86,8	139,4	21,636	219,8	115,3	367,2	109,468	0,99998	1,76
HOXC10	4730551	75,9	64,6	82,1	7,013	133,3	68,8	424,8	142,879	0,99998	1,76
ZBTB38	870040	208,8	138	240,9	41,52	369,1	313,9	430,3	42,854	0,00405	1,77
DLX1	2030592	130,9	115,7	154,9	17,543	233	143,7	441,4	105,517	0,99998	1,78
MRPS10	6400372	1490,6	1025,8	1902,8	423,668	2671,3	2151	4279,4	828,346	0,99998	1,79
RIOK1	3460070	541,5	157,6	1038,4	349,449	968,1	426,6	1226	287,921	0,99998	1,79
SAMD5	4890678	320,9	196,7	641,9	184,011	575,9	417,6	709,8	113,881	0,99998	1,79
SRPX2	2190139	208,1	102,3	258,1	61,057	371,7	196,4	1019,5	318,921	0,99998	1,79
NDUFB10	2100386	578,5	215,9	1200,5	456,418	1051,3	652,2	1591,4	403,675	0,99998	1,82
POU6F1	6040142	106,7	72,7	128,5	26,361	194,2	120,8	319,7	72,363	0,99998	1,82
ESAM	6550681	245,3	141	302,5	66,455	449,1	216,9	1018,7	298,973	0,99998	1,83
WNT10A	6510053	149	107	189	30,861	273	159	468,9	106,266	0,99998	1,83
HOXC9	3400368	210,5	149,9	269,4	52,704	387,6	176,2	1145,1	376,37	0,99998	1,84
KLK8	6200446	2517,2	1393,6	3550,2	796,448	4654,3	1066,1	8401,2	3214,189	0,99998	1,85
COL18A1	5690270	821	597,1	1268,7	265,046	1535,9	734	2370,2	674,087	0,99998	1,87
IFI202B	450040	78,6	74,3	82,6	3,173	146,5	75,2	258,9	60,963	0,99998	1,87
SERPINA3G	1050092	179	98,8	229,2	53,96	335,3	171	508,8	150,845	0,99998	1,87
ANK	3800670	2833,6	2283,8	3825,7	585,628	5319,3	2621,2	16557,9	5517,724	0,99998	1,88
PDE1B	3360343	516,8	352	725,2	135,291	971,1	464,7	2402,3	711,917	0,99998	1,88
SRPX2	4120719	426,5	224,9	533,7	125,218	818,8	338,9	2297,1	733,146	0,99998	1,92
CYGB	5360735	359,8	274,7	481,1	91,914	697	309,5	1005,7	312,969	0,99998	1,94
GP38	1340446	7943,2	5400,4	12048,1	2833,335	15417,3	6812,5	22625,5	5895,188	0,99998	1,94
PDE1B	3420056	558,6	384,3	768,7	139,201	1082,3	538,5	2831,9	865,722	0,99998	1,94
LOC100044842	1940059	131,1	112,7	146,1	12,311	255,4	215,4	296,4	31,808	0	1,95
CYP7B1	360187	124,5	107,4	163,3	22,435	243,4	109	830,7	288,092	0,99998	1,96
VSTM2B	4040674	136,9	95,1	170,9	36,515	269,9	114,5	918	318,108	0,99998	1,97
AGTRAP	5260433	247,6	126,1	445,6	124,397	493,7	237,6	796	239,072	0,99998	1,99
DLK1	4260241	1294,7	362,9	4067,3	1559,213	2603,6	347,4	12699,2	4951,374	0,99998	2,01
TCEA3	3780300	473,2	325	653,7	160,932	965,2	661,2	1479,2	314,133	0,7705	2,04
RGS4	4780128	206,5	147,3	258,7	48,643	425,6	254,5	923,1	249,232	0,99998	2,06
TAF12	7040088	404,9	161,8	514,7	144,632	845,9	600	1009,4	151,539	0,00572	2,09
DLK1	2850020	345,4	123	1019,3	378,606	731	135,1	3505,5	1360,272	0,99998	2,12
RGS5	3170053	126,9	96,7	169,3	27,247	270,4	134	392,8	101,005	0,90634	2,13
MMRN2	430451	87,5	69,7	126,6	23,868	189,9	68	577,7	200,753	0,99998	2,17
SP7	5260619	83	74,5	99	9,855	185,7	78,4	678,5	241,468	0,99998	2,24
IFI202B	650601	88,5	73	100,5	9,888	201,3	82,6	270,2	70,632	0,31197	2,27
COMP	3440538	374,5	170,2	743,9	229,339	885,5	345,2	1713,7	504,117	0,99998	2,36
ZFP365	6270372	280,6	174,4	584,9	171,079	673,6	416,8	979,5	193,94	0,45277	2,4
COL6A3	5810598	1138,1	390,6	1937,2	663,401	3017,1	613,8	11686,7	4276,233	0,99998	2,65
COL2A1	7380164	321,8	107,6	1088,8	429,316	878,9	143,7	4149,3	1603,103	0,99998	2,73
NKX2-3	1820605	114,8	92,8	164,3	28,818	321,4	98	978	352,425	0,99998	2,8
PNRC2	2850441	438,3	270,1	631	157,023	1276,9	952,8	1536,6	228,308	0	2,91
DOH4S114	7040243	184,1	117,3	218	40,314	553,7	117	2256,3	840,631	0,99998	3,01
1110005F07RIK	4810746	980,5	349,8	2480,9	873,774	3069,3	909,6	4631,2	1275,181	0,99998	3,13
COL2A1	4610152	616,8	101,9	2460	1032,011	2052,9	215,6	10550,5	4164,244	0,99998	3,33
COL2A1	6770603	441,5	108,5	1600,6	649,452	1623	163,4	8377,5	3309,833	0,99998	3,68
EMCN	5270021	247,9	97,8	530,8	177,083	1017,6	75,1	4208	1632,781	0,99998	4,1

8 Literaturverzeichnis

- Adelstein R. S. and Klee C. B.** (1981). Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase. *J.Biol.Chem.* **256**, 7501-7509.
- Aktories K., Förstermann U., Hofmann F. und Starke K.** (2005). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage. *Elsevier Urban & Fischer*
- Assoian R. K. and Marcantonio E. E.** (1996). The extracellular matrix as a cell cycle control element in atherosclerosis and restenosis. *J.Clin.Invest* **98**, 2436-2439.
- Bannister A. J. and Kouzarides T.** (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**, 641-643.
- Bartsch D., Casadio A., Karl K. A., Serodio P. and Kandel E. R.** (1998). CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell* **95**, 211-223.
- Bell L. A. and Ryan K. M.** (2004). Life and death decisions by E2F-1. *Cell Death.Differ.* **11**, 137-142.
- Bergsten E., Uutela M., Li X., Pietras K., Ostman A., Heldin C. H., Alitalo K. and Eriksson U.** (2001). PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat.Cell Biol.* **3**, 512-516.
- Blendy J. A., Kaestner K. H., Weinbauer G. F., Nieschlag E. and Schütz G.** (1996). Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature* **380**, 162-165.
- Bodor J., Boborova J. and Gress R. E.** (2000). Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER. *J.Leukoc.Biol.* **67**, 774-779.
- Bolton T. B. and Clapp L. H.** (1986). Endothelial-dependent relaxant actions of carbachol and substance P in arterial smooth muscle. *Br.J.Pharmacol.* **87**, 713-723.
- Bonni A., Brunet A., West A. E., Datta S. R., Takasu M. A. and Greenberg M. E.** (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**, 1358-1362.
- Bourtchouladze R., Abel T., Berman N., Gordon R., Lapidus K. and Kandel E. R.** (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn.Mem.* **5**, 365-374.
- Braun M., Pietsch P., Schör K., Baumann G. and Felix S. B.** (1999). Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* **41**, 395-401.

- Brindle P., Linke S. and Montminy M.** (1993). Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors. *Nature* **364**, 821-824.
- Brooks G.** (2005). Cyclins, cyclin-dependent kinases, and cyclin-dependent kinase inhibitors: detection methods and activity measurements. *Methods Mol.Biol.* **296**, 291-298.
- Carlos T. M. and Harlan J. M.** (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**, 2068-2101.
- Cartin L., Lounsbury K. M. and Nelson M. T.** (2000). Coupling of Ca(2+) to CREB activation and gene expression in intact cerebral arteries from mouse : roles of ryanodine receptors and voltage-dependent Ca(2+) channels. *Circ.Res.* **86**, 760-767.
- Casteels R., Droogmans G. and Himpens B.** (1985). Excitation-contraction coupling in vascular smooth muscle cells and perivascular nerve stimulation. *J Cardiovasc. Pharmacol.* **7**, 9-12.
- Catterall W. A.** (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **16**, 521-555.
- Cha-Molstad H., Keller D. M., Yochum G. S., Impey S. and Goodman R. H.** (2004). Cell-type-specific binding of the transcription factor CREB to the cAMP-response element. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 13572-13577.
- Chava K. R., Karpurapu M., Wang D., Bhanoori M., Kundumani-Sridharan V., Zhang Q., Ickiki T., Glasgow W. C. and Rao G. N.** (2009). CREB-mediated IL-6 expression is required for 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vascular smooth muscle cell migration. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **29**, 809-815.
- Cheung D. W.** (1984). Neural regulation of electrical and mechanical activities in the rat tail artery. *Pflugers Arch.: European journal of physiology.* **3** 335-337.
- Claesson-Welsh L.** (1996). Mechanism of action of platelet-derived growth factor. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **28**, 373-385.
- Clowes A. W., Reidy M. A. and Clowes M. M.** (1983). Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest* **49**, 208-215.
- Cui T., Nakagami H., Iwai M., Takeda Y., Shiuchi T., Tamura K., Daviet L. and Horiuchi M.** (2000). ATRAP, novel AT1 receptor associated protein, enhances internalization of AT1 receptor and inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **279**, 938-941.
- Dalvai M. and Bystricky K.** (2010). Cell cycle and anti-estrogen effects synergize to regulate cell proliferation and ER target gene expression. *PLoS One.* **6** e11011.

- Daviet L., Lehtonen J. Y., Tamura K., Griese D. P., Horiuchi M. and Dzau V. J.** (1999). Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *J.Biol.Chem.* **274**, 17058-17062.
- De Groot R. P., Delmas V. and Sassone-Corsi P.** (1994). DNA bending by transcription factors CREM and CREB. *Oncogene.* **2**, 463-468.
- Delmas V., Laoide B. M., Masquillier D., de Groot R. P., Foulkes N. S. and Sassone-Corsi P.** (1992). Alternative usage of initiation codons in mRNA encoding the cAMP-responsive-element modulator generates regulators with opposite functions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 4226-4230.
- Deng D. X., Spin J. M., Tsalenko A., Vailaya A., Ben-Dor A., Yakhini Z., Tsao P., Bruhn L. and Quertermous T.** (2006). Molecular signatures determining coronary artery and saphenous vein smooth muscle cell phenotypes: distinct responses to stimuli. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **26**, 1058-1065.
- Desch M., Sigl K., Hieke B., Salb K., Bernhard D., Jochim A., Spiessberger B., Höcherl K., Feil R., Feil S., Lukowski R., Wegener J. W., Hofmann F. and Schlossmann J.** (2010). IRAG determines nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-mediated smooth muscle relaxation. *Cardiovasc Res.* **3**, 496-505.
- Dumont J. E., Jauniaux J. C. and Roger P. P.** (1989). The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends Biochem.Sci.* **14**, 67-71.
- Enis D.R., Dunmore B., Johnson N., Pober J. S. and Print C. G.** (2008). Antiapoptotic activities of bcl-2 correlate with vascular maturation and transcriptional modulation of human endothelial cells. *Endothelium* **1**, 59-71.
- Fan J., Feng Y. and Niu Y. S.** (2010). Nonparametric estimations of genewise variance for microarray data. *Ann Stat.* **5**, 2723-2750.
- Feil R., Brocard J., Mascrez B., LeMeur M., Metzger D. and Chambon P.** (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **20**, 10887-10890.
- Feil R., Wagner J., Metzger D. and Chambon P.** (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun.* **3**, 752-757.
- Feng Y., Huang J., Ding Y., Xie F. and Shen X.** (2010). Tamoxifen-induced apoptosis of rat C6 glioma cells via PI3K/Akt, JNK and ERK activation. *Oncol Rep.* **6**, 1561-1567.
- Ferns G. A., Raines E. W., Sprugel K. H., Motani A. S., Reidy M. A. and Ross R.** (1991). Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* **253**, 1129-1132.
- Foulkes N. S., Borrelli E. and Sassone-Corsi P.** (1991). CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* **64**, 739-749.

- Fromson J. M., Pearson S. and Bramah S.** (1973). The Metabolism of Tamoxifen Part I: In Laboratory Animals. *Xenobiotica* **3**, 693-709.
- Funakoshi Y., Ichiki T., Takeda K., Tokuno T. Iino N. and Takeshita A.** (2002). Critical role of cAMP-response element-binding protein for angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **277**, 18710-18717.
- Furchgott R. F. and Zawadzki J. V.** (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **5789**, 373-376.
- Geiselhöringer A., Werner M., Sigl K., Smital P., Wörner R., Acheo L., Stieber J., Weinmeister P., Feil R., Feil S., Wegener J., Hofmann F. and Schlossmann J.** (2004). IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *The EMBO Journal.* **23**, 4222-4231.
- Gerrity R. G.** (1981). The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am.J.Pathol.* **103**, 181-190.
- Gerzanich V., Ivanov A., Ivanova S., Yang J. B., Zhou H., Dong Y. and Simard J. M.** (2003). Alternative splicing of cGMP-dependent protein kinase I in angiotensin-hypertension: novel mechanism for nitrate tolerance in vascular smooth muscle. *Circ.Res.* **93**, 805-812.
- Giachelli C. M., Bae N., Almeida M., Denhardt D. T., Alpers C. E. and Schwartz S. M.** (1993). Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J.Clin.Invest* **92**, 1686-1696.
- Gibbons G. H. and Dzau V. J.** (1994). The emerging concept of vascular remodeling. *N.Engl.J.Med.* **330**, 1431-1438.
- Gollasch M., Haase H., Ried C., Lindschau C., Morano I., Luft F. C. and Haller H.** (1998). L-type calcium channel expression depends on the differentiated state of vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* **7**, 593-601.
- Gonzalez G. A., Yamamoto K. K., Fischer W. H., Karr D., Menzel P., Biggs W. 3rd., Vale W. W. and Montminy M. R.** (1989). A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* **6209**, 749-752
- Hagiwara M., Alberts A., Brindle P., Meinkoth J., Feramisco J., Deng T., Karin M., Shenolikar S. and Montminy M.** (1992). Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* **70**, 105-113.

- Hagiwara M., Brindle P., Harootunian A., Armstrong R., Rivier J., Vale W., Tsien R., Montminy M. R.** (1993). Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4852-4859.
- Hart C. E., Bailey M., Curtis D. A., Osborn S., Raines E., Ross R. and Forstrom J. W.** (1990). Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. *Biochemistry* **29**, 166-172.
- Hartshorne D. J.** (1980). Biochemical basis for contraction of vascular smooth muscle. *Chest* **78**, 140-149.
- Haus-Seuffert P. and Meisterernst M.** (2000). Mechanisms of transcriptional activation of cAMP-responsive element-binding protein CREB. *Mol. Cell Biochem.* **212**, 5-9.
- Hawkins P. T., Eguinoa A., Qui R. G., Stokoe D., Cooke F. T., Walters R., Wennström S., Claesson-Welsh L., Evans T. and Symons M.** (1995). PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr. Biol.* **5**, 393-403.
- Hayashi S., Morishita R., Matsushita H., Nakagami H., Taniyama Y., Nakamura T., Aoki M., Yamamoto K., Higaki J. and Ogihara T.** (2000). Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21. *Hypertension* **35**, 237-243.
- Hutchison C. J., Cox R. and Ford C. C.** (1988). The control of DNA replication in a cell-free extract that recapitulates a basic cell cycle in vitro. *Development* **103**, 553-566.
- Huxley H. E.** (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science* **886**, 1356-1365
- Ichiki T.** (2006). Role of cAMP response element binding protein in cardiovascular remodeling: good, bad, or both? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 449-455.
- Inada A., Hamamoto Y., Tsuura Y., Miyazaki J., Toyokuni S., Ihara Y., Nagai K., Yamada Y., Bonner-Weir S. and Seino Y.** (2004). Overexpression of inducible cyclic AMP early repressor inhibits transactivation of genes and cell proliferation in pancreatic beta cells. *Mol Cell Biol.* **7**, 2831-2841.
- Inada A., Weir G. C. and Bonner-Weir S.** (2005). Induced ICER Igamma down-regulates cyclin A expression and cell proliferation in insulin-producing beta cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 925-929.
- Indolfi C., Awedimento E. V., Di Lorenzo E., Esposito G., Rapacciuolo A., Giuliano P., Grieco D., Cavuto L., Stingone A. M., Ciullo I., Condorelli G. and Chiariello M.** (1997). Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nat. Med.* **3**, 775-779.

- Insull W. Jr.** (2009). The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med.* **122**, 3-14.
- Ip J. H., Fuster V., Badimon L., Badimon J., Taubman M. B. and Chesebro J. H.** (1990). Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J.Am.Coll.Cardiol.* **15**, 1667-1687.
- Iyengar R.** (1996). Gating by cyclic AMP: expanded role for an old signaling pathway. *Science* **271**, 461-463.
- Jackson T. R., Blair L. A., Marshall J., Goedert M. and Hanley M. R.** (1988). The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* **335**, 437-440.
- Jawien A., Bowen-Pope D. F., Lindner V., Schwartz S. M. and Clowes A. W.** (1992). Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J.Clin.Invest* **89**, 507-511.
- Jiang L-P., Lu Y., Nie B. M. and Chen H. Z.** (2008). Antiproliferative effect of panaxynol on RASMCs via inhibition of ERK1/2 and CREB. *Chem-Biol.Interactions* **171**, 348-354.
- Johannessen M., Delghandi M. P. and Moens U.** (2004). What turns CREB on? *Cell Signal.* **11**, 1211-1227.
- Jordan V. C.** (1982). Metabolites of tamoxifen in animal and man: identification, pharmacology, and significance. *Breast Cancer Res Treat.* **2**, 123-138.
- Junqueira L. C. and Carneiro J.** (1971). *Histologia Basica. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, Brasilien*
- Kamiya K., Sakakibara K., Ryer E. J., Hom R. P., Leaf E. B., Kent K. C. and Liu B.** (2007). Phosphorylation of the cyclic AMP response element binding protein mediates transforming growth factor beta-induced downregulation of cyclin A in vascular smooth muscle cells. *Mol.Cell Biol.* **27**, 3489-3498.
- Kie J. H., Kapturczak M. H., Traylor A., Agarwal A. and Hill-Kapturczak N.** (2008). Heme oxygenase-1 deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* **9**, 1681-1691.
- Kim J. H., Yang J. I., Jung M. H., Hwa J. S., Kang K. R., Park D. J., Roh G. S., Cho G. J., Choi W. S. and Chang S. H.** (2006). Heme oxygenase-1 protects rat kidney from ureteral obstruction via an antiapoptotic pathway. *J Am Soc Nephrol* **5**, 1373-1381.
- Klemm D. J., Watson P. A., Frid M. G., Dempsey E. C., Schaack J., Colton L. A., Nesterova A., Stenmark K. R. and Reusch J. E.** (2001). cAMP response element-binding protein content is a molecular determinant of smooth muscle cell proliferation and migration. *J.Biol.Chem.* **276**, 46132-46141.

- Koh E., Morimoto S., Jiang B., Inoue T., Nabata T., Kitano S., Yasuda O., Fukuo K. and Ogihara T.** (1993). Effekts of beraprost sodium, a stable analogue of prostacyclin, on hyperplasia, hypertrophy and glycosaminoglycan synthesis of rat aortic smooth muscle cells. *Artery*. **20**, 242-252.
- Koyama N., Koshikawa T., Morisaki N., Saito Y. and Yoshida S.** (1991). Secretion of a potent new migration factor for smooth muscle cells (SMC) by cultured SMC. *Atherosclerosis* **86**, 219-226.
- Krönke G., Bochkov V. N., Huber J., Gruber F., Blüml S., Fürnkranz A., Kadl A., Binder B. R. and Leitinger N.** (2003). Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein. *J.Biol.Chem.* **278**, 51006-51014.
- Lalli E. and Sassone-Corsi P.** (1994). Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J.Biol.Chem.* **269**, 17359-17362.
- LaMorte V. J., Harootunian A. T., Spiegel A. M., Tsien R. Y. and Feramisco J. R.** (1993). Mediation of growth factor induced DNA synthesis and calcium mobilization by Gq and Gi2. *J.Cell Biol.* **121**, 91-99.
- Lavoie J. N., Rivard N., L'Allemain G. and Pouysségur J.** (1996). A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry. *Prog.Cell Cycle Res.* **2**, 49-58.
- Levick, J. R.** (1991). An Introduction to Cardiovascular Physiology. Fourth Edition, *Arnold Publication*
- Li X., Pontén A., Aase K., Karlsson L., Abramsson A., Uutela M., Bäckström G., Hellström M., Boström H., Li H., Soriano P., Betsholtz C., Heldin C. H., Alitalo K., Ostman A. and Eriksson U.** (2000). PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat.Cell Biol.* **2**, 302-309.
- Libby P.** (1992). Inducible gene expression in vascular wall cells and lesional leukocytes. *J.Vasc.Surg.* **15**, 916-917.
- Libby P. and Li H.** (1993). Vascular cell adhesion molecule-1 and smooth muscle cell activation during atherosclerosis. *J Clin Invest.* **92**, 538-539
- Lohmann S. M., Vaandranger A. B., Smolenski A., Walter U. and De Jonge H. R.** (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem.Sci.* **22**, 307-312.
- Lusis A. J.** (2000). Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-241.
- Maldonado R., Smadja C., Mazzucchelli C. and Sassone-Corsi P.** (1999). Altered emotional and locomotor responses in mice deficient in the transcription factor CREM. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 14094-14099.

- Mantamadiotis T., Lemberger T., Bleckmann S. C., Kern H., Kretz O., Martin Villalba A., Tronche F., Kellendonk C., Gau D., Kapfhammer J., Otto C., Schmid W. and Schütz G.** (2002). Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat.Genet.* **31**, 47-54.
- Maronde E., Pfeffer M., Olcese J., Molina C. A., Schlotter F., Dehghani F., Korf H. W. and Stehle J. H.** (1999). Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *J.Neurosci.* **19**, 3326-3336.
- Matus M., Lewin G., Stümpel F., Buchwaldow I. B., Schneider M. D., Schütz G., Schmitz W. and Müller F. U.** (2007). Cardiomyocyte-specific inactivation of transcription factor CREB in mice. *FASEB J.* **21**, 1884-1892.
- Mayr B. and Montminy M.** (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 599-609.
- Mead J. R., Hughes T. R., Irvine S. A., Singh N. N. and Ramji D. P.**(2003). Interferon-gamma stimulates the expression of the inducible cAMP early repressor in macrophages through the activation of casein kinase 2. A potentially novel pathway for interferon-gamma-mediated inhibition of gene transcription. *J.Biol.Chem.* **278**, 17741-17751.
- Meller R., Minami M., Cameron J. A., Impey S., Chen D., Lan J. Q., Henshall D. J. and Simon R. P.** (2005). CREB-mediated Bcl-2 protein expression after ischemic preconditioning. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **25**, 234-246.
- Michel M. C., Kenny B. and Schwinn D. A.** (1995). Classification of alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **352**, 1-10.
- Molina C. A., Foulkes N. S., Lalli E. and Sassone-Corsi P.** (1993). Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* **75**, 875-886.
- Montminy M. R., Sevarino K. A., Wagner J. A., Mandel G. and Goodman R. H.** (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**, 6682-6686.
- Mora R., Lupu F. and Simionescu N.** (1987). Prelesional events in atherogenesis. Colocalization of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular phospholipid liposomes in the aorta of hyperlipidemic rabbit. *Atherosclerosis* **67**, 143-154.
- Müller F. U., Lewin G., Baba H. A., Bokník P., Fabritz L., Kirchhefer U., Kirchhof P., Loser K., Matus M., Neumann J., Riemann B. and Schmitz W.** (2005). Heart-directed expression of a human cardiac isoform of cAMP-response element modulator in transgenic mice. *J.Biol.Chem.* **280**, 6906-6914.

- Müller F. U., Lewin G., Matus M., Neumann J., Riemann B., Wistuba J., Schütz G., Schmitz W.** (2003). Impaired cardiac contraction and relaxation and decreased expression of sarcoplasmic Ca²⁺-ATPase in mice lacking the CREM gene. *FASEB J.* **17**, 103-105.
- Mullis K. B. and Faloona F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Mulvany M. J. and Halpern W.** (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ.Res.* **41**, 19-26.
- Newby A. C. and Henderson A. H.** (1990). Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Annu.Rev.Physiol* **52**, 661-674.
- Newby A. C. and Zaltsman A. B.** (2000). Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J.Pathol.* **190**, 300-309.
- Nickenig G. and Murphy T. J.** (1994). Down-regulation by growth factors of vascular smooth muscle angiotensin receptor gene expression. *Mol.Pharmacol.* **46**, 653-659.
- Nickenig G. and Murphy T. J.** (1996). Enhanced angiotensin receptor type 1 mRNA degradation and induction of polyribosomal mRNA binding proteins by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Mol.Pharmacol.* **50**, 743-751.
- Nickenig G., Sachinidis A., Ko Y. and Vetter H.** (1995). Regulation of angiotensin AT1 receptor gene expression during cell growth of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* **3**, 307-312.
- Nilsson J. and Olsson A. G.** (1984). Prostaglandin E₁ inhibits DNA synthesis in arterial smooth muscle cells stimulated with platelet-derived growth factor. *Atherosclerosis.* **53**, 77
- Oetjen E., Diedrich T., Eggers A., Eckert B. and Knepel W.** (1994). Distinct properties of the cAMP-responsive element of the rat insulin I gene. *J.Biol.Chem.* **269**, 27036-27044.
- Ogryzko V. V., Schiltz R. L., Russanova V., Howard B. H. and Nakatani Y.** (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**, 953-959.
- Ohtsubo H., Ichiki T., Miyazaki R., Inanaga K., Imayama I., Hashiguchi Y., Sadoshima J. and Sunagawa K.** (2007). Inducible cAMP early repressor inhibits growth of vascular smooth muscle cell. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **27**, 1549-1555.
- Oikawa Y., Matsuda E., Nishii T., Ishida Y. and Kawaichi M.** (2008). Down-regulation of CIBZ, a novel substrate of caspase-3, induces apoptosis. *J.Biol.Chem.* **283**, 14242-14247.

- Ono H., Ichiki T., Fukuyama K., Iino N., Masuda S., Egashira K. and Takeshita A.** (2004). cAMP-response element-binding protein mediates tumor necrosis factor-alpha-induced vascular smooth muscle cell migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1634-1639.
- Oppermann M., Gess B., Schweda F. and Castrop H.** (2010). Atrap deficiency increases arterial blood pressure and plasma volume. *J Am Soc Nephrol.* **3**, 468-477
- Orekhov A. N., Andreeva E. R., Tertov V. V. and Krushinsky A. V.** (1984). Dissociated cells from different layers of adult human aortic wall. *Acta Anat.(Basel)* **119**, 99-105.
- Oshita A., Iwai M., Chen R., Ide A., Okumura M., Fukunaga S., Yoshii T., Mogi M., Higaki J. and Horiuchi M.** (2006). Attenuation of inflammatory vascular remodeling by angiotensin II type 1 receptor-associated protein. *Hypertension* **48**, 671-676.
- Owens G. K., Kumar M. S. and Wamhoff B. R.** (1996). Molecular regulation of smooth muscle cell differentiation. *J Hypertens Suppl.* **5**, 55-64
- Owens G. K.** (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* **75**, 487-517.
- Owens G. K., Geisterfer A. A., Yang Y. W. and Komoriya A.** (1988). Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* **107**, 771-780.
- Pabo C. O., Peisach E. and Grant R. A.** (2001). Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu.Rev.Biochem.* **70**, 313-340.
- Parker D., Ferreri K., Nakajima T., LaMorte V. J., Evans R, Koerber S. C., Hoeger C. and Montminy M. R.** (1996). Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol. Cell Biol.* **16**, 694-703.
- Paulson A. F., Lampe P. D., Meyer R. A., TenBroek E., Atkinson M. M., Walseth T. F. and Johnson R. G.** (2000). Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 17)**, 3037-3049.
- Piedrahita J. A., Zhang S. H., Hagaman J. R., Oliver P. M. and Maeda N.** (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 4471-4475.
- Quinn M. T., Parthasarathy S., Fong L. G. and Steinberg D.** (1987). Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 2995-2998.

- Quinn P. G.** (1993). Distinct activation domains within cAMP response element-binding protein (CREB) mediate basal and cAMP-stimulated transcription. *J.Biol.Chem.* **268**, 16999-17009.
- Raina H., Zacharia J., Li M. and Wier W. G.** (2009). Activation by Ca²⁺/calmodulin of an exogenous myosin light chain kinase in mouse arteries. *J. Physiol.* **587** (Pt. 11), 2599-2612.
- Ravindran A., Kobrinsky E., Lao Q. Z. and Soldatov N. M.** (2009). Functional properties of the CaV1.2 calcium channel activated by calmodulin in the absence of alpha2delta subunits. *Channels (Austin.)* **3**, 25-31.
- Ravnskjaer K., Kester H., Liu Y., Zhang X., Lee D., Yates JR 3rd and Montminy M.** (2007). Cooperative interactions between CBP and TORC2 confer selectivity to CREB target gene expression. *EMBO J.* **26**, 2880-2889.
- Reese J. C.** (2003). Basal transcription factors. *Curr Opin Genet Dev.* **2**, 114-118
- Riccio A., Ahn S., Davenport C. M., Blendy J. A. and Ginty D. D.** (1999). Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* **286**, 2358-2361.
- Ross R.** (1986). Endothelium, monocytes, platelets, and atherosclerosis. *Monogr Atheroscler.* **14**, 169-172.
- Ross R.** (1990). Mechanisms of atherosclerosis--a review. *Adv.Nephrol.Necker Hosp.* **19**, 79-86.
- Ross R.** (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809.
- Ross R. and Glomset J. A.** (1973). Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* **180**, 1332-1339.
- Rozengurt E.** (1986). Early signals in the mitogenic response. *Science* **234**, 161-166.
- Rudolph D., Tafuri A., Gass P., Hämmerling G. J., Arnold B. and Schütz G.**(1998). Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 4481-4486.
- Sambrook J. and Gething M. J.** (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **342**, 224-225.
- Sauzeau V., Le Jeune H., Cario-Toumaniantz C., Smolenski A., Lohmann S. M., Bertoglio J., Chardin P., Pacaud P. and Loirand G.** (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J.Biol.Chem.* **275**, 21722-21729.

- Schaller M. D. and Parsons J. T.** (1994). Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* **6**, 705-710.
- Schauer I. E., Knaub L. A., Lloyd M., Watson P. A., Gliwa C., Lewis K. E., Chait A., Klemm D. J., Gunter J. M., Bouchard R., McDonald T. O., O'Brien K. D. and Reusch J. E.** (2010). CREB downregulation in vascular disease: a common response to cardiovascular risk. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **30**, 733-741.
- Schauer I. E. and Reusch J. E.** (2009). Nonesterified fatty acid exposure activates protective and mitogenic pathways in vascular smooth muscle cells by alternate signaling pathways. *Metabolism* **58**, 319-327.
- Schober A. and Weber C.** (2005). Mechanisms of monocyte recruitment in vascular repair after injury. *Antioxid Redox Signal.* **9-10**, 1249-1257
- Schober A., Knarren S., Lietz M., Lin E. A. and Weber C.** (2003) Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* **108**, 2491-2497
- Schwartz S. M., Campbell G. R. and Campbell J. H.** (1986). Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ.Res.* **58**, 427-444.
- Scott M. G., Swan C., Jobson T. M., Rees S. and Hall I. P.** (1999). Effects of a range of beta2 adrenoceptor agonists on changes in intracellular cyclic AMP and on cyclic AMP driven gene expression in cultured human airway smooth muscle cells. *Br.J.Pharmacol.* **128**, 721-729.
- Shanahan C. M., Weissberg P. L. and Metcalfe J. C.** (1993). Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **73**, 193-204.
- Shaywitz A. J. and Greenberg M. E.** (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu.Rev.Biochem.* **68**, 821-861.
- Slomp J., van Munsteren J. C., Poelmann R. E., de Reeder E. G., Bogers A. J. and Gittenberger-de Groot A. C.** (1992). Formation of intimal cushions in the ductus arteriosus as a model for vascular intimal thickening. An immunohistochemical study of changes in extracellular matrix components. *Atherosclerosis* **93**, 25-39.
- Small J. V. and Sobieszek A.** (1980). The contractile apparatus of smooth muscle. *Int.Rev.Cytol.* **64**, 241-306.
- Somlyo A. P. and Somlyo A. V.** (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231-236.
- Southgate K. M., Davies M., Booth R. F. and Newby A. C.** (1992). Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation. *Biochem.J.* **288 (Pt 1)**, 93-99.

- Stary H. C.** (1990). The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J.* **E**, 3-19
- Stellos K., Bigalke B., Langer H., Geisler T., Schad A., Kögel A., Pfaff F., Stakos D., Seizer P., Müller I., Htun P., Lindemann S. and Gawaz M.** (2009). Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34+ progenitor cells. *Eur.Heart J.* **30**, 584-593.
- Stevens A.** (1997). Human Histology, Second Edition, *Times Mirror International Publishers Limited*
- Stevenson A. S., Cartin L., Wellman T. L., Dick M. H., Nelson M. T. and Lounsbury K. M.** (2001). Membrane depolarization mediates phosphorylation and nuclear translocation of CREB in vascular smooth muscle cells. *Exp.Cell Res.* **263**, 118-130.
- Stoelting M., Geyer M., Reuter S., Reichelt R., Bek M. J. and Pavenstädt H.** (2009). Alpha/beta hydrolase 1 is upregulated in D5 dopamine receptor knockout mice and reduces O₂- production of NADPH oxidase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **379**, 81-85.
- Thyberg J.** (1998). Phenotypic modulation of smooth muscle cells during formation of neointimal thickenings following vascular injury. *Histol.Histopathol.* **13**, 871-891.
- Timpl R.** (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol.* **5**, 618-624.
- Tokunou T., Ichiki T., Takeda K., Funakoshi Y., Iino N. and Takeshita A.** (2001). cAMP response element-binding protein mediates thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **21**, 1764-1769.
- Tokunou T., Shibata R., Kai H., Ichiki T., Morisaki T., Fukuyama K., Ono H., Iino N., Masuda S., Shimokawa H., Egashira K., Imaizumi T. and Takeshita A.** (2003). Apoptosis induced by inhibition of cyclic AMP response element-binding protein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* **108**, 1246-1252.
- van Zwieten P. A. and Doods H. N.** (1995). Muscarinic receptors and drugs in cardiovascular medicine. *Cardiovasc Drugs Ther.* **1**, 159-167.
- Wadzinski B. E., Wheat W. H., Jaspers S., Peruski L. F. Jr, Lickteig R. L., Johnson G. L. and Klemm D. L.** (1993). Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol.Cell Biol.* **13**, 2822-2834.
- Walker W. H., Girardet C. and Habener J. F.** (1996). Alternative exon splicing controls a translational switch from activator to repressor isoforms of transcription factor CREB during spermatogenesis. *J.Biol.Chem.* **271**, 20145-21050.

- Wallukat G.** (2002). The beta-adrenergic receptors. *Herz* **27**, 683-690.
- Wang X. and Murphy T. J.** (2000). The inducible cAMP early repressor ICERIIgamma inhibits CREB and AP-1 transcription but not AT1 receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. *Mol.Cell Biochem.* **212**, 111-119.
- Witztum J. L., Reaven P. D. and Parthasarathy S.** (1993). Studies on the ability of dietary supplementation with beta-carotene to protect low-density lipoprotein from oxidative modification. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **691**, 200-206.
- Wirth A., Benyó Z., Lukasova M., Leutgeb B., Wettschureck N., Gorbey S., Orsy P., Horváth B., Maser-Gluth C., Greiner E., Lemmer B., Schütz G., Gutkind J. S. and Offermanns S.** (2008). G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med.* **1**, 64-68.
- Wolfsgruber W., Feil S., Brummer S., Kuppinger O., Hofmann F. and Feil R.** (2003). A proatherogenic role for cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *PNAS.* **23**, 13519-13524.
- Wu G. Y., Deisseroth K. and Tsien R. W.** (2001). Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* **5**, 2808-2813.
- Yamaguchi H., Igarashi M., Hirata A., Tsuchiya H., Susa S., Tominaga M., Daimon M. and Kato T.** (2001). Characterization of platelet-derived growth factor-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Eur.J.Clin.Invest* **31**, 672-680.
- Yang J. X. and Lin Y.** (2005). The action of PKA on Smooth muscle myosin phosphorylation. *Life Sci.* **21**, 2669-2675.
- Yang L., Froio R. M., Sciuto T. E., Dvorak A. M., Alon R. and Luscinskas F. W.** (2005). ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow. *Blood* **2**, 584-592.
- Zhang S. H., Reddick R. L., Piedrahita J. A. and Maeda N.** (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* **258**, 468-471.
- Zhang X., Odom D. T., Koo S. H., Conkright M. D., Canettieri G., Best J., Chen H., Jenner R., Herbolsheimer E., Jacobsen E., Kadam S., Ecker J. R., Emerson B., Hogenesch J. B., Unterman T., Young R. A. and Montminy M.** (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 4459-4464.
- Zhou D., Masri S., Ye J. J. and Chen S.** (2005). Transcriptional regulation of the mouse PNRC2 promoter by the nuclear factor Y (NFY) and E2F1. *Gene* **361**, 89-100.

Kongressbeiträge:Poster:

A. K. Steingräber, M. D. Seidl, T. M. H. Sur, W. Schmitz and F. U. Müller (2009).

Role of transcription factor CREM in the regulation of vascular proliferation

DGPT 2009; 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie; Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vortrag:

A. K. Steingräber, M. D. Seidl, T. M. H. Sur, W. Schmitz and F. U. Müller (2009).

Die Bedeutung des “cAMP-response element binding modulator” CREM in der Regulation des vaskulären Remodelings

DGK 2009; 75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim.

Publikation:

Bredendiek N., Hütte J., Steingräber A., Hatt H., Gisselmann G. and Neuhaus E. M. (2011). Goα is involved in sugar perception in *Drosophila*. *Chemical Senses* **36**, 69-81.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn **Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller** für die Überlassung des interessanten und methodisch vielseitigen Dissertationsthemas, für die vielen Anregungen und die konstruktive Kritik sowie für die wertvollen fachlichen und beruflichen Ratschläge.

Frau **Prof. Dr. rer. nat. Eva Liebau** danke ich für die freundliche Übernahme der naturwissenschaftlichen Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz** danke ich für die freundliche Aufnahme in das Institut sowie für die stete Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Tipps.

Bei Herrn **Dr. rer. nat. Matthias Seidl** möchte ich mich besonders für die hilfsbereite Betreuung und die tatkräftige Unterstützung sowie für die zahlreichen wissenschaftlichen und auch nichtwissenschaftlichen Gespräche bedanken.

Bei Frau **Danuta Mitko**, Frau **Maria Schulik**, Frau **Melanie Voss**, Frau **Andrea Walter** und Frau **Viktoria Schneider** bedanke ich mich recht herzlich für die Hilfsbereitschaft und die praktische Unterstützung sowie für die vielen netten Gespräche.

Ein großes Dankeschön gilt **allen Mitarbeitern** des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für das hervorragende Arbeitsklima und die vielen privaten Unternehmungen.

Ein besonderer Dank gilt dabei Frau **Huyen Sur**, Frau **Dr. rer. nat. Kirsten Schulte**, Frau **Dr. rer. nat. Dana Kùcerová**, Herrn **PD Dr. rer. nat. Peter Boknik** und Herrn **Dr. med. Frank Stümpel** die immer für gute Stimmung gesorgt haben und mir stets mit Rat und Tat zu Seite standen.

Meinem Partner und Kollegen **Rainer Michaelis** danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Bei meiner **Schwester Sarah** möchte ich mich für die vielen Unternehmungen und netten Gespräche während unserer gemeinsamen Zeit in Münster bedanken.

Ich danke meinen **Großeltern** und ganz besonders meinen **Eltern** für ihre liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung, weswegen ich ihnen diese Arbeit widmen möchte.

