

Aus dem Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Assmann-

HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren-abhängige Veränderungen im Stoffwechsel
der extrazellulären Matrix vaskulärer glatter Muskelzellen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Ahrlich, Dörte
aus Halle/Saale
2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Annette Schmidt

2. Berichterstatter: em. Univ.-Prof. Dr. Eckhart Buddecke

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2007

Aus dem Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Assmann-

Referent: Prof. Dr. Annette Schmidt

Koreferent: em. Univ.-Prof. Dr. Eckhart Buddecke

ZUSAMMENFASSUNG

HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren-abhängige Veränderungen im Stoffwechsel
der extrazellulären Matrix vaskulärer glatter Muskelzellen

Ahrlich, Dörte

Die antiarteriosklerotische Wirkung der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) ist durch zahlreiche multizentrische klinische Studien belegt, in denen eine effektive Senkung des Blutplasma-Cholesterinspiegels nachgewiesen wurde. Statine werden weltweit zur Prävention und Behandlung der Arteriosklerose eingesetzt. Neben der Senkung des Plasma-Cholesterinspiegels wurden jedoch auch antiinflammatorische, immunmodulierende und weitere Wirkungen auf verschiedene Erkrankungen beschrieben, die unter dem Begriff „non-lipid lowering effects of statins“ zusammengefasst werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Lovastatin – einer der Prototypen der Statin-Familie – auf den Stoffwechsel der Extrazellulären Matrix (ECM) glatter Muskelzellen aus humanen Koronararterien untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt: In 1 mikromolarer Konzentration hemmt Lovastatin (L) die Zellteilung und überführt die kultivierten glatten Muskelzellen (SMC) in einen hypertrophen Wachstumsstatus mit vergrößertem Zellvolumen und erhöhtem Gesamtproteingehalt. Diese Veränderungen sind assoziiert mit einer Überexpression des profibrotisch wirksamen Zytokins TGF- β und einer vermehrten Synthese von ECM-Komponenten. Dies wird belegt durch einen Nachweis der Aktivierung der Gene des Kollagen V, der Proteoglycane Perlecan und Syndecan-2 und des basischen Fibroblasten Wachstumsfaktors bFGF sowie der korrespondierenden exprimierten Proteine. Die erhöhte Syntheserate von Kollagen und sulfatierten Proteoglykanen zeigte sich durch vermehrte Inkorporation von [^3H]Prolin und [^{35}S]Sulfat in die neu synthetisierten Proteine und Glukosaminoglykane.

Die erhobenen Ergebnisse geben Hinweise auf die Annahme, dass sich die pleiotrope Wirkung der Statine auch auf den Stoffwechsel der ECM des arteriellen Gefäßsystems erstreckt. Die Bedeutung für die Arteriosklerose liegt in der Tatsache, dass der von SMC gebildeten ECM eine wichtige Funktion als fibröse Deckschicht über der lipidreichen arteriosklerotischen Plaque zukommt, die unter der Wirkung von Statinen bessere mechanische Eigenschaften erreichen und zu einer Stabilisierung arteriosklerotischer Läsionen beitragen kann.

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2007

Inhaltsverzeichnis

1.0	Einleitung	1
1.1	HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine)	1
1.1.1	Hemmung der Cholesterinsynthese	5
1.1.2	Prenylierte Proteine	6
1.1.3	Senkung der Lipoproteine des Blutplasmas	10
1.2	Lipoprotein-unabhängige Effekte der Statine	12
1.3	Statine und Arterien-Stoffwechsel	21
1.3.1	Extrazelluläre Matrix des Arterien­gewebes	21
1.3.2	Physiologische Funktion	31
1.3.3	Arteriosklerotische Plaque und fibröse Deckschicht	32
1.3.3.1	Molekulare Pathogenese der Arteriosklerose und die besondere Bedeutung der fibrösen Deckschicht	33
2.0	Fragestellung	36
3.0	Material und Methoden	37
3.1	Biochemikalien	37
3.2	Zellkultur	37
3.2.1	Untersuchungsgut – human coronary arterial smooth muscle cells (vSMC)	37
3.2.2	Auftauen von humanen vSMCs	37
3.2.3	Subkultivierung	38
3.2.4	Herstellung von Lovastatin	38
3.2.5	Standardversuch	39

3.3	Bestimmung von Zellzahl und Zellprotein	39
	3.3.1 Zellzahlbestimmung	39
	3.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry	40
3.4	Radioaktive Markierung	41
	3.4.1 Bestimmung der [³ H]Thymidineinbaurate in kultivierte arterielle SMCs	41
	3.4.2 [³⁵ S]Sulfat-Markierung und [³ H]Prolin-Markierung von Zellkompartimenten	42
3.5	Zellkompartimente	43
	3.5.1 Gewinnung von Proben zur Quantifizierung von Wachstumsfaktoren	43
	3.5.1.1 im Zellkulturmedium	43
	3.5.1.2 im Peri- und Intrazellulärraum	43
	3.5.1.3 im Perizellulärraum	44
	3.5.1.4 im Intrazellulärraum	44
	3.5.1.5 im Subzellulärraum (ECM)	45
	3.5.2 Neutralisation der biologischen Aktivität von TGF-β ₁ mittels monoklonaler Anti-humaner TGF-β ₁ Antikörper	45
3.6	ELISA-Bestimmungen	45
	3.6.1 human FGF basic ELISA	46
	3.6.2 human TGF-β ₁ ELISA	46
	3.6.3 Cell Death Detection ELISA	47
3.7	Molekularbiologische Untersuchungen	48
	3.7.1 RNA-Isolierung	48
	3.7.2 Reverse Transkription	49
	3.7.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
	3.7.4 cDNA-Agarose-Gelelektrophorese	53
	3.7.4.1 Herstellung eines 2 %igen Agarosegels	54
	3.7.4.2. Elektrophorese	54
	3.7.4.3. Fotografieren des Agarosegels	55

3.7.4.4.	Densitometrische Auswertung des Agarosegelfotos	55
3.8	Statistische Analyse	55
4.0	Ergebnisse	56
4.1	Wachstum und Teilung kultivierter arterieller SMCs unter dem Einfluss von Lovastatin	56
4.1.1	Lovastatin-abhängige [³ H]Thymidineinbaurate	61
4.1.2	Cell-Death-Detection in Abhängigkeit von Lovastatin	63
4.2	Lovastatin-assoziierte Überexpression von TGF-β ₁ und bFGF	65
4.2.1	Transforming Growth Factor β ₁ (TGF-β ₁)	65
4.2.2	Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	72
4.3	Lovastatin-bedingte Veränderung von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM)	75
4.3.1	Proteoglykane ([³⁵ S]Sulfat-Markierung von Zellkompartimenten, cDNA-Agarose-Gelelektrophorese von Versican, Decorin, Biglykan, Perlecan, Syndecan 1-4)	75
4.3.2	Kollagen ([³ H]Prolin-Markierung, Agargelelektrophorese der cDNA der Kollagentypen I, III, V)	79
5.0	Diskussion	84
5.1	Bedeutungen der Statine für die Prävention und Behandlung der Arteriosklerose	84
5.2	Statine und der Stoffwechsel der vaskulären ECM	87
5.3	Stabile und instabile arteriosklerotische Plaques	95
5.4	Regulative Effekte von Wachstums- und Transformationsfaktoren	100
5.5	Schlussfolgerungen und Perspektiven	109

6.0 Abkürzungsverzeichnis 110

7.0 Literaturverzeichnis

Danksagung I

Lebenslauf II

1.0 Einleitung

Eine Behandlung mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren kann, wie in verschiedenen klinischen Studien bereits gezeigt wurde (Waters 2006, Liao et al. 2002, Vaughan et al. 2000), arteriosklerotische Plaques stabilisieren und die Progression der Arteriosklerose verlangsamen. Neben einem gesteigerten Wachstum vaskulärer glatter Muskelzellen, einer verstärkten Lipidakkumulation und einer erhöhten Makrophageninfiltration spielt vor allem auch die Produktion großer Mengen von Extrazellulärer Matrix (ECM) durch aktivierte vaskuläre glatte Muskelzellen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Arteriosklerose. Ein wichtiger Aspekt hinsichtlich der Plaquestabilität und -größe ist die Zusammensetzung dieser vaskulären extrazellulären Matrix. HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren rufen Veränderungen im Stoffwechsel der extrazellulären Matrix kultivierter vaskulärer glatter Muskelzellen hervor und verändern die Expression von ECM-Molekülen, die typischerweise in arteriosklerotischen Läsionen vorkommen. Zu solchen ECM-Molekülen zählen beispielsweise Kollagen I, III, V und Proteoglykane, die in fibrösen arteriosklerotischen Läsionen zu finden sind, sowie die Zytokine TGF- β_1 und bFGF, die die Synthese vieler dieser ECM-Moleküle stimulieren.

1.1 HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine)

Die Substanzklasse der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) wurde erstmals 1976 in Form von Mevastatin aus Penicillium-Pilzen isoliert (Igel et al. 2002). Später wurde das mit dem Mevastatin strukturell verwandte Lovastatin aus Aspergillus terreus Pilzen gewonnen, aus denen auch Simvastatin und Pravastatin hergestellt werden (Igel et al. 2002). Die Struktur von Lovastatin unterscheidet sich von Mevastatin durch das Vorhandensein einer 6 alpha-Methylgruppe im Hexahydronaphthalenring des Moleküls (Alberts 1988). Lovastatin ist ein natürliches Produkt, das aus zwei sich vom Acetat ableitenden Polyketidketten besteht (Alberts 1988). Die Methylgruppe des C4-Kohlenstoffatoms der Seitenkette sowie die 6

alpha-Methylgruppe entstammen dem Methionin und diese wird vor dem Ringschluss angefügt (Alberts 1988). Lovastatin ist eine eigenständige von *Aspergillus terreus* synthetisierte Verbindung und kein bloßes Intermediärprodukt in der Bildung von Mevastatin (Alberts 1988). Bei Simvastatin und Pravastatin handelt es sich um chemisch modifizierte semisynthetische Analoga von Lovastatin. Das racemische Derivat Fluvastatin und Atorvastatin sind rein chemisch synthetisierte Substanzen (Igel et al. 2002).

Statine lassen sich demnach in Typ 1 (nichtsynthetische Inhibitoren wie Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin) oder Typ 2 (synthetische Inhibitoren wie Fluvastatin und Atorvastatin) klassifizieren (Istvan et al. 2002). Typ 1 Statine enthalten eine Decalin (Decahydronaphthalene) Ringstruktur, die mit einer HMG-CoA ähnlichen Struktur verknüpft ist (Abb.2) (Istvan et al. 2002). Typ 2 Statine haben als charakteristisches Merkmal Fluorphenylgruppen (Abb.2), die für physikalisch-chemische Eigenschaften wie Hydrophobizität der Statine verantwortlich sind (Istvan et al. 2002). Bei den Statinen handelt es sich, mit Ausnahme von Pravastatin, das extrem hydrophil ist, um eine lipophile Substanzklasse (Stancu et al. 2001). Allerdings unterscheiden sie sich auch in ihrer spezifischen Aktivität, die die Darreichungsform bestimmt. Die inaktive Lactonform von Lovastatin und Simvastatin wird per os verabreicht und in der Leber enzymatisch in die aktive Hydroxysäure umgewandelt (Abb. 1). Es handelt sich im Gegensatz zu allen anderen Statinen, die in ihrer aktiven Wirkform zugeführt werden müssen, um Prodrugs (Stancu et al. 2001).

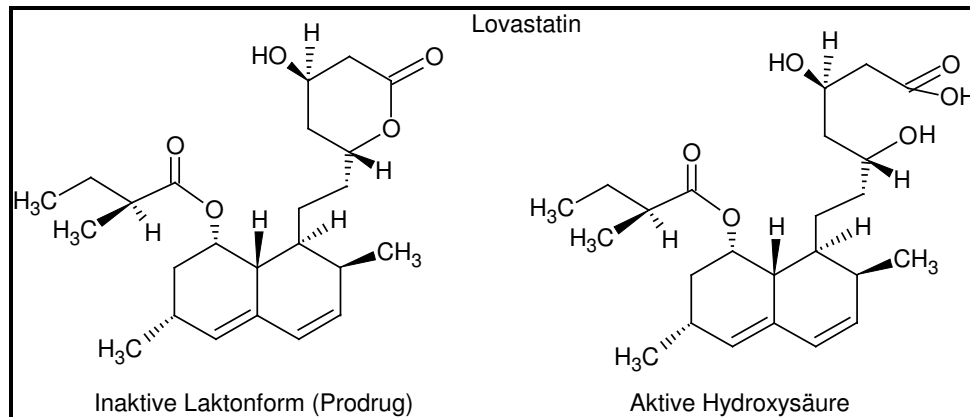


Abbildung 1 Inaktive und aktive Form von Lovastatin.

Auch bezüglich des Metabolismus in der Leber, dem Zielorgan aller Statine, unterscheidet sich diese Substanzklasse (Stancu et al. 2001). >70 % der verabreichten Dosis von Fluvastatin und Lovastatin, >80 % von Simvastatin und 46 % von Pravastatin verbleiben in der Leber. Dabei werden Lovastatin, Simvastatin und Atorvastatin durch Cytochrom P450 (CYP 3A4) abgebaut, Fluvastatin folgt dem CYP 2C9 Abbauweg und Pravastatin wird anders metabolisiert (Stancu et al. 2001). Momentan befinden sich fünf Statine im klinischen Gebrauch (Abb.2): Lovastatin, Simvastatin, Pravastatin, Atorvastatin und Fluvastatin (Stancu et al. 2001). Die in vielen in vitro Experimenten eingesetzten hohen Statindosen (1-100 μM) haben dazu geführt, dass Vorbehalte hinsichtlich der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen formuliert wurden, da derart hohe Konzentrationen zwar in vitro in Petrischalen aber kaum in vivo im Plasma oder Gewebe von Patienten während einer Statintherapie erreicht werden können. Nach einmaliger oraler Applikation von 40 mg Lovastatin beträgt die durchschnittliche Konzentrationsspitze der biologisch aktiven Lovastatin β -Hydroxysäureform 30 ng/mL (74nM) (Munro et al. 1994). Dieser Wert würde dem verwendeten Konzentrationsbereich von 0,25- 2,0 μM der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente entsprechen.

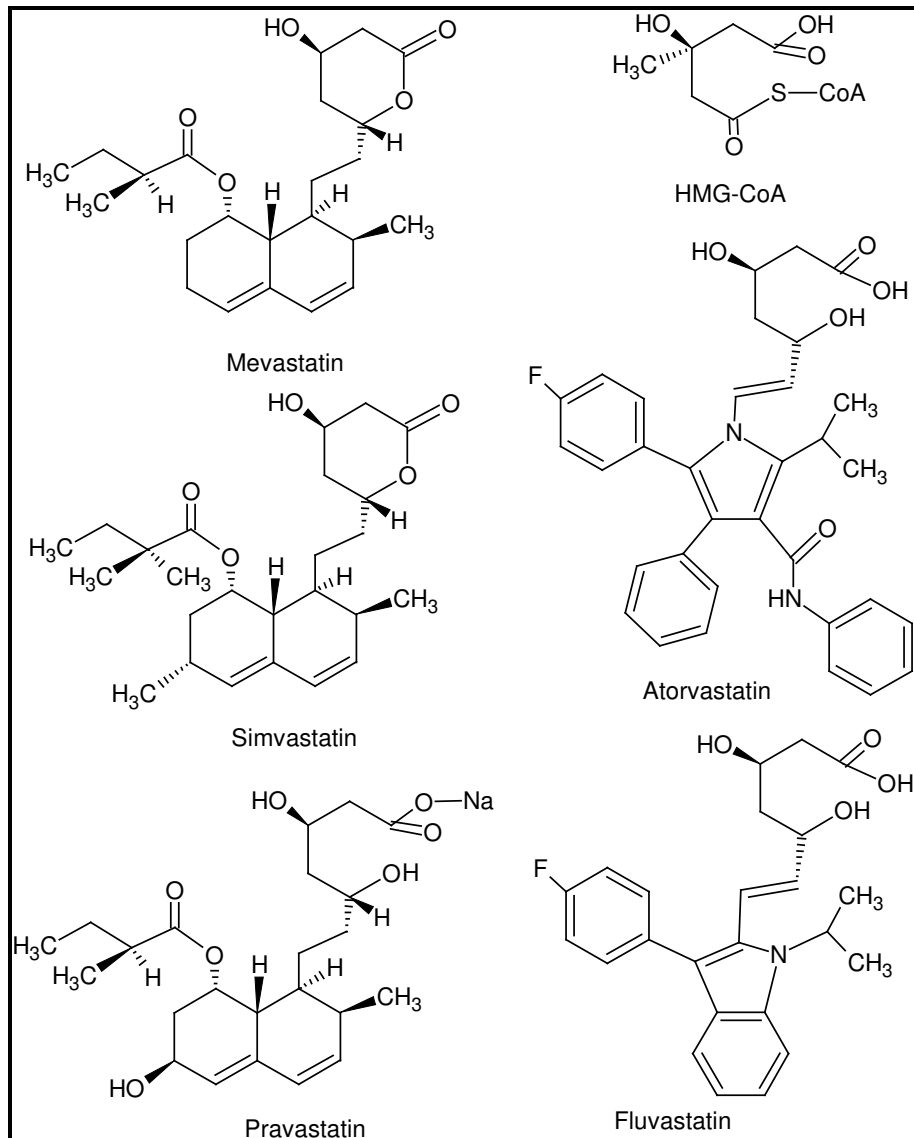


Abbildung 2 Chemische Strukturen von Typ 1 und Typ 2 Statinen im Vergleich zu HMG-CoA.

Man kann die Effekte der Statine unterteilen in solche, die direkt den Lipidstoffwechsel beeinflussen (Hemmung der Cholesterinsynthese, erhöhte Aufnahme und Abbau von LDL, Hemmung der Lipoproteinsekretion, Hemmung der LDL-Oxidation, Inhibition der Scavenger Rezeptor Expression) und solche, die intrazelluläre Signalwege modulieren (u.a. Verminderung inflammatorischer Prozesse, Erhöhung der Plaquestabilität, Reduktion der Akkumulation von verestertem Cholesterin in Makrophagen, Steigerung der Aktivität der endothelialen NO-Synthetase) (Stancu et al. 2001).

1.1.1 Hemmung der Cholesterinsynthese

Statine verringern den intrazellulären Cholesteringehalt, indem sie das Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese HMG-CoA-Reduktase kompetitiv hemmen. Das Enzym 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase katalysiert die Synthese von Mevalonat, einem Cholesterinvorläufer, aus HMG-CoA. Diese Reduktion erfolgt unter Verbrauch von 2 NADPH und unter Abspaltung von CoA-SH hauptsächlich in Hepatozyten. Eine vollständige Inhibition der Cholesterin- und Isoprensynthese ist durch die hohe Affinität der Statine (nM im Vergleich zu μM beim natürlichen Substrat HMG-CoA, Stancu et al. 2001) zur HMG-CoA-Reduktase möglich. Statine kompetieren nicht nur mit dem normalen Substrat dieser Reaktion, sondern führen durch die Bindung ihrer hydrophoben Seitenketten an das aktive Zentrum des Enzyms eine reversible Konformationsänderung des Enzymmoleküls herbei (Istvan et al. 2002). Dadurch wird verhindert, dass die HMG-CoA-Reduktase mit dem Substrat HMG-CoA eine funktionelle Struktur für die Enzymkatalyse erlangen kann. Die spezifische und sehr feste Bindung der Statine kommt durch große Van der Waals Kräfte zwischen dem Inhibitor und der HMG-CoA-Reduktase zustande (Istvan et al. 2002).

Allerdings nimmt die Menge dieses Enzyms, die immunologisch nachweisbar ist, unter einer Statinbehandlung um ein bis zwei Größenordnungen zu. Erklärbar ist dieser Effekt, der durch den intrazellulären Cholesterinmangel ausgelöst wird, einerseits durch die gesteigerte Expression der HMG-CoA-Reduktase und andererseits durch den verminderten Abbau des Enzyms. Ein erniedrigter zellulärer Cholesterinspiegel führt zu einer erhöhten Transkription der mRNA der HMG-CoA-Reduktase, der HMG-CoA-Synthetase, der Prenyltransferase und des LDL-Rezeptors. Diese Gene haben in ihrer Promotorregion ein Sterolregulationselement 1 (SRE-1). Dieser Enhancer aktiviert die Transkription der genannten Gene, wenn sogenannte Sterol response element binding proteins (SREBP) an ihn binden. SREBP wirkt nur in Kombination mit einem weiteren Membranprotein (SCAP), das eine Funktion als Cholesterinsensor hat, als Transkriptionsfaktor. Bindet Cholesterin an diesen Sensor, löst sich der

Komplex aus SREBP und SCAP. Dadurch wird dieser Transkriptionsfaktor inaktiviert und die Transkription sowie Expression der für die Cholesterinsynthese benötigten Gene gedrosselt. Dieser Mechanismus führt dazu, dass diese Gene nur dann transkribiert werden, wenn Cholesterinmangel besteht. Die HMG-CoA-Reduktase selbst ist auch Cholesterinsensitiv. In Anwesenheit von Cholesterin erfolgt ein gesteigerter Abbau dieses Schlüsselenzyms und damit eine verringerte Cholesterinsynthese. Die normale Halbwertszeit der HMG-CoA-Reduktase liegt bei zwei Stunden und erhöht sich unter dem Einfluss von Statinen auf ungefähr 11 Stunden, wohingegen die Gegenwart von Mevalonat die HWZ auf weniger als 40 Minuten herabsetzt.

1.1.2 Prenylierte Proteine

Proteine, die vor allem bei Regulationsvorgängen eine wichtige Rolle spielen, können posttranskriptional mit einem oder mehreren Farnesyl- oder Geranylgeranylresten, die aus drei bis vier Isopreneinheiten (15 bzw. 20 C-Atome) bestehen, modifiziert beziehungsweise prenyliert werden. Bevor bei der Cholesterinsynthese Squalen und Cholesterin entstehen, teilt sich der Mevalonatpfad in Nebenwege der Cholesterinsynthese auf, bei denen Farnesylpyrophosphat und andere wichtige Polyisoprenoid Effektoren entstehen. Prenyliert werden verschiedene Proteine wie Ras-Oncogene, viele gamma-Untereinheiten der G-Proteine, einige Proteinkinasen, Lamine in der Kernmembran und Rab-Proteine, die am Vesikeltransport beteiligt sind. Die Funktionen, die durch diese Prenylierung vermittelt werden sind entsprechend mannigfaltig: Dolicholpyrophosphat spielt als Co-Faktor bei der N-Glykosylierung von Glykoproteinen, die für die Exkretion an die Zelloberfläche oder den Extrazellulären Raum benötigt werden, eine wichtige Rolle (Riessen R et al.. 1999), Ubichinon ist an der Atmungskette in den Mitochondrien beteiligt, Farnesylpyrophosphat führt zur Prenylierung von Ras und Geranylgeranylpyrophosphat wird für die Prenylierung von Rho und Rac, Rab sowie Rap benötigt (Stancu et al. 2001) (Abb.3).

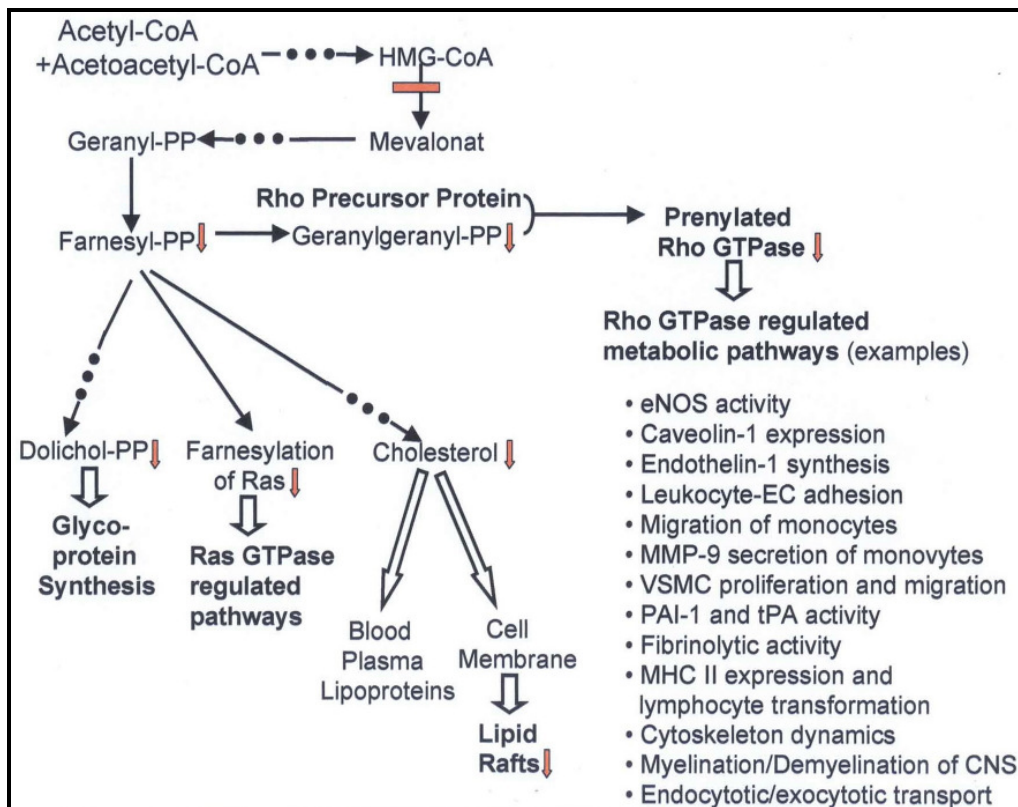


Abbildung 3 Der Mevalonatpfad als Nebenweg der Cholesterinsynthese wird durch Statine gestört. Durch eine herabgesetzte Isoprenylierung von Signalmolekülen werden verschiedene Signalwege moduliert¹.

Kleine GTPasen der Rho-Familie haben eine große Bedeutung für Zellfunktionen, wie Zellwachstum, -differenzierung und Zellzyklusprogression, Organisation und Kontraktion des Aktinzytoskeletts, Protein- und Lipidtransport sowie intra- und interzelluläre Signaltransduktion (Schmidt 2005). Durch die posttranslationale Prenylierung von Regulationsproteinen werden Lipidbindungsstellen erzeugt, die die Membranbindung, den intrazellulären Transport und die biologische Aktivität dieser Proteine beeinflussen (Schmidt 2005). Die Prenylierung von Proteinen ist von der freien intrazellulären Verfügbarkeit von Intermediaten des Mevalonatpfades abhängig, deren intrazellulärer Gehalt wiederum durch die Hemmung der Mevalonsäuresynthese vermindert wird. Veränderungen der Funktion kleiner G-Proteine, die zwischen dem inaktiven GDP-gebundenen und dem aktiven GTP-gebundenen Zustand wechseln und

¹ Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. E. Buddecke

deren Membranlokalisation und -funktion von der Prenylierung abhängen, stehen in direkter Verbindung mit den Effekten der Statine und der verschlechterten Isoprenoidsynthese (Liao 2002). Spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche sind mit G-Proteinen oder Ser/Thr/Tyr Kinaseaktivitäten assoziiert (Stancu et al. 2001). Die gamma Untereinheit kleiner Rho G-Proteine muss geranylgeranyliert werden, damit es möglich ist, dass diese Signalproteine in der Membran benachbart zu spezifischen Rezeptoren verankert werden und auf diese Weise extrazelluläre Signale empfangen können, die dann durch sekundäre Signalmoleküle in die Zelle transferiert werden (Stancu et al. 2001). Die Translokation der Ras GTPasen vom Zytoplasma zur Zellmembran hängt in Endothelzellen von der Farnelysierung ab. Da Statine die Ras und Rho Isoprenylierung hemmen, führen sie so zu einer Ansammlung von inaktivem Ras und Rho im Zytoplasma (Liao et al. 2005). Die kleinen GTPasen sind also für viele Cholesterinunabhängige Effekte der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren verantwortlich und zwar nicht nur in vaskulären Zellen, sondern auch in Leukozyten und im Knochen (Liao et al. 2005).

Weiterhin haben Statine auch Einfluss auf die Stabilität und Funktion von Zellmembranen, da die Hauptkomponente von Zellmembranen und von wichtigen Membranarealen wie Lipid Rafts (engl. FLoß) Cholesterin ist. Diese „FLöBe“ schwimmen in der Membranlipidphase und sind mit vielen über Lipide in der Membran verankerten Proteinen assoziiert (Abb.4).

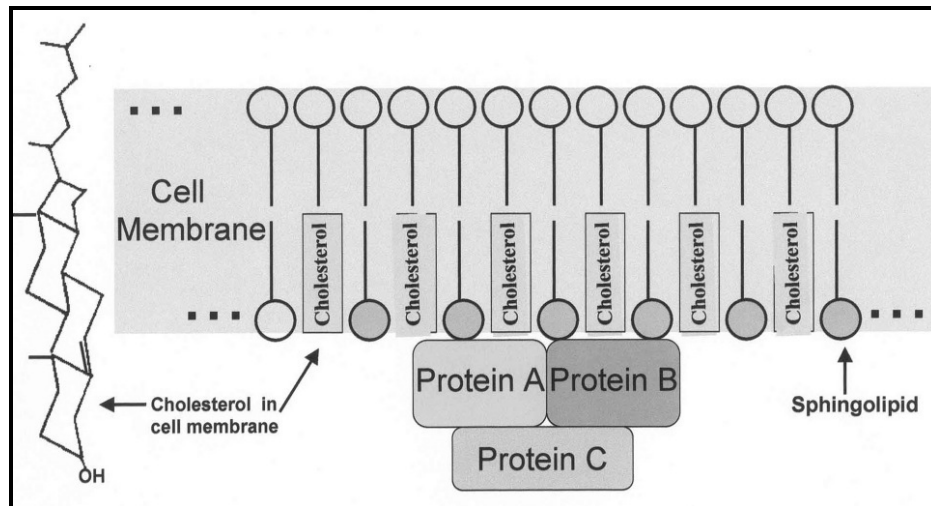


Abbildung 4 Schematische Darstellung der asymmetrischen Verteilung von Lipiden und Cholesterin in Form von Lipidrafts einer Zellmembran. Diese Plattformen haben Einfluss auf die Aktivierung von Signalwegen, indem sie den Kontakt zwischen Proteinen, Rezeptoren und Signalmolekülen herstellen (Schmidt 2005)².

Beispielsweise wird die Lymphozytenreaktion auf exogene Signale wie Antigene mitunter von Molekülen bestimmt, die sich in diesen Cholesterinreichen Arealen befinden (Schmidt 2005). Lipid Rafts stabilisieren die Zellmembran und stellen Plattformen dar, die für den Kontakt bei der Aktivierung von Immunzellen eine wichtige Rolle spielen, aber auch als Barriere dienen, wenn eine Modulation von Immunzellen nicht erfolgen soll (Schmidt 2005). Die Statin-induzierte Herabsetzung der Cholesterinsynthese vermindert sowohl die Stabilität und Fluidität von Membranen als auch die Funktion und Integrität der Lipid Rafts.

² Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. E. Buddecke

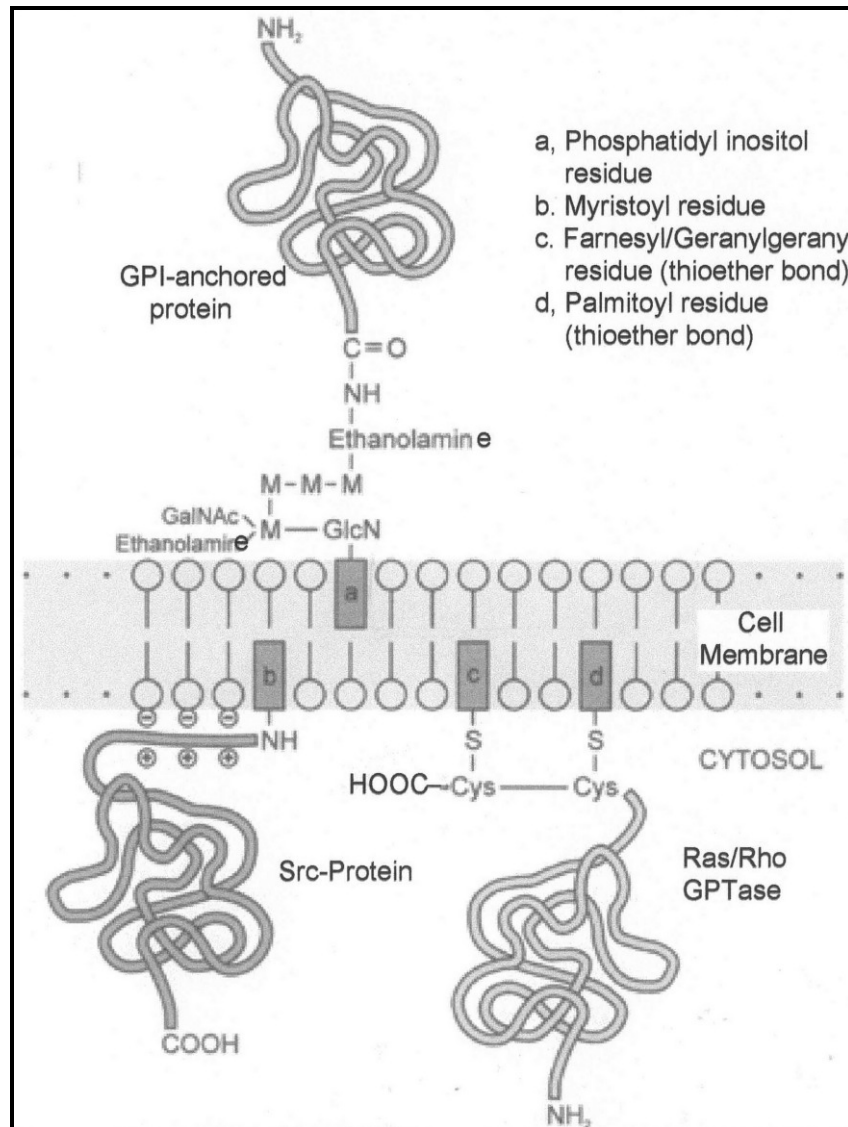


Abbildung 5 Die posttransnationale Verknüpfung von Isoprenoiden und Fettsäuren mit Proteinen ermöglicht deren Verankerung in der Plasmamembran. Der GPI-Anker befindet sich an der Außenseite der Lipiddoppelschicht (Schmidt 2005)³.

1.1.3 Senkung der Lipoproteine des Blutplasmas

Die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase reduziert den intrazellulären Cholesteringehalt und dadurch erfolgt die Aktivierung einer Protease, die zu einer Translokation der SREBPs in den Nucleus führt (Stancu et al. 2001). Da der Promotorbereich des LDL-Rezeptorgens ebenso wie des HMG-CoA-

³ Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. E. Buddecke

Reduktasegens sterol-responsive Elemente enthält, werden so die Transkription und die Expression von LDL-Rezeptoren erhöht. Die Folge ist die vermehrte Endozytose atherogenen LDL-Cholesterins aus dem Blut und dessen Vorstufen (Intermediate density – IDL und Very low density – VLDL lipoproteins) in die Zellen, vor allem Hepatozyten (Stancu et al. 2001). Die aus den LDL-Partikeln freigesetzten Cholesterinester hemmen, nachdem sie durch die lysosomale saure Lipase in freies Cholesterin hydrolysiert wurden, die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase und aktivieren die ACAT (Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase), die das Cholesterin verestert und damit in seine Speicherform in Lipidtropfen der Zelle überführt. Dieser Mechanismus vermindert eine Überschwemmung der Zellen mit Cholesterin und führt nachweislich zu einer dosisabhängigen, nicht linearen Reduktion des Cholesteringehaltes des Blutplasmas, vor allem der LDL-Cholesterinserumkonzentration. Die anfangs stärkere Verminderung der LDL-Plasmakonzentration nimmt unter der Statinbehandlung ein Gleichgewicht ein, da auch der Promoterbereich der HMG-CoA-Reduktase sterol-responsive Elemente enthält und so die Expression der HMG-CoA-Reduktase erhöht wird (Igel et al. 2002). Neben dieser Hauptwirkung der Statine, kommt es bei Patienten mit Hypertriglycerinämie auch zu einer Verminderung der Serumtriglyceride, was u.a. auf einer Sekretion veränderter Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL) durch die Leber beruht (Igel et al. 2002). Statine hemmen in der Leber die Synthese von Apolipoprotein B-100, was auch zu einer reduzierten Synthese und Sekretion von Triglycerinreichen Lipoproteinen und zu einer erhöhten Rezeptorproduktion von Apolipoprotein B/E führt (Stancu et al. 2001). Weiterhin erhöht sich die Konzentration der atheroprotektiven High-Density-Lipoproteine (HDL) im Serum, die durch Kontakt zu Makrophagen oder peripheren Zellen deren unverestertes Cholesterin aufnehmen und diese Cholesterinüberschüsse zur Leber transportieren können (reverser Cholesterintransport). Die Serumkonzentration des atherogenen Lipoproteins (a) bleibt unter Statinbehandlung unverändert (Igel et al. 2002).

1.2 Lipoprotein-unabhängige Effekte der Statine

Der positive Effekt der Statine auf kardiovaskuläre Erkrankungen kann nicht allein durch die Cholesterinsenkung des Plasmaspiegels erklärt werden. Vielmehr scheinen die antiproliferativen, antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften der Statine zum Großteil unabhängig von der Lipidsenkung zu erfolgen. Diese protektiven Effekte der Statine werden auch als Cholesterinunabhängig oder pleiotrop bezeichnet und vielfach in der Literatur diskutiert (Schmidt 2005, Liao et al. 2005, Almuti et al. 2006, Rutishauser 2006). Der Begriff "pleiotrop", der dem griechischen entlehnt ist und "in vielfacher Art und Weise" bedeutet, bezieht sich auf eben diese vielen Lipoprotein-unabhängigen Effekte, die den Statinen zugesprochen werden. Statine wirken sich auf die posttranslationale Modifikation sowie Isoprenylierung aus, die wichtig für die Membranlokalisation und biologische Aktivität von zahlreichen Proteinen sind, einschließlich Adapterproteine und Enzyme der Signaltransduktionswege (Schmidt 2005). Dadurch sind Statine maßgeblich daran beteiligt, die Endothelfunktion und die Stabilität arteriosklerotischer Plaques zu verbessern, den oxidativen Stress auf das Arterien Gewebe sowie die Inflammation zu verringern, aber auch Einfluss auf Erkrankungen wie Krebs, rheumatische Arthritis und Multiple Sklerose auszuüben (Schmidt 2005).

Die *Proliferation, Migration und Apoptose* vaskulärer Zellen spielt in der Pathogenese der Arteriosklerose eine große Rolle. Unter dem Einfluss von Statinen reagieren sowohl humane vaskuläre glatte Muskelzellen (SMCs) als auch humane vaskuläre Endothelzellen dosisabhängig mit einer reduzierten DNA-Synthese und einer verminderten Zellproliferation (Schmidt 2005). Die Statin-bedingte herabgesetzte Zellproliferation ist auf den in der G₁/S-Phase verbleibenden Zellzyklus zurückzuführen, der wiederum auch durch die kleinen GTP-bindenden Proteine Ras und Rho reguliert wird (Liao et al. 2005). Da unter Statinwirkung die für die Membranlokalisation und Aktivität dieser GTPasen notwendige posttranslationale Modifikation ausbleibt, kommt es zu diesem direkten antiproliferativen vaskulären Effekt (Liao et

al. 2005). Weiterhin konnte in vitro Studien gezeigt werden, dass die meisten Statine die SMC-Migration dosisabhängig verringern (Schmidt 2005). Die Auswirkung von Statinen auf die Apoptose von SMCs erfolgt ebenfalls dosisabhängig, in erster Linie durch die Verhinderung von Proteinprenylierungen (Schmidt 2005).

Die *Stabilisierung atherosklerotischer Plaques* als weiterer Lipoprotein unabhängiger Statineffekt spielt bei der Arteriosklerose eine wichtige Rolle, da eine Plaqueruptur eine häufige Ursache akuter koronarer Syndrome ist und lebensbedrohliche Folgen haben kann (Liao et al. 2005). Es ist bekannt, dass der Zeitpunkt einer Plaqueruptur, die akute Koronarsymptome zur Folge hat, weniger von dem Ausmaß der Lumeneinengung durch arteriosklerotische Plaques bestimmt wird, sondern vielmehr durch die Pathomorphologie der Plaques. Sowohl glatte Muskelzellen als auch Makrophagen, die sich in einer arteriosklerotischen Plaque befinden, sezernieren proteolytische Enzyme (Matrixmetalloproteinasen), die Komponenten der Extrazellulären Matrix, vor allem Kollagen, abbauen und so die fibröse Deckschicht, die den Lipidkern einer Plaque bedeckt, schwächen (Schmidt 2005). Dadurch steigen die Plaqueinstabilität und das Risiko für eine Plaqueruptur, durch die es zur Freisetzung thrombogenen Materials aus dem Lipidkern und konsekutiv zu einem thrombotischen Verschluss des betroffenen Gefäßes kommen kann. Folge dieser akuten Thrombose kann das plötzliche Auftreten einer instabilen Angina-pectoris-Symptomatik oder ein Myokardinfarkt sein. Statine führen einerseits durch die Abnahme der Makrophagenansammlung in arteriosklerotischen Plaques sowie durch die Inhibition der MMP-Produktion durch aktivierte Makrophagen und andererseits durch eine Lipidreduktion in der Plaque zu einer Plaquestabilisierung (Liao et al. 2005). Unter dem Einfluss von Statinen kommt es weiterhin zur erhöhten ECM-Synthese durch SMCs, so dass die lipidreiche arteriosklerotische Plaque unter dieser fibrösen Deckschicht bessere mechanische Eigenschaften erreichen kann.

Statine verbessern die Endothelfunktion, was vor allem im Frühstadium der Arteriosklerose in Hinblick auf spätere kardiale Komplikationen wichtige Bedeutung hat. Indem Statine die Produktion vasodilatierender Substanzen

wie beispielsweise die Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide, NO) Synthese durch Stimulation der endothelialen NO Synthase-Aktivität (eNOS) erhöhen (Liao et al. 2005), werden der Gefäßwandtonus und die antithrombotischen Eigenschaften des Endothels positiv beeinflusst. Stickstoffmonoxid vermittelt wichtige antiatherogene Effekte wie vaskuläre Relaxation und die Hemmung der Plättchenaggregation, SMC-Proliferation sowie Endothelzell-Leukozyten-Wechselwirkungen (Liao et al. 2005). Die Inhibition von Rho A durch Statine führt zu einer erhöhten eNOS Expression durch eine Verlängerung der Halbwertszeit der eNOS mRNA (Liao et al. 2005). Weiterhin mildern Statine die Endotheldysfunktion durch eine herabgesetzte Synthese von Endothelin-1, einem potenten Vasokonstriktor und Mitogen, und durch eine erhöhte Expression des Tissue-type Plasminogen Activator (t-PA) (Liao et al. 2005). Durch die Statin-assoziierte herabgesetzte LDL-Oxidation verringert sich bereits der oxidative Stress auf das Endothel (Liao et al. 2005). Allerdings haben Statine auch direkte antioxidative Effekte durch die Hemmung der Freisetzung freier Radikale (reactive oxygen species, ROS) wie Superoxide und Hydroxy Radikale (Liao et al. 2005).

Das *antiinflammatorische Potential der Statine* ist zu einem beachtlichen Teil unabhängig vom Cholesterin-senkenden Effekt zu sehen. Es wurde mehrfach gezeigt, dass es sich bei der Arteriosklerose um eine komplexe entzündliche Reaktion des Gefäßendothels handelt, die zumeist als Antwort auf Verletzungen, Lipidperoxidationen sowie Infektionen erfolgt und durch eine Akkumulation von Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten im Atherom gekennzeichnet ist (Ross 1999, Libby 2002). Zahlreiche in vitro und in vivo Studien liefern Hinweise, dass Statine direkt oder indirekt an der Modulation der inflammatorischen Phasen der Arteriosklerose beteiligt sind (Schmidt 2005). Die Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und dem Gefäßendothel stellen einen entscheidenden Entzündungsschritt beim atherogenen Prozess dar. Die durch Makrophagen und T-Lymphozyten produzierten Zytokine vermögen die Endothelfunktion, die SMC-Proliferation sowie den Kollagenabbau zu modifizieren (Liao et al. 2005). Statine entfalten hier ihre antiinflammatorischen Eigenschaften, indem sie die Zahl sowie Aktivität von Entzündungszellen in arteriosklerotischen Plaques

verringern (Liao et al. 2005) und indem sie die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie zum Beispiel IL-6 verringern (Schmidt 2005). Weiterhin ist die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 in der frühen Phase der Atherogenese eine wichtige Voraussetzung für die transendotheliale Migration von Entzündungszellen wie Leukozyten und Monozyten (Schmidt 2005). Das kleine GTP-bindende Protein Rho ist essentiell für die Integrin (L-Selektin)-abhängige Leukozytenadhäsion an der endothelialen Oberfläche (Schmidt 2005). Da Geranylgeranylpyrophosphat für die Aktivierung von Rho benötigt wird, ist davon auszugehen, dass die Wirkung der Statine auf Zelladhäsionsmoleküle zum Teil auch durch die gehemmte Geranylgeranylierung von Rho zustande kommt (Schmidt 2005). Eine erhöhte Serumkonzentration des C-reaktiven Proteins (CRP), einem klassischen akute Phase Protein und sensitiven klinischen Entzündungsparameter, wird von der Leber als Antwort auf proinflammatorische Zytokine wie IL-6 gebildet (Liao et al. 2005) und korreliert mit einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (Schmidt 2005). Die Behandlung mit einem Statin führt signifikant und unabhängig von der LDL-Cholesterinserumkonzentration zu einer reduzierten CRP-Serumkonzentration, was der Progression der Arteriosklerose entgegenwirkt (Schmidt 2005). Ob eine Verminderung des CRP per se zu einem verringerten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse führt, ist nach wie vor nicht vollständig geklärt (Liao et al. 2005, Schmidt 2005).

Immunmodulierende Eigenschaften der Statine, die klinische Relevanz besitzen, betreffen einerseits die Inhibition der MHC-II Antigen Expression (class II major histocompatibility antigen) und andererseits die Blockade der β -2 Integrin vermittelten Leukozytenfunktion (Schmidt 2005). Statine hemmen bereits bei geringen Konzentrationen (nM- μ M) die Expression von MHC-II auf durch Interferon-gamma (IFN-gamma) stimulierten menschlichen Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Schmidt 2005). Die Folge ist eine verminderte T-Zellaktivierung sowie Proliferation und wahrscheinlich für den Verlauf der Arteriosklerose von Vorteil (Schmidt 2005). Weiterhin blockieren Statine selektiv das beta-2

Integrin vermittelte Leukozytenfunktionsantigen-1 (LFA-1), das auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert wird, in seiner aktivierten Form an ICAM-1 bindet und zusätzlich ein Costimulator von T-Zellen ist (Schmidt 2005). Statine entfalten auch ihre immunmodulatorische Wirkung bei Empfängern von Herztransplantaten, indem sie die hämodynamische Abstoßungsperiode reduzieren (Schmidt 2005). Immunmodulatorische Statineffekte werden auch mit einer Prävention oder Umkehrung der chronischen und wiederkehrenden experimentellen Enzephalomyelitis, einem Erkrankungsmodell der Multiplen Sklerose, in Verbindung gebracht (Schmidt 2005).

Die *Statin-vermittelten Effekte auf metabolische Stoffwechselwege* können durch einen Mangel an prenylierten Proteinen auch die Inhibitoren dieser Stoffwechselwege betreffen (Schmidt 2005). Die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase führt zu einer reduzierten intrazellulären Produktion von Mevalonsäure, die nicht nur essentielle Vorstufe von Cholesterin, sondern auch von diversen Isoprenoiden ist, die für die Translokation prenylierter Proteine und damit für die vollständige Aktivität von Membranen benötigt werden. Das erklärt die Beobachtung, dass Statine eine Induktion und Überexpression von endothelalem E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 verursachen, vermutlich durch den Einfluss eines prenylierten inhibitorischen G-Proteins (Schmidt et al. 2002). Statine führen zu einer Überexpression der Stickstoffoxidsynthese und aktivieren in Endothel- und Endothelvorläuferzellen in vitro sofort die Proteinkinase Akt/PKB, die das Überleben der Endothelzellen, die Stickstoffoxidproduktion und Differenzierung fördert (Schmidt 2005). Diese zellulären Antworten tragen zu neuem Blutgefäßwachstum und der Stabilisierung des vaskulären Netzwerkes und arteriosklerotischer Läsionen bei (Schmidt 2005).

Statine verhindern LDL-Proteoglykan Wechselwirkungen, indem sie vaskuläre SMCs stimulieren, Proteoglykane mit einer verminderten Bindungsaffinität zu LDL zu sezernieren (Meyers et al. 2003, Schmidt 2005). Statine verursachen eine Konzentrationsabhängige Hemmung des Zellwachstums humaner vaskulärer SMCs und die Produktion von Proteoglykanproteinen, deren Sulfatierungsgrad im Bereich der

Glukosaminoglykanseitenketten verringert ist (Meyers et al. 2003). Zusätzlich haben Proteoglykane, die von Statinbehandelten Zellen sezerniert werden, ein größeres Molekulargewicht, was durch eine Verlängerung der Glukosaminoglykanseitenketten bewirkt wird (Meyers et al. 2003). Diese veränderten Proteoglykane (reduzierte Sulfatierung und verringerte negative Ladung) haben *in vitro* eine schlechtere Bindungsaffinität zu LDL als von Kontrollzellen sezernierte Proteoglykane (Meyers et al. 2003). Die durch Statine hervorgerufene verringerte Bindungsaffinität von LDL und die damit verbundene reduzierte Retention von LDL an der Intima der Arterienwand könnte den Verlauf der Arteriosklerose auf eine positive Weise und unabhängig der Cholesterinsenkung beeinflussen (Meyers et al. 2003).

Die *antitumorigenen Effekte der Statine* führen bei einer Vielzahl von Tumorzellen zur Hemmung der Proliferation und zu einer Apoptose (Schmidt 2005). Im Tierversuch zeigt sich eine Verlangsamung des Tumorwachstums und eine Inhibition der Tumorstreuung bei einer Vielzahl von Tumoren wie zum Beispiel dem Melanom, Mammakarzinom, Adenokarzinom des Pankreas, Fibrosarkom, Gliom, Neuroblastom und Lymphom (Schmidt 2005). Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus dieser antitumorigenen Wirkung der Statine konnte noch nicht restlos aufgeklärt werden, allerdings könnte ein Zusammenhang zwischen dieser Aktivität und der Störung der Funktion von Ras und Rho GTPasen, der Hemmung der Aktivität Cyclinabhängiger Kinasen und der Aktivierung Cyclinabhängiger Kinaseinhibitoren bestehen (Schmidt 2005). Weiterhin kann dieser Statineffekt auch durch die Beeinflussung der Genexpression und Signaltransduktionswege erklärt werden (Schmidt 2005).

Die *antithrombotische Aktivität der Statine* überschneidet sich mit den bereits beschriebenen Wirkungen auf Entzündungsparameter und die Plaquestabilisierung. Thrombotische und die Arteriosklerose fördernde Prozesse werden beispielsweise dosisabhängig durch eine herabgesetzte Expression des Tissue Faktors (TF) bei kultivierten humanen Monozyten/Makrophagen gehemmt (Schmidt 2005). Dieser Effekt kann durch eine Koinkubation mit Mevalonat oder Geranylgeranylpyrophosphat

aufgehoben werden (Schmidt 2005). Weiterhin wurde herausgefunden, dass Pravastatin die Gerinnungszeit *in vitro* verlängert. Verglichen mit der alleinigen Gabe von Pravastatin oder Heparin, führt die Kombination von Heparin mit Pravastatin zu einer signifikant verlängerten Gerinnungszeit (Schmidt 2005). Diese synergistische Wirkung von Pravastatin und Heparin lässt vermuten, dass Pravastatin die Gerinnungskaskade und Fibrinolyse hemmt und dadurch die Gerinnungszeit verlängert (Schmidt 2005). Viele Studien haben auf verschiedene Mechanismen hingewiesen, durch die Statine ihre antithrombotischen Effekte entfalten wie beispielsweise durch die Reduktion der Blutviskosität oder durch die Downregulation der Tissue Faktor Expression, gefolgt von einer verringerten Thrombinbildung und dadurch bedingten Abnahme einiger Thrombinabhängiger Reaktionen (Fibrinogen/Fibrin, Faktor V/Va, Faktor XIII/XIIIa) (Schmidt 2005). Weiterhin könnte die Statin-vermittelte Steigerung der Thrombomodulin Expression bei Endothelzellen die Aktivität von Protein C erhöhen (Schmidt 2005). Die meisten antithrombotischen Effekte der Statine werden der Hemmung der Isoprenylierung von Signalmolekülen zugeschrieben (Schmidt 2005).

Die Liste der Erkrankungen, die Statine günstig beeinflussen können, wächst und reicht von Multipler Sklerose über Neurodegenerative Erkrankungen bis hin zu Rheumatischer Arthritis (RA) und systemischem Lupus Erythematoses (SLE) (Schmidt 2005). Von der *antirheumatischen Statinwirkung* könnten Patienten mit RA und SLE profitieren, da diese Patienten ein signifikant erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen haben und aufgrund autoimmunologischer Aspekte (Schmidt 2005). Unter den ersten Berichten über die immunologischen Effekte der Statine stand vor allem deren hemmender Einfluss auf die durch Interferon-gamma induzierte Erhöhung des Zelloberflächenproteins MHC II im Vordergrund (Schmidt 2005). Die Klasse der MHC II, deren Expression im Rahmen einer Entzündung häufig gesteigert ist, spielen eine zentrale Rolle bei der Präsentation von Antigenen und der Aktivierung von T-Zellen. Eine erhöhte Produktion von Interferon-gamma durch aktivierte T-Zellen ist charakteristisch bei einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen des

Menschen. Ein anderer Aspekt der Statinvermittelten Reduktion der entzündlichen Komponente kardiovaskulärer Erkrankungen ist die Verbindung zwischen Cholesterinspiegel und Immunregulation. Cholesterin ist als Hauptkomponente von Zellmembranen essentiell für die Funktion sowie Struktur von Lipid Rafts. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) und Costimulatorische Moleküle wie das Leukozytenfunktionsantigen-1 (LFA-1), CD28, CD4 und der CD40 Ligand (CD40 L) verbinden sich nach Aktivierung mit den Lipid Rafts (Schmidt 2005). Statine greifen in die Aktivierung von T-Zellen ein, indem sie den Cholesteringehalt von Membranen vermindern und die Integrität der Lipid Rafts stören. Eine Statinbehandlung verursacht den Ausschluss von Lipid Raft assoziierten Molekülen (LCK, Protein Tyrosinkinase) aus Lipidmikrodomänen, die Inhibition der Aktinpolymerisation, die Bildung stabiler immunologischer Verbindungen und damit die Störung der T-Zellaktivierung (Schmidt 2005). Die RA Synovitis umfasst eine überwiegend Th1-vermittelte Antwort sowie die Aktivierung von Makrophagen, Fibroblasten, Mastzellen und B-Zellen, die zu einer massiven Autoantikörperproduktion und Zytokinfreisetzung (TNF-alpha, Interleukin-1 β , -6, -15 und -18) führt (Schmidt 2005). Weiterhin kommt es zur Endothelzellaktivierung, Hochregulation der Expression von Adhäsionsmolekülen und zur verstärkten Angiogenese (Schmidt 2005). Statine vermögen die Zytokinfreisetzung aus synovialen T-Zellen und Synoviozyten sowie Akute Phase Parameter (CRP 50%) zu unterdrücken und die geschwollenen Gelenke von RA Patienten signifikant zu lindern (Schmidt 2005).

Hinsichtlich der *Therapie von Herzrhythmusstörungen* konnte nachgewiesen werden, dass Statine die Inzidenz von Arrhythmien bei Patienten mit einer arteriosklerotischen Herzerkrankung senken (Schmidt 2005). Der antiinflammatorische Effekt der Statine kann das Wiederauftreten von Vorhofflimmern (Atrial Fibrillation; AF) bei Patienten, die sich erfolgreich einer Rhythmisierung (Cardioversion) unterziehen, vermindern (Schmidt 2005). Dieser Effekt spricht für die Hypothese, dass Entzündungsprozesse, die durch hohe Spiegel des C-reaktiven Proteins nachgewiesen werden, AF induzieren und das Fortdauern der Erkrankung fördern können (Schmidt

2005). Neben diesem indirekten Einfluss der Statine auf Herzrhythmusstörungen wirken sie direkt auf die Modulation der Lipidzusammensetzung von Zellmembranen und damit auf deren physiochemische Eigenschaften mit der Folge der Veränderung von transmembranösen Ionenkanälen (Schmidt 2005).

Bei der *Behandlung der Multiplen Sklerose (MS)* spielen die immunmodulatorischen Eigenschaften der Statine eine wesentliche Rolle. Statine haben hemmende Effekte auf die Leukozytenmigration in das zentrale Nervensystem sowie auf MHC II und costimulatorische Signale, die für die Aktivierung proinflammatorischer T-Zellen benötigt werden, und auf die Expression von Entzündungsmediatoren im zentralen Nervensystem einschließlich NO und TNF-alpha (Schmidt 2005). Eine klinische Studie über die Behandlung von MS-Patienten mit Statinen führte nach sechs Monaten zu einer signifikanten Abnahme sowohl der Anzahl als auch der Größe neuer entzündlicher mit Gadolinium angereicherten MS-Herde (Schmidt 2005). MS-Patienten könnten also von einer Statintherapie profitieren, da diese die chronisch entzündliche Komponente der Multiplen Sklerose, die zu bleibender geistiger Behinderung führt, reduziert (Schmidt 2005).

Aufgrund dieser Erkenntnisse sollten Statine heute nicht nur als Lipidsenker zur Therapie atherogener Krankheitsgeschehen betrachtet werden, sondern vielmehr als eine Substanzklasse mit vielen positiven Nebeneffekten, die in Zukunft die therapeutischen Möglichkeiten auch bei anderen Erkrankungen verbessern kann.

1.3 Statine und Arterien-Stoffwechsel

1.3.1 Extrazelluläre Matrix des Arterienwes

Die extrazelluläre Matrix verleiht der Gefäßwand nicht nur Struktur und Stabilität, sondern ist auch maßgeblich an der Regulation vaskulärer Funktionen beteiligt. Das Arterienwes besteht zu großen Teilen aus Kollagen und elastischen Fasern, die in einem viscoelastischen Gel aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Wasser eingebettet sind. In den Tabellen 1, 2 und 3 sind die wesentlichen Komponenten der vaskulären extrazellulären Matrix aufgeführt, die im Arterienwes durch Querverbindungen ein biomechanisch aktives Netzwerk bilden, das in der Arterienwand wiederum essentielle Eigenschaften wie Viscoelastizität und Dehnbarkeit vermittelt (Wight TN 1996). Durch molekulare Wechselwirkungen zwischen der ECM und vaskulären Zellen wird die Zelladhäsion, -migration, -proliferation und -differenzierung sowohl im physiologischen (Angiogenese, Gefäßfunktion) als auch im pathologischen Sinn (Arteriosklerose) reguliert. Auch Plasmaproteine, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Enzyme binden an spezifische ECM-Komponenten und beeinflussen so den Arterienmetabolismus (Wight TN 1996). Die Zusammensetzung der vaskulären Extrazellulären Matrix variiert während der Gefäßentwicklung sowie zwischen verschiedenen Gefäßtypen (Elastische- oder Muskuläre Arterien), unterschiedlichen vaskulären Erkrankungen und auch den verschiedenen Schichten einer Arterie. Der normale Wandaufbau einer Arterie beginnt mit einer das Gefäßlumen begrenzenden einfachen Endothelzellschicht, auf die das viskoelastische Proteoglykan- und Hyaluronsäurereiche Bindegewebe der Intima folgt. Die elastischen Fasern der Lamina elastica interna (internal elastic lamina, IEL) trennen die Intima und die Tunica media. Der die Media bildenden glatten Muskelzellen schließen sich die Lamina elastica externa (external elastic lamina, EEL) und die Adventitia an, die durch ihren hohen Gehalt an fibrillärem Kollagen dem Gefäß Stabilität verleiht. Die Komponenten der Extrazellulären Matrix unterliegen einem streng regulierten Stoffumsatz.

Glatte Muskelzellen der Media synthetisieren nach entsprechender Stimulation durch Mediatoren aus Endothelzellen und Entzündungszellen Kollagen, Elastin, Proteoglykane und Glykoproteine. Die Matrix kann durch Enzyme wie Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs), Kathepsine oder Elastasen, die von Makrophagen, Monozythen und glatten Muskelzellen exprimiert werden, abgebaut werden (Abb.6).

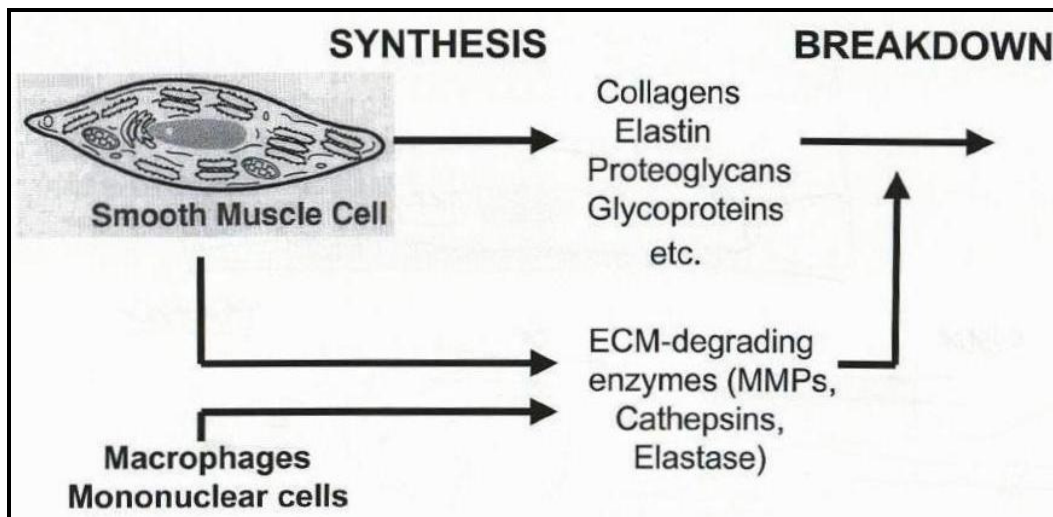


Abbildung 6 Turnover der vaskulären extrazellulären Matrix⁴.

Zwischen ECM-Synthese, -Abbau und -Umbau besteht unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht, das bei der Arteriosklerose aber auch aufgrund der ubiquitären Verteilung der Extrazellulären Matrix im menschlichen Körper bei anderen Erkrankungen gestört ist.

Kollagene sind eine beim Menschen aus über 20 genetisch verschiedenen Kollagentypen bestehende große Molekülfamilie, die sich durch wiederholte Glycin-X-Y-Sequenzmotive und eine tripelhelikale Konformation auszeichnen. Elf Kollagentypen wurden in Blutgefäßen identifiziert: I, III, IV, V, VI, VIII, XIV, XV, XVI, XVIII und XIX (Tab. 1).

⁴ Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. E. Buddecke

Tabelle 1 Kollagentypen der ECM des Arterien Gewebes⁵

Collagen Types	Function
Fibrillar collagen	
• I, III	Tensile strength, elastic resilience
• V	Minor proportion of fibrillar collagen (heterotrimers)
Fibril associated	
• XIV, XVI	Regulation of the diameter of collagen Fibrils by specific binding
• VI	Interaction with elastic fibers and SMCs (RGD-sequences)
Basement membrane	
• IV, XV	Support of EC monolayer
• XVIII, XIX	Surrounding of SMCs
Short chain (endothelial)	
• VIII	Stabilisation of vascular wall by Constituting a 3 D meshwork, involved in angiogenesis

Die quantitativ bedeutendsten vaskulären Kollagene sind Typ I und III (alpha 1 und 2 Ketten), die > 90% des Gesamtkollagengehalts im Arterien Gewebe ausmachen und zu 30% aus den Aminosäuren Prolin bzw. Hydroxyprolin bestehen (Wight TN 1996). Diese fibrillären Kollagene kommen in allen Wandschichten der Arterien vor und sind je nach Arterientyp verschiedenartig organisiert: entweder sind die Kollagenbündel zwischen elastischen Fasern elastischer Arterien verkeilt oder sie umgeben die glatten Muskelzellen der Media in Arterien vom muskulären Typ (Wight TN 1996). Dabei entspricht die dreidimensionale Anordnung der Kollagene der Funktion: sie ermöglicht die Dehnung in verschiedene Richtungen und verleiht der Arterienwand Spannkraft sowie Stabilität. Allerdings binden normales und oxidiertes LDL an Typ I und III Kollagen, was die

⁵ Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. E. Buddecke

Akkumulation von Lipiden in die Arterienwand im Verlauf der Arteriosklerose fördert (Wight TN 1996). Die Kollagentypen IV und VIII befinden sich in der vaskulären Basalmembran unter der Endothelzellschicht und umgeben glatte Muskelzellen. Sie bilden mit anderen Molekülen selbstassoziierte Gitterähnliche Netzwerke, die als Anker für vaskuläre Zellen und als Permeabilitätsbarriere für Plasmaproteine dienen (Wight TN 1996). In geringen Mengen ist im vaskulären Gewebe auch Kollagen V, das mit Kollagen I assoziiert und an der Bildung von Kollagenheteropolymeren beteiligt ist, vorhanden (Wight TN 1996). Dieser Kollagentyp ist vor allem in Intimaverdickungen sowie fibrösen arteriosklerotischen Plaques zu finden und spielt bei der Stabilisierung des Kollagennetzwerkes eine wichtige Rolle (Wight TN 1996). Das Kollagen VI kommt im Arterien Gewebe zwar auch nur zu einem geringen Prozentsatz vor, allerdings in allen Gefäßwandschichten zwischen Typ I und III Kollagen. Es bildet durch Selbstassoziation sowie Disulfidbrücken hochmolekulare Aggregate aus kleinen Kollagenmonomeren und wird auch durch andere ECM Bestandteile wie Proteoglykane verbunden (Wight TN 1996). Durch die vielen Arg-Gly-Asp-Sequenzen (RGD) dient Kollagen VI als Bindungsstelle für vaskuläre Zellen und interagiert mit glatten Muskelzellen sowie anderen ECM-Komponenten wie elastischen Fasern. Die Verteilung der Kollagene in arteriosklerotischen Läsionen hat großen Einfluss auf die Stabilität einer Plaque, deren mechanische Belastbarkeit und damit deren Empfänglichkeit für Rupturen.

Proteoglykane sind hydrophile Moleküle der Extrazellulären Matrix und Zelloberflächen, die sich durch kovalent mit einem Proteingerüst verknüpfte Glucosaminoglykan- (GAG) Seitenketten auszeichnen und dem Arterien Gewebe Viskoelastizität verleihen. Die GAGs sind nichtverzweigte Polymere aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten. Die Proteoglykane werden nach der vorherrschenden Struktur der GAGs, die an den Glykoproteinkern angeheftet sind, klassifiziert in Chondroitinsulfat- (CSPG), Dermatansulfat- (DSPG), Heparansulfat- (HSPG) und Keratansulfatproteoglykan (KSPG) (Tab.2). Die Proteoglykane des Arterien Gewebes werden zu einem großen Teil von glatten Muskelzellen gebildet und diese Synthese unterliegt der Regulation durch

Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 und Zytokinen wie IL-1. Proteoglykane verfügen über eine sehr große Strukturvielfalt, die einerseits durch die posttranslationale Modifikation der Glykane, andererseits durch die Vielzahl genetischer Varianten der Kernproteine bedingt ist und für viele biologische Funktionen im Arterienewebe verantwortlich ist (Tab. 2).

Tabelle 2 Proteoglykane der vaskulären ECM⁶

Family	GAG Type (chain number)	kDa Protein	Function
Small leucine rich			
• Decorin	DS (1)	39.7	Interaction with specific collagen I (III) Sequences, stabilisation of dense ECM
• Biglycan	DS (2)	41.5	
• Lumican	KS (3-4)	38.5	
Large interstitial			
• Versican	CS (15-17) HA	264	High hydrodynamic volume of HA-versican-complexes
• Hyaluronan (HA)		-	
Basement membrane (BM)			
• Perlecan	HS (3)	467	Constituent of BM, interacts with BM collagens
Cell surface			
• Syndecan 1 (CD 138)	HS (CS)	32.4	Interaction with HP-binding regions of ECM components, binding of LP and AT III, coreceptor of growth factors, outside-in-signal transduction
• Syndecan 2 (Fibroglycan)	HS	22.1	
• Syndecan 4 (Ryudocan)	HS	21.6	
• Glypican 1	HS	61.6	

Die Proteoglykane treten in Wechselwirkungen mit anderen ECM-Komponenten wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen sowie eingewanderten Blutzellen und beeinflussen so die Adhäsion, Migration und Proliferation vaskulärer Zellen (Wight TN 1989). Außerdem sind sie als Zelloberflächenproteine an der Regulation der Gefäßwandpermeabilität, als Ankerproteine für Enzyme des Lipidstoffwechsels und der Hämostase

⁶ Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. E. Buddecke

beteiligt (Wight TN 1989). Die Proteoglykane kommen in der Gefäßwand in der interstitiellen ECM, intrazellulär in Form von Sekretgranula oder synaptischen Vesikeln, als Teil von Zellmembranen und als Teil spezialisierter ECM-Strukturen wie der Basalmembran vor (Wight TN 1989). Den Hauptanteil der vaskulären Proteoglykane haben große CSPGs wie *Versican*, kleine Leucin-reiche DSPGs wie *Decorin* und *Biglykan*, KSPGs wie *Lumican* und HSPGs wie *Perlecan* sowie andere Basalmembranproteoglykane (Wight TN 1996). Diese Proteoglykane sind mit verschiedenen Komponenten der vaskulären extrazellulären Matrix assoziiert und beeinflussen so deren Eigenschaften und Funktionen (Tab. 2). Die Verteilung der Proteoglykane innerhalb der Blutgefäße variiert, so ist zum Beispiel die Intima Proteoglykanreich, während Media und Adventitia einen geringeren Gehalt an Proteoglykanen haben, aber *Versican*/Hyaluronsäurekomplexe sowie *Biglykan* enthalten (Wight TN 1996). *Versican* befindet sich im interstitiellen Raum der vaskulären extrazellulären Matrix und bildet durch Wechselwirkungen mit Hyaluronsäure ein hydratisiertes Gel, das den ECM-Raum teilweise ausfüllt. *Decorin* kommt vor allem in der Kollagenreichen Adventitia vor, wo es bei der Regulation der Kollagenfibrillenbildung, bei der Bindung an Kollagen und TGF- β eine Rolle spielt (Wight TN 1996). *Perlecan* ist ein integraler Bestandteil der Basalmembranen der intimalen und medialen Schichten und wirkt dort als Permeabilitätsbarriere, dient als Anker für Blutzellen sowie Wachstumsfaktoren und beeinflusst so auch das Remodelling des Arteriengewebes (Wight TN 1996). Die Proteoglykane der *Syndecanfamilie*, die direkt durch hydrophobe Sequenzen des Kernproteins in vaskuläre Zellmembranen inseriert werden, sind als Zelloberflächenmoleküle Corezeptoren für Wachstumsfaktoren (TGF- β , FGF) und für die Zelladhäsion (Wight TN 1996). Der Gehalt und die Zusammensetzung der vaskulären Proteoglykane ändert sich während der Arteriosklerose ebenso wie der anderer ECM-Komponenten und hat großen Einfluss auf die Permeabilität der Gefäßwand. Die Wechselwirkungen zwischen Proteoglykanen der Arterienwand und Lipoproteinen des Plasmas werden hauptsächlich für die Anreicherung von Lipiden in arteriosklerotischen Läsionen verantwortlich

gemacht (Wight TN 1996). Außerdem werden Komplexe aus Proteoglykanen und Lipoproteinen in der Gefäßwand häufiger oxidiert (Wight TN 1996). Allerdings entfalten einige Proteoglykane (Heparin, Heparansulfat und Dermatan-sulfat) auch atheroprotektive Wirkungen durch ihre antikoagulatorischen Eigenschaften, indem sie die Bildung von Fibrin durch Wechselwirkungen mit Antithrombin III und Heparin Cofaktor II verhindern, und durch direkte Effekte in der Gefäßwand (Hemmung der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen) (Wight TN 1996, Schmidt et al. 1992).

Elastische Fasern sind ein weiteres Strukturmerkmal von Gefäßwänden, die sich unter anderem durch das Protein Elastin reversibel dehnen und kontrahieren können. Elastische Fasern sind komplexe Strukturen aus einem hydrophoben 70-kDa Elastinkern, der mit Mikrofibrillen aus Fibrillin und Enzymen wie der Lysyl-Oxidase assoziiert ist. Dieses Enzym ist an den Quervernetzungsreaktionen durch die Oxidation von Lysin-Resten beteiligt. Elastische Fasern sind in Blutgefäßen konzentrisch angeordnet und trennen teilweise in stärkeren Lamellen (IEL und EEL) die verschiedenen vaskulären Schichten voneinander (Wight TN 1996). Der prozentuale Anteil von elastischen Fasern variiert im Gefäßsystem und ist in Arterien wie beispielsweise der Aorta am größten. Der Verlust beziehungsweise die Fragmentierung elastischer Fasern ist für den Verlauf der Arteriosklerose ebenso von Bedeutung wie der Abbau anderer ECM-Komponenten beispielsweise durch MMPs. Die durch den Abbau elastischer Fasern entstehenden Elastin Peptide sind biologisch aktiv und haben chemotaktische Wirkung auf Neutrophile Granulozyten, die an der Reparatur und dem Remodelling des Arteriengewebes beteiligt sind (Wight TN 1996).

Tabelle 3 Komponenten der vaskulären ECM⁷

Glycoproteins	Elastic fibrils	Basement membrane
<ul style="list-style-type: none"> • Fibronectin • Thrombospondin • Tenascin • Osteopontin 	<ul style="list-style-type: none"> • Elastin • Fibrillin • Emilin • Lysyl oxidase 	<ul style="list-style-type: none"> • Laminine • Entactin

⁷ Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. E. Buddecke

Die in Tabelle 3 aufgeführten **Glykoproteine** Fibronectin, Laminin, Thrombospondin, Tenascin und Osteopontin sind Komponenten des vaskulären Gewebes, die über eine ähnliche Molekülstruktur verfügen. Aufgrund ihrer Struktur sind diese Glykoproteine an der Regulation von Zell- und Gewebefunktionen beteiligt, indem sie beispielsweise mit den anderen Komponenten der vaskulären ECM in Kontakt treten und über spezifische Zelloberflächenrezeptoren an Zellen binden.

Fibronektine spielen in ihrer löslichen Form im Blutplasma als Zelladhäsionsmolekül bei der Blutgerinnung eine wichtige Rolle und sind als unlösliche Fibrillen in der Extrazellulären Matrix der meisten Gewebe eingelagert. Das Molekül ist ein Heterodimer aus zwei 220 kDa Fibronectinmolekülen, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Die über 20 verschiedenen Fibronectinvarianten werden durch alternatives Spleißen der RNA eines Gens produziert. Fibronectin ist in allen Schichten der vaskulären ECM vorhanden (Wight TN 1996) und hat als Brückenmolekül zwischen Kollagenfibrillen sowie anderen ECM-Komponenten Bedeutung. Fibronectin ist für verschiedene Zellen ein Adhäsionsmolekül, das so die Migration und Differenzierung von Zellen reguliert. Eine Akkumulation dieses Glykoproteins tritt auch in arteriosklerotisch veränderten Gefäßwänden wie intimalen Verdickungen auf (Wight TN 1996). Fibronektine beeinflussen durch Wechselwirkungen zwischen ihrer Heparin-Bindungsdomäne und Plasmalipoproteinen die Ansammlung dieser Partikel in die vaskuläre ECM (Wight TN 1996) und damit die Progression der Arteriosklerose.

Laminine sind kreuzförmige aus drei Untereinheiten (alpha, beta und gamma) bestehende 800 kDa Heterotrimere, die als Hauptkomponenten in der Basalmembran von Endothel- und glatten Muskelzellen vorkommen. Laminine enthalten viele Bindungsstellen einerseits für Zelloberflächenrezeptoren wie zum Beispiel Integrinrezeptoren vaskulärer Zellen und andererseits für Basalmembrankomponenten wie Kollagen IV, Nidogen sowie das HSPG Perlecan (Wight TN 1996). Laminine beeinflussen auch vaskuläre glatte Muskelzellen und führen zur Aufrechterhaltung des in der normalen Gefäßwand vorkommenden nicht proliferativen kontraktilen SMC-Phänotyps (Abb.7) (Wight TN 1996). Damit beeinflussen Laminine im

Arteriengewebe die Zelladhäsion, Zellmigration, Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Der „Synthetic“ SMC Phänotyp (Abb. 7B) zeichnet sich durch eine fehlende Basalmembran, erhöhte Protein- und ECM-Synthese und einen Mangel an kontraktile Elementen aus, wohingegen der „Contractile“ Typ (Abb. 7A) von einer Basalmembran umgeben ist, reichlich kontraktile Myofilamente und eine reduzierte Kapazität für ECM-Proteine besitzt sowie eine erhöhte alpha-Actin Expression aufweist (Bou-Gharios et al. 2004). Vaskuläre glatte Muskelzellen beeinflussen demnach durch Migration, Proliferation, ECM-Synthese, Zytokin- und Wachstumsfaktorenproduktion neben dem Gefäßwandtonus auch arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen (Bou-Gharios et al. 2004).

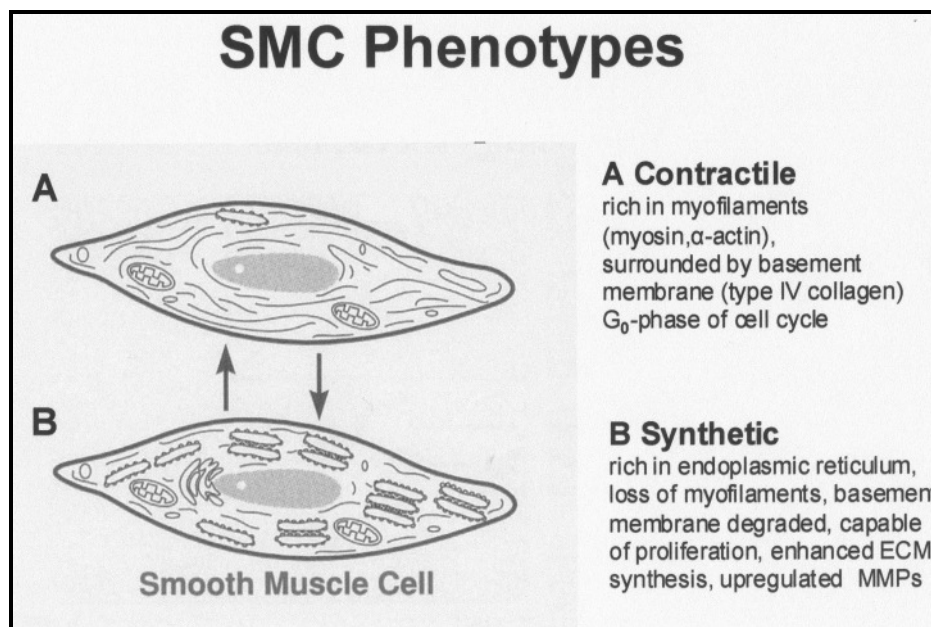


Abbildung 7 Typische Phänotypen glatter Gefäßmuskelzellen: während der „quiescent oder contractile state“ in der normalen Gefäßwand vorkommt, ist der „proliferative oder synthetic state“ charakteristisch für arteriosklerotisch veränderte Gefäße (Wight TN 1996)⁸.

Thrombospondin (TSP) ist ein 450 kDa trimeres Glykoprotein, das aus drei identischen durch Disulfidbrücken verbundenen Ketten besteht. TSP kommt

⁸ Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. E. Buddecke

in den verschiedenen Schichten der Gefäßwand vor und wird unter anderem von vaskulären Endothel- und glatten Muskelzellen gebildet. Dieses Glykoprotein interagiert mit einer Reihe von Plasmaproteinen wie Fibrinogen, Plasminogen, Histidinreichen Glykoproteinen und copolymerisiert mit Fibrin in der Gerinnungskaskade (Wight TN 1996). Außerdem hat Thrombospondin multiple Bindungsstellen für ECM-Komponenten wie Fibronectin, einige Kollagene, Laminin und HSPGs (Wight TN 1996). TSP bindet auch Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 und ist vielleicht an der Aktivierung dieses Zytokins in der vaskulären ECM beteiligt (Wight TN 1996). TSP vermittelt anders als die bereits beschriebenen ECM-Glykoproteine antiadhäsive Eigenschaften und führt zum Abrunden von Zellen und deren Abtrennung vom Endothel (Wight TN 1996).

Tenascin ist ein in der vaskulären ECM nur vorübergehend vorhandenes, großes hexamerer Glykoprotein, dessen 190-240 kDa Untereinheiten durch Disulfidbrücken verbunden sind (Wight TN 1996). Das von Endothel und glatten Muskelzellen gebildete Tenascin kommt im Arterien Gewebe vor allem im frühen Stadium der embryonalen Vaskulogenese vor sowie in arteriosklerotisch veränderten Gefäßschichten und ist so an der Embryonalentwicklung und dem Remodelling des Arterien Gewebes beteiligt (Wight TN 1996).

Osteopontin ist ein saures, hochphosphoryliertes Glykoprotein mit einer relativ geringen Molekülmasse (44-85 kDa). In der ECM normaler Blutgefäße kommt Osteopontin nicht vor, aber in arteriosklerotisch veränderten Gefäßwänden und Plaques. Osteopontin hat Bindungsdomänen für Ca^{2+} , RGD sowie HSPG (Wight TN 1996) und dadurch Einfluss auf die Zelladhäsion und Migration von Endothel- und glatten Muskelzellen. Da Osteopontin vor allem in den kalzifizierten Zonen arteriosklerotischer Plaques auftritt und spezifische Ca^{2+} Bindungsstellen besitzt, scheint es die Einlagerung von Kalzium und Formation von Cholesterinkristallen in arteriosklerotischen Plaques zu fördern (Wight TN 1996).

1.3.2 Physiologische Funktion

Das Gefäßendothel erfüllt als para- und autokrines Organ wichtige Funktionen, wie die Regulation des Kontraktionszustands der Gefäßwand sowie deren zelluläre Zusammensetzung (Liao et al. 2005). Das gesunde Gefäßendothel wirkt antiinflammatorisch, indem es die Leukozytenadhäsion und -migration verhindert, und antithrombotisch durch die Inhibition der Plättchenaktivierung, -adhäsion sowie -aggregation (Landmesser et al. 2004). Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen profibrinolytischer und prothrombotischer Aktivität des Endothels (Landmesser et al. 2004). Außerdem wirkt das gesunde vaskuläre Gewebe durch die Hemmung der vSMC Proliferation sowie Migration antihypertroph (Landmesser et al. 2004). Das vaskuläre Endothel ist also nicht nur eine passive Barriere zwischen Blut und Gefäßwand, sondern spielt auch durch die Synthese und Freisetzung vasoaktiver Substanzen als Reaktion auf humorale, neuronale und mechanische Reize eine wichtige Rolle bei der Endothelabhängigen Vasodilation (Behrendt et al. 2002). NO (Stickstoffmonoxid), das durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aus dem Precursor L-Arginin gebildet wird, ist der wichtigste endogene Mediator sowohl für die Vasodilation als auch für andere antiinflammatorische und antithrombotische Effekte des Gefäßendothels (Landmesser et al. 2004). NO entfaltet seinen vasodilatierenden Effekt in vaskulären glatten Muskelzellen, indem es die Guanylatcyclase aktiviert, die zu einer erhöhten Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und einem Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration führt (Behrendt et al. 2002). Weiterhin verhindert NO die Plättchenaggregation, die vaskuläre SMC Proliferation und Endothelzell-Leukozythen-Interaktionen (Liao et al. 2005). Die Schädigung des Endothels zieht eine Reduktion der Bioverfügbarkeit von NO nach sich und erfolgt einerseits durch die Inaktivierung von NO durch Superoxide, andererseits durch die Hemmung der NO-Synthaseaktivität durch ADMA, einem endogenen NO-Synthase Inhibitor, sowie durch die eNOS „Entkopplung“, die durch eine erhöhte H₄B-Oxidation bedingt ist (Landmesser et al. 2004). Der Verlust der protektiven physiologischen

Endothelfunktion infolge einer Endothelschädigung ermöglicht durch eine veränderte Permeabilität atherogenen Faktoren wie Lipiden und Entzündungszellen direkten Kontakt zur Gefäßwand und führt zur erhöhten Expression von Zelladhäsionsmolekülen und zwangsläufig zu Vasokonstriktion sowie Hypertension.

1.3.3 Arteriosklerotische Plaque und fibröse Deckschicht

Die Arteriosklerose ist eine Erkrankung der Intima der Gefäßwand großer und mittlerer Arterien, die zunächst mit einer Entzündung und im fortgeschrittenen Stadium mit einer Verdickung sowie Verhärtung der Arterienwand einhergeht. Im weiteren Verlauf der Erkrankung werden arteriosklerotische Plaques mit typischem nekrotischen Lipidkern und einer fibrösen Deckschicht, die durch den geringen Gehalt an extrazellulärer Matrix und Zellen sehr rupturgefährdet ist, gebildet. Durch die Einengung des Gefäßdurchmessers kommt es zu einer Behinderung des Blutflusses und dadurch zu Ischämien der nachgeschalteten Versorgungsgebiete des betroffenen Gefäßes. Tritt eine Ruptur der vulnerablen fibrösen Deckplatte auf, wird thrombotisches Material aus der arteriosklerotischen Plaque freigesetzt, was mit einer intravaskulären Thrombozytenaggregation und Thrombose verbunden ist. Dies wiederum führt entweder zu einem thrombotischen Verschluss des betroffenen Gefäßes oder, was weitaus häufiger auftritt, zu einer Verschleppung des Blutgerinnsels in die nachgeschalteten Gefäße. Durch Lösung und Fortschwemmung kann der Thrombus mit dem Blutfluss in die Lunge (Lungenembolie), das Gehirn (Schlaganfall, Apoplex), die Koronararterien (Herzinfarkt), die Nierengefäße (Nierenversagen) oder die Darmgefäße (Darminfarkt) gelangen und dort lebensbedrohliche Komplikationen verursachen. Bekannte Risikofaktoren mit genetischer Komponente, die die Gefahr der Entstehung atherosklerotischer Gefäßerkrankungen erhöhen, sind: Diabetes mellitus, sowohl Typ-1 als auch Typ-2 und metabolisches Syndrom, Hypertonie, Hypercholesterinämie (erhöhtes LDL-Cholesterin, niedriges HDL-Cholesterin, erhöhtes Lipoprotein (a), genetische Prädisposition, männliches Geschlecht, erhöhte Werte der Aminosäure Homocystein und erhöhte

Gerinnungsfaktoren. Mit einem erhöhten Arterioskleroserisiko in Verbindung stehende Umweltfaktoren sind: Adipositas/ fettreiche Ernährung, Bewegungsmangel, negativer Stress, Nikotinabusus, niedrige Antioxidantien-Konzentrationen und Infektionen. Kommen mehrere dieser Risikofaktoren zusammen, potenziert sich das Risiko für arteriosklerotische Gefäßerkrankungen (Teupser et al. 2002).

1.3.3.1 Molekulare Pathogenese der Arteriosklerose und die besondere Bedeutung der fibrösen Deckschicht

Die Arteriosklerose ist gekennzeichnet durch viele komplexe Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen, Blutbestandteilen (LDL) und -zellen (Lymphozyten, Thrombozyten) sowie Signalmolekülen (Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle). Die „response to injury“-Hypothese geht davon aus, dass es zunächst zu einem Endothelzellschaden beziehungsweise einer Dysfunktion des Endothels kommt, die durch eine erhöhte Ansammlung von oxidiertem LDL im Subendothelialraum der Arterienwand hervorgerufen wird. Die LDL-Oxidation wird durch eine erhöhte Bildung von freien Sauerstoffradikalen verursacht und führt zu einer Entzündungsreaktion beziehungsweise zu einem fortschreitenden Gewebeschaden des Endothels. Die freien Sauerstoffradikale werden durch Lipoxygenasen und NADPH Oxidasen der Endothelzellen und eingewanderter Leukozyten gebildet (Teupser et al. 2002). In der Folge stimulieren die LDL-Aggregate das Endothel zur Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Selektinen. Diese chemotaktischen Substanzen ziehen Monozyten und T-Lymphozyten des Blutes an, so dass es erst zum „Rollen“ der Monozyten und dann zur Anlagerung der Zellen an der endothelialen Oberfläche kommt. Über Sialyl-LewisX-Glycoproteine und L-Selektine treten die Monozyten mit dem E-Selektin und Mucin-ähnlichen Rezeptor des Endothels in Kontakt und gehen zunächst eine instabile Verbindung ein. Membranintegriertes endotheliales Proteoheparansulfat bindet und präsentiert den Monozyten des Blutes Chemokine, die diese Substanz über G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren erkennen, binden und so die weitere Arretierung sowie Adhäsion der Monozyten vermitteln. Die auf diese

Weise aktivierten Monozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche über G-Proteine Integrine (Very late antigen 4, VLA-4), die mit dem vom Endothel gebildeten Adhäsionsrezeptor Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) eine stabile Verbindung eingehen. An diesem Vorgang ist auch das weniger bindungsspezifische Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) beteiligt. Schließlich treten die durch Chemokine zur transendothelialen Migration angeregten Monozyten durch das geschädigte Endothel in die Intima und differenzieren sich dort mit Hilfe des mitogenen Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) zu Makrophagen (Teupser et al. 2002). Diese Transformation wird auch durch Interleukin-3 und Granulocyte Macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) gefördert. Durch die Wirkung des M-CSF exprimieren Makrophagen Scavenger-Rezeptoren, die sie befähigen, modifiziertes und oxidiertes LDL aufzunehmen (Teupser et al. 2002). In der Intima entstehen Schaumzellen (foam-cells), die reich an Cholesterin sind und morphologisch als „fatty-streak“ (Lipidflecken) in Erscheinung treten. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zum nekrotischen Untergang der Schaumzellen, zur Freisetzung von Lipiden sowie zur Einlagerung von Kalzium und Formation von Cholesterinkristallen, die den typischen nekrotischen lipidreichen Kern der arteriosklerotischen Plaque bilden. Im fortgeschrittenen Stadium der Arteriosklerose werden verschiedenste Zytokine und Wachstumsfaktoren von Endothelzellen sowie Monozyten produziert und induzieren die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima, sowie die Synthese von extrazellulärer Matrix (Kollagen, Proteoglykane) durch die glatten Muskelzellen. Normale kontraktile glatte Muskelzellen können ihren Phänotyp reversibel ändern und in den synthetischen Phänotyp übergehen, der mit verstärkter Proliferation und erhöhter Matrixsynthese assoziiert ist (Newby et al. 1999). Auf diese Weise entsteht das Matrixgerüst der fibrösen Deckplatte, die den Lipidkern abdeckt. Die Stabilität einer arteriosklerotischen Plaque ist maßgeblich abhängig vom Gehalt an intimalen glatten Muskelzellen und Extrazellulärer Matrix (ECM). Kommt es zu einer Verarmung von ECM und Zellen in der fibrösen Deckschicht, so verliert diese ihre Stabilität und rupturiert sehr leicht. Dieser Vorgang wird

durch den Einfluss von Interferon-gamma der T-Lymphozyten gefördert. Interferon-gamma führt einerseits bei Makrophagen zu einer Ausschüttung von Matrixmetalloproteinasen, die die kollagene Matrix der fibrösen Deckplatte abbauen, und andererseits bei glatten Muskelzellen zu einer verminderten Synthese von Extrazellulärer Matrix (Teupser et al. 2002). Aktivierte glatte Muskelzellen exprimieren den CD40-Ligand, der durch den CD40-Rezeptor auf T-Lymphozyten gebunden wird und so die Interferonausschüttung noch steigert (Teupser et al. 2002). Weiterhin wirken aktivierte Entzündungszellen toxisch auf intimale glatte Muskelzellen, die auch schnell altern und somit die fibröse Deckschicht nicht weiter stabilisieren können. Im Endstadium ist auch die Media betroffen, was mit einer Zerstörung der Lamina elastica und einem Verlust der elastischen Eigenschaften sowie der Reißfestigkeit der arteriosklerotischen Plaque einhergeht. Eine Ruptur der fibrösen Deckplatte verursacht schließlich die Freisetzung des thrombogenen Plaqueinhaltes und führt zu einem thrombotischen Gefäßverschluss, der die bereits beschriebenen lebensbedrohlichen Folgen haben kann.

2.0 Fragestellung

Es soll geprüft werden, inwiefern sich das Synthese-Profil der extrazellulären Matrix humaner vaskulärer glatter Muskelzellen unter dem Einfluss von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin verändert. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren arteriosklerotische Plaques stabilisieren und das Voranschreiten der Arteriosklerose vermindern kann. Ein Faktor, der entscheidenden Einfluss auf die Plaquestabilität und -größe hat, ist die Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix (ECM) des Arterien Gewebes und der die Plaque bedeckenden fibrösen Deckschicht. Die extrazelluläre Matrix ist für die Erhaltung der Struktur und Funktion, insbesondere der mechanischen Eigenschaften (Reiß- und Zugfestigkeit), von Gefäßwänden verantwortlich. In der atherogenen Plaque bestimmen Ausmaß und Qualität der fibrösen Deckschicht Stabilität und Rupturgefährdung der Plaque. Im Rahmen der Pathogenese atherogener Plaques kommt es in der Gefäßwand nicht nur zur Akkumulation von Lipoproteinen sondern auch zu einer gesteigerten Neubildung von extrazellulärer Matrix, die von den glatten Muskelzellen der Intima und Media nach Einwanderung in den subendothelialen Raum gebildet wird. Da die Biosynthese und der Abbau der Einzelkomponenten der ECM einer getrennten Regulation unterliegen, können ECM-Strukturen unterschiedlicher Zusammensetzung gebildet werden. Die Veränderung der ECM-Syntheseraten von vaskulären glatten Muskelzellen unter dem Einfluss von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren können Hinweise auf eine gezielte Steuerung der ECM-Synthese geben. Ziel dieser Dissertation ist es, die Effekte des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Lovastatin auf die Expression der Hauptkomponenten der vaskulären extrazellulären Matrix (Kollagene, Proteoglykane) und der damit in Verbindung stehenden Wachstumsfaktoren (TGF- β_1 , bFGF) in kultivierten humanen vaskulären glatten Muskelzellen zu evaluieren. Registriert wird die vergleichende Analytik des Stoffwechsels normaler und unter dem Einfluss von Lovastatin kultivierter humaner vaskulärer glatter Muskelzellen.

3.0 Material und Methoden

3.1 Biochemikalien

Alle verwendeten Biochemikalien waren von analytischer Qualität bzw. von höchster verfügbarer Güteklasse und wurden von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany), Merck (Darmstadt, Germany) oder Serva (Heidelberg, Germany) bezogen.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Untersuchungsgut - human coronary arterial smooth muscle cells (vSMC)

Untersucht wurden humane koronare arterielle glatte Muskelzellen TEBU OC1105 von TEBU GmbH (Offenbach, Germany). Die Kultivierung der SMCs, deren Zellidentität durch alpha-Aktin-Immunfärbung bestätigt wurde, erfolgte in Medium 231, angereichert mit SMGS (smooth muscle growth supplement), 2 mM Glutamin und 10 µg/ mL Ciprofloxacin (Ciprobay), bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO₂. Die Zellen wurden in der 5. bis 7. Zellpassage in den verschiedenen Versuchen eingesetzt. Die Lagerung von überschüssigen Zellen erfolgte auf 10 % DMSO-haltigen Medium in Behältern mit flüssigem Stickstoff, in die die Zellen über 6 h stufenweise versenkt wurden. Bei Bedarf konnten die Zellen wieder aufgetaut werden.

3.2.2 Auftauen von humanen SMCs

Dazu wurde die benötigte Zellkultur mit entsprechender Zellzahl aus dem Stickstoffbehälter entnommen, in der Hand etwas angewärmt und unter sterilen Bedingungen aufgetaut. In einem sterilen 12 mL Falcon Tube wurden 5 mL DMEM (10 % FKS) vorgelegt. Daraus wurden 0,5 mL mit einer sterilen Pipette entnommen und zu den angetauten Zellen gegeben. Dieser

Vorgang wurde wiederholt, so dass die Zellen kontinuierlich verdünnt und in das Falcon Tube überführt wurden. Anschließend erfolgte die schonende Zentrifugation der Zellen bei 300 g, Raumtemperatur und nicht länger als 5 Minuten. Mit einer feinen Kristallspitze wurde dann das überständige zellfreie Medium abgezogen und verworfen. Das Zellpellet wurde in einem bestimmten Volumen Medium 231 (Standardmedium) resuspendiert. Die homogenisierte Zellsuspension wurde nun in einer bestimmten Dichte in mehreren Zellkulturschalen bzw. -flaschen ausgesät, mikroskopisch überprüft und kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte in einem 48 h-Intervall.

3.2.3 Subkultivierung

Die zu subkultivierenden Kulturflaschen wurden mikroskopisch beurteilt, die Zellen sollten sich in einem Stadium der SubKonfluenz befinden. Das Medium wurde unter einer Sicherheitswerkbank mit einer sterilen Pipette abgezogen und verworfen. Dann wurde der Zellrasen zweimal mit 5 mL PBS gewaschen und 1000 $\mu\text{L}/75 \text{ cm}^2$ Trypsin (1:4 mit PBS verdünnt; Inkubationszeit 3 min bei 37 °C) auf der Zellschicht gleichmäßig verteilt. Die Ablösung der humanen SMCs wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und konnte durch leichtes Beklopfen der Kulturflasche unterstützt werden. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe eines genauen Volumens serumhaltigen Mediums beendet und aus der homogenisierten Zellsuspension die Zellzahl bestimmt (3.3.1). Nun konnte man die Zellsuspension durch Zugabe von Medium auf die gewünschte Dichte einstellen und ein jeweils zuvor berechnetes Volumen auf neue Kulturschalen verteilen.

3.2.4 Herstellung von Lovastatin

Die inaktive Lactonform von Lovastatin (Merck, Sharp & Dohme, München, Germany) wurde in die aktive Hydroxysäure umgewandelt, indem man 20 mg des Lactons in 0,5 mL 100 % Ethanol löste, 0,75 mL 0,1 M NaOH hinzu

gab und die Lösung für 2 h bei 50 °C erhitze. Anschließend erfolgte die Neutralisation mit 0,1 M HCl auf einen pH-Wert von 7.2. Die Lösung wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 10 mL aufgefüllt. Diese frisch hergestellte Stammlösung (5 mM) wurde für die jeweiligen Versuche mit PBS (phosphate buffered saline) auf die benötigte Arbeitskonzentration verdünnt.

3.2.5 Standardversuch

Humane SMCs der 5. bis 7. Passage wurden je nach Versuch in einer Dichte von 50000 – 75000 Zellen/ Zellkulturschale (35 mm Durchmesser) bzw. 585000 – 600000 Zellen/ Kulturflasche (75 cm²) unter Medium 231 ausgesät. Die Kulturen wurden während des Zellwachstums mikroskopisch kontrolliert. Nach 24-48 h wurde das Medium durch Standardmedium oder durch mit 1 µM Lovastatin versetztes Standardmedium ersetzt und für weitere 48 h inkubiert. Anschließend wurden Medium und Zellen in verschiedenen Analyseverfahren eingesetzt. Bei jedem Versuch wurden in Parallelkulturen die Zellzahl (3.3.1) und der Proteingehalt (3.3.2) bestimmt.

3.3 Bestimmungen von Zellzahl und Zellprotein

3.3.1 Zellzahlbestimmung

Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 500 µL Trypsin (1:4 mit PBS verdünnt; 3 min bei 37 °C) von der 35er Zellkulturschale gelöst und in einem definierten Volumen in ein Reagenzglas aufgenommen. Aus der homogenisierten Zellsuspension wurden zweimal 200 µL (Doppelbestimmung) entnommen und mit 9,8 mL isotonischer Elektrolyt-Lösung in einem Messgefäß vermischt. Die Zellzahl konnte dann im Zellzählgerät (CASY 1, Schärfe System) festgestellt werden. Zelldebris wurde automatisch von der Berechnung ausgeschlossen. Zusätzlich zur Angabe der Zellzahl, wurde durch das Zellzählgerät das Zellvolumen und

der Zelldurchmesser bestimmt. Die Erfassung des Zellproteins erfolgte in linearen Kulturen.

3.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry

An die Zellzahlbestimmung schloss sich die Proteinbestimmung durch das Standardverfahren nach Lowry an. Die im Reagenzglas befindliche Zellsuspension wurde 3 min bei 800 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und verworfen. Das Zellpellet wurde nach 2 Waschschritten mit 1 mL PBS in 200 μ L (bzw. 500 μ L bei hoher zu erwartender Proteinmenge; $Zz > 200000$) 10 %iger Natronlauge 10 min in einem Wasserbad gekocht, um die vorhandenen Proteine zu denaturieren. Nach der Abkühlung wurde die Lösung mit 50 μ L (bzw. 125 μ L) 12,5 molarer Essigsäure neutralisiert. Zweimal 100 μ L (Doppelbestimmung) dieser Lösung pipettierte man in ein Eppendorf Reaktionsgefäß, fügte 1 mL der Testlösung (50:1 Lowry I: Lowry II) hinzu und inkubierte die Lösung für exakt 10 Minuten. Die Proteine bildeten mit diesem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz eine Verbindung. Anschließend wurden 100 μ L des 1:3 mit destilliertem Wasser verdünnten Folin-Reagenzes (Merck 9001) in das Mikroreaktionsgefäß gegeben, sofort homogenisiert und für 30 min inkubiert. Die mit dem Cu^{2+} komplexierten Proteine sind in der Lage das Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenz (=Folin-Reagenz) zu reduzieren (genauer: Molybdat bzw. Wolframat werden von der Wertigkeitsstufe VI zur Wertigkeitsstufe IV reduziert.) Die aromatischen Aminosäurereste Tyrosin und Tryptophan können das Folin-Reagenz direkt reduzieren, ohne vorherige Komplexierung mit dem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz. Bei der Reduktion erfährt das Folin-Reagenz einen Farbumschlag von gelb nach blau. Nach 30 min wird die Extinktion der Proben mit Hilfe eines Photometers (Spectronic Genesys 2) bei 750 nm bestimmt. Der Proteingehalt der Probe konnte durch die mitgemessene Extinktion eines Proteinstandards (BSA= Bovines Serum-Albumin) und der daraus errechneten Eichkurve ermittelt werden, da die Farbintensität der Lösung der Zahl der Peptidbindungen in der Probe über einen weiten Konzentrationsbereich direkt proportional ist.

3.4 Radioaktive Markierung

Die für die Untersuchung vorgesehenen Komponenten wurden nach relativ spezifischer Markierung mit einem radioaktiven Precursor ($[^3\text{H}]$ Prolin, $[^3\text{H}]$ Thymidin, $[^{35}\text{S}]$ Sulfat) isoliert und durch Radioaktivitätsmessung erfasst. Die Menge der inkorporierten Aktivität ist ein Maß für die Proteinsyntheserate.

3.4.1 Bestimmung der $[^3\text{H}]$ Thymidineinbaurate in kultivierte arterielle SMCs

Die $[^3\text{H}]$ Thymidineinbaurate wurde an 4 Parallelkulturen nach Stimulation mit 1 μM Lovastatin über 24, 48, 72 bzw 96 h bestimmt. Den Zellkulturen wurde jeweils 8 h vor Versuchsende 1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ Tritiummarkiertes Thymidin ($[\text{Methyl-}^3\text{H}]$ Thymidin; spezifische Aktivität 1.3 TBq mmol^{-1}) zugegeben. Nach Beendigung des Versuchs (nach 24 h, 48 h, 72 h oder 96 h) wurden die Kulturen gekühlt (Eistablett), das Medium abgezogen und verworfen, der Zellrasen je zweimal mit 1 mL PBS, 1 mL 10 % iger Trichloressigsäure (TCA) und 1 mL 96 %igem Ethanol (EtOH) gewaschen. Die Waschlösungen wurden eiskalt und tropfenweise verwendet. Die TCA- und EtOH-Waschlösungen mussten jeweils 5 min auf dem Zellkulturrasen verbleiben, um die Zellen zu fixieren. Zur Entfernung von überschüssigem EtOH wurden die Kulturen 10 min bei 65 °C gehalten. Zur Radioaktivitätsmessung und Proteinbestimmung wurden die Kulturen mit exakt 500 μL 10 % iger NaOH versetzt und für 1 h bei 65 °C in einer feuchten Kammer inkubiert, wodurch die Zellschicht vollständig solubilisiert wurde. Anschließend pipettierte man exakt 125 μL 12,5 M Essigsäure, homogenisierte das Gemisch und entnahm 250 μL für die Radioaktivitätsmessung. Die Probe wurde mit destilliertem Wasser auf 2 mL aufgefüllt und mit 3 mL Scintillationslösung sorgfältig gemischt, so dass ein homogenes Gel entstand. Aus dem Ergebnis der Scintillationszählung wurde die gesamte $[^3\text{H}]$ Thymidininkorporation in die DNA/Kultur ermittelt.

3.4.2 [³⁵S]Sulfat-Markierung und [³H]Prolin-Markierung von Zellkompartimenten

Die radioaktive Markierung von sulfatierten Glucosaminoglykanen erfolgte für 48 h durch 5 µCi [³⁵S]Sulfat (carrier free, 0,8-1,5 TBq/mg⁻¹ sulfur)/mL Standardmedium. Kollagen wurde für 48 h durch 2,5 µCi [2,3-³H]Prolin (spezifische Aktivität 1,74 TBq mmol⁻¹)/mL Standardmedium markiert. Die [³⁵S] bzw. [³H]-Inkorporation in Medium-, in Zell- und in Extrazelluläre Proteine wurde nach Abtrennung der proteingebundenen von der nicht inkorporierten Radioaktivität mittels Gelfiltration durch Scintillationszählung ermittelt.

Zur Isolierung der Subfraktionen wurde das Medium vom Zellrasen abgezogen und in einem Eppendorfgefäß asserviert. Um ein zellfreies Medium zu erhalten, wurde die Probe bei 800 g 3 min zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C eingefroren. Später wurde die Probe lyophilisiert in einem kleinen definierten Volumen destillierten Wassers gelöst und mit Hilfe der Sephadex G-50 Säulechromatographie aufgetrennt. Der V₀ Peak wurde aufgefangen und die inkorporierte Radioaktivität analysiert.

Der Zellrasen wurde dann zweimal mit 1 mL PBS gewaschen und anschließend mit 300 µL PBS, das 0,5 % Triton X-100 in 25 mM NH₄OH enthält (Vlodavsky-Lösung), für exakt 3 min bei 22 °C lysiert. Das Lysat wurde dann in einem Eppendorf Reaktionsgefäß asserviert, zentrifugiert und der Überstand mit 1,25 M CH₃COOH neutralisiert. Die Probe wurde auch auf eine G-50 Säule aufgetragen und der V₀ Peak zur Radioaktivitätsmessung der [³⁵S] bzw. [³H]Inkorporation in zelluläre Proteine eingesetzt.

Die verbliebene extrazelluläre Matrix wurde durch 4 schnelle Waschschriffe mit je 1 mL PBS von der Vlodavskylösung befreit. Anschließend wurde 1 mL Papainpuffer (1 fach), eine Spatelspitze Cysteinumhydrochlorid sowie 20 µL Papainenzym in die Kulturschale gegeben und in einer feuchten Kammer bei 65 °C für 24 h inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde die zersetzte extrazelluläre Matrix in ein Minivial pipettiert, mit destilliertem Wasser auf 2 mL aufgefüllt und mit 3 mL Scintillationslösung (Quicksafe)

sorgfältig gemischt. Durch die Scintillationszählung wurde die [³⁵S] bzw. [³H]Inkorporation in extrazelluläre Matrixproteine ermittelt.

3.5 Zellkompartimente

Die Zellkompartimente können durch direkte immunologische Testung (Quantikine, R&D Systems) der Zelloberflächen und ECM-assoziierten Komponenten der ECM erfasst werden, indem spezifische monoklonale Antikörper gegen bFGF und TGF- β_1 , die an einer Mikrotiterplatte gebunden waren, TGF- β_1 oder bFGF fixierten.

3.5.1 Gewinnung von Proben zur Quantifizierung von Wachstumsfaktoren

3.5.1.1 im Zellkulturmedium

Nach Aussaat und Stimulation der Zellen, wie unter 3.2.5 beschrieben, wurde das Medium vom Zellrasen abgezogen und in einem Eppendorfgefäß asserviert. Um zellfreies Medium zu erhalten, wurde die Probe bei 800 g 3 min zentrifugiert und der Überstand später zur Quantifizierung des in das Medium sezernierten TGF- β_1 bzw. bFGF für den Immunassay eingesetzt (Aufbewahrung bei 4 °C).

3.5.1.2 im Peri- und Intrazellulärraum

Zur quantitativen Bestimmung des peri- und intrazellulär sezernierten TGF- β_1 wurde der Zellrasen nach Abzug des Mediums zweimal mit 1 mL PBS (phosphate-buffered saline; 0,138 M sodium chloride; 0,0027 M potassium chloride; 0,01 M phosphate buffer; pH 7.4; 25 °C) gewaschen und dann auf einem Eistablett (4 °C) in 350 μ L Lysispuffer, der aus PBS Brij³⁵ 0,5 % sowie Protease Inhibitoren (OEGEMA 10 fach, PMSF 100 fach (Phenylmethylsulfonylflourid; Sigma)) bestand, für 10 min solubilisiert. Das Zelllysat wurde dann mit Hilfe eines Gummischabers von der Kulturschale

abgelöst und mit einer Pipette in zuvor gekühlte 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäße transferiert. Diese wurden in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge (Beckmann G515R Centrifuge) bei 10000 g 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand der Probe wurde vorsichtig in neue Eppendorfgefäße pipettiert, bei 4 °C gekühlt und für die ELISA Analyse verwendet.

3.5.1.3 im Perizellulärraum

Um das perizelluläre bFGF zu erhalten, wurden die Zellkulturen nach Entfernung der Mediums zunächst zweimal mit 2 mL PBS gewaschen und mit 300 µL Trypsin (1:4 mit PBS verdünnt; 3 min bei 37 °C) von der 35er Zellkulturschale gelöst. Anschließend gab man 150 µL 0,042 M Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI; Roche Diagnostics GmbH; Mannheim; Germany) auf die Zellen, transferierte die Suspension in ein Mikroreaktionsgefäß und zentrifugierte bei 800 g für 3 min. Im Überstand befand sich das perizelluläre bFGF, das in einem neuen Eppendorfgefäß bei 4 °C für den Immunassay asserviert wurde.

3.5.1.4 im Intrazellulärraum

Um das intrazelluläre bFGF zu gewinnen, wurden die Zellkulturen nach Entfernung des Mediums zunächst zweimal mit 2 mL PBS gewaschen und mit 300 µL Trypsin (1:4 mit PBS verdünnt; 3 min bei 37 °C) von 35er Kulturschale gelöst. Anschließend gab man 150 µL 0,042 M Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI; Roche Diagnostics GmbH; Mannheim; Germany) auf die Zellen und transferierte die Suspension in ein Eppendorfgefäß, um sie bei 800 g 3 min zu zentrifugieren. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen erneut mit PBS gewaschen, bevor die Zellen mit 150 µL Lysispuffer (4 °C), der aus PBS Brij³⁵ 0,5 % und Protease Inhibitoren (OEGEMA 10 fach, PMSF 100 fach) bestand, lysiert wurden. Nach einer Inkubation von 10 min wurde das Lysat bei 10000 g 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt das intrazelluläre bFGF, das in einem neuen Eppendorfgefäß bei 4 °C für die anschließende ELISA Analyse asserviert wurde.

3.5.1.5 im Subzellulärraum (ECM)

Das an die Extrazelluläre Matrix gebundene TGF- β_1 wurde gewonnen, indem man die gewaschenen Zellen mit 500 μ L PBS, das 0,5 % Triton X-100 in 25 mM NH₄OH (Vlodavsky-Lösung) für exakt 3 min bei 22 °C lysierte. Daran schlossen sich 4 schnelle Waschschrte mit je 1 mL PBS an, die die Zellen aus den Kulturschalen entfernte. Das an die Extrazelluläre Matrix gebundene TGF- β_1 wurde dann mit 250 μ L Lysispuffer (4 °C), der aus PBS Brij³⁵ 0,5 %, Protease Inhibitoren (OEGEMA 10 fach, PMSF 100 fach) sowie 0,16 M HCl bestand, extrahiert und so die aktive Form von TGF- β_1 freigesetzt. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES neutralisiert, in ein Mikroreaktionsgefäß transferiert und 10 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, bei 4 °C gekühlt und später im Immunassay eingesetzt.

3.5.2 Neutralisation der biologischen Aktivität von TGF- β_1 mittels monoklonaler Anti-humaner TGF- β_1 Antikörper

Zusätzlich zur Aussaat und Stimulation der Zellen, wie unter 3.2.5 beschrieben, wurde das Medium kurz vor der Lovastatinzugabe mit 10 μ g/10⁵ Zellen monoklonalen Anti-humanen TGF- β_1 Antikörpern (R&D Systems, purified mouse IgG₁ Clone 901b.2) versetzt, um so die biologische Aktivität von TGF- β_1 zu neutralisieren. Die Zugabe wurde nach 24 h wiederholt.

Die radioaktive Markierung der SMCs sowie die weitere Aufarbeitung und Gewinnung der Proben verlief wie unter 3.4.2 beschrieben.

3.6 ELISA-Bestimmungen

Mit Hilfe der ELISA-Technik ist eine immunologische Quantifizierung bestimmter Komponenten durch spezifische Antikörper möglich.

3.6.1 human FGF basic ELISA

Nachdem die Proben, wie unter Punkt 3.5.1 beschrieben, gewonnen wurden, konnten die Reagenzien und Standards nach den Herstellerangaben (Quantikine; R&D Systems; Wiesbaden-Nordenstadt; Germany) vorbereitet werden. Die Proben wurden je nach zu erwartender Extinktion mit Sample Diluent verdünnt. Zunächst wurden 100 μ L des Assay Diluent RD1-43 in jede Vertiefung der 96er Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend gab man 100 μ L des Standards oder der verdünnten Proben dazu. Die Proben wurden nun 1,5 h unter ständiger Bewegung auf einem Minishaker (MS1; IKA) inkubiert, wodurch bFGF an die an der Mikroplatte fixierten monoklonalen Antikörper gebunden wurde. Nach intensivem Waschen (4 mal mit je 400 μ L Waschpuffer) zur Entfernung aller ungebundenen Stoffe, wurden 200 μ L FGF basic Conjugate, das den zweiten monoklonalen Antikörper enthielt und mit Peroxidase konjugiert war, in jede Vertiefung pipettiert und die Proben erneut für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Minishaker inkubiert. Nach einem erneuten wie bereits oben beschriebenen Waschschrift, wurden je 200 μ L Substrate Solution, ein Tetramethylbenzidin, in jeden Reaktionsschacht der Mikrotiterplatten pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der dritten Inkubation beendete und stabilisierte man die abgelaufene Farbreaktion mit 50 μ L Stop Solution. Die Extinktion wurde nun bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem ELISA-Reader gegen einen Leerwert gemessen.

3.6.2 human TGF- β_1 ELISA

Nach Vorbereitung der Reagenzien, Standards und Proben wurden je 200 μ L in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert und 3 h unter ständiger Bewegung auf einem Minishaker (MS1; IKA) inkubiert, wobei TGF- β_1 durch die an der Mikroplatte gebundenen monoklonalen Antikörper fixiert wurde. Nach 4 maligem Waschen mit 400 μ L Waschpuffer, wurden 200 μ L des mit Peroxidase konjugierten zweiten polyklonalen Antikörpers in jeden

Reaktionsschacht der Mikrotiterplatten gegeben und erneut für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der bereits beschriebene Waschschrift wurde wiederholt. Anschließend wurden 200 µL Substrate Solution in jede Mikrotiterplattenvertiefung pipettiert und für 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz erneut inkubiert. Nach der dritten Inkubation wurden je 50 µL Stop Solution hinzugefügt, die die Farbbildung beendete und für 30 min stabilisierte. Bei einer Wellenlänge von 450 nm konnte abschließend die Extinktion in einem ELISA-Reader bestimmt werden.

3.6.3 Cell Death Detection ELISA

Das zytotoxische Potential höherer Lovastatinkonzentrationen wurde in Zellkulturen humaner SMCs mit Hilfe des Cell Death Detection Elisa^{PLUS} (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) untersucht. Durch dieses Verfahren war es möglich, qualitativ und quantitativ zytoplasmatische Histon-assoziierte-DNA-Fragmente (Mono- und Oligonukleosomen) nach induziertem Zelltod in behandelten und unbehandelten Zellkulturen nachzuweisen. Nachdem die Zellen wie unter 3.2.5 beschrieben behandelt wurden, wurde das Medium abgezogen, in einem Eppendorfgefäß asserviert und bei 200 g für 3 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen zunächst 2 Mal a´2 mL mit PBS gewaschen und direkt im dish in Abhängigkeit von der Zellzahl mit Lysispuffer lysiert (1mL / 100000 Zellen, max. 3 mL). Die SMC's wurden mit dem Lysispuffer für 30 min bei RT inkubiert, anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 200 g für 10 min zentrifugiert. Man entnahm je 20 µL /well aus dem Überstand des Mediums und des Lysats mit Lovastatin behandelter Zellen, aus der mitgelieferten Positivkontrolle des Herstellers, aus dem Überstand des Mediums und Lysats unbehandelter Zellen (= Negativkontrolle) und als Background Inkubationspuffer. Dann wurden 80 µL des Immunoreagenzes pro Vertiefung der Mikrotiterplatten hinzugefügt, mit einer Folie abgedeckt und 2h bei RT auf einem Shaker (300 rpm) inkubiert. Anschließend wurde jeder Reaktionsschacht der Mikrotiterplatten 3-mal mit 250-300 µL Inkubationspuffer gewaschen und in jedes Mikroreaktionsgefäß 100 µL

ABTS Solution pipettiert. Es folgte eine erneute Inkubation für 10-20 min bei RT auf dem Shaker (250 rpm). Abschließend konnte mit dem ELISA-Reader bei 405 nm gegen ABTS Solution als Blank die Extinktion der Proben gemessen werden.

3.7 Molekularbiologische Untersuchungen

Durch die Isolierung der Gesamt-RNA, das Umschreiben auf cDNA und die Agarosegelelektrophorese ist anhand der Intensität der Banden eine Aussage über die Menge der vorhandenen spezifischen mRNA möglich.

3.7.1 RNA-Isolierung

Die Aufarbeitung erfolgt unter RNase freien Bedingungen: Arbeiten auf desinfizierten Arbeitsflächen, Tragen von Handschuhen, Verwendung von mit Filter gestopften Pipettenspitzen sowie RNase freien Gefäßen und Materialien. Die RNA-Isolierung erfolgte nach dem mitgelieferten Protokoll des Herstellers (Quiagen RNeasy Mini Kit).

Die für die RNA- Isolierung verwendeten humanen SMCs wuchsen für 48 h in An- oder Abwesenheit von 1 μ M Lovastatin. Zunächst wurden das Medium und der Nachlauf quantitativ aus den 75er Zellkulturflaschen abgezogen und verworfen. Der Zellrasen wurde zweimal mit 5 mL PBS gewaschen und anschließend zur Bestimmung der Zellzahl (siehe 3.3) trypsinisiert. Der so gewonnene Zellpool wurde nun bei 800 g ca. 15 min zentrifugiert und dann der Überstand abgezogen. Das Zellpellet wurde in Abhängigkeit der Zellzahl in 600 μ L RLT-Puffer/ 5 Mio. Zellen, dem β -Mercaptoethanol im Verhältnis 1 mL + 10 μ L β -ME hinzugesetzt wurde, lysiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 mL RNase freies Eppendorfgefäß pipettiert, homogenisiert und kurz anzentrifugiert, um Schaum zu entfernen. Dann wurde das Lysat in die QIA-Shredder-Säule überführt und erneut 2 min bei 14000 g zentrifugiert. Zum so gewonnenen Eluat wurde 1 Vol 70 % Ethanol hinzugefügt und durch Pipettieren homogenisiert. Die Lösung wurde in zwei Fraktionen (max. 700 μ L) auf die RNeasy Säule

aufgetragen und 15 sec bei 8000 g zentrifugiert, wodurch die RNA und DNA auf der Membran gebunden wurde. Der Durchlauf wurde verworfen. Der DNase Abbau erfolgte direkt auf der Membran durch Hinzufügen von 80 µL DNase-Mix, der zuvor durch vorsichtiges Mischen von 70 µL RDD-Puffer und 10 µL DNase hergestellt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde die RNeasy Säule erneut 15 sec bei 8000 g zentrifugiert. Danach wurde die Membran mit 350 µL RW1 Puffer gewaschen, 15 sec bei 8000 g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säule wurde dann auf ein neues Sammelröhrchen gestellt, mit 500 µL RPE-Waschpuffer (1+4 mit 96-100 % Ethanol verdünnt) gewaschen, wiederum 15 sec bei 8000 g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Als nächstes wurde die Säule mit 500 µL 80 % Ethanol gewaschen, 2 min bei 14000 g trocken zentrifugiert und auf ein neues 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäß gesetzt. Zuletzt wurde die Membran 1 min mit 30 µL DEPC H₂O (bzw. 50 µL bei konfluenter Kultur) vorinkubiert dann 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Durch diesen letzten Schritt wurde die RNA in H₂O eluiert und in dem Eppendorf Reaktionsgefäß aufgefangen. Zur Quantifizierung der vorhandenen RNA-Menge in der Probe wurden 3 µL der Probe (aus 50 µL) mit 47 µL 10 mM Tris/HCl (pH 7.5) verdünnt, in einem Photometer (Eppendorf-Bio-Photometer; Küvettenvolumen 10 µL) wurde die Extinktion der Probe bestimmt und dokumentiert. Die so gewonnene RNA konnte nun bei -80 °C zwischengelagert werden oder direkt mit Hilfe der Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben werden.

3.7.2 Reverse Transkription (RT)

3 µg der durch die RNA-Isolierung gewonnenen RNA-Lösung wurde zunächst pro Ansatz durch die Reverse Transkription (RT MBI-Fermentas) in cDNA umgeschrieben. Es gelten die gleichen sterilen Arbeitsbedingungen wie für die RNA-Isolierung, allerdings sollte auch unter einem Abzug gearbeitet werden, um eine Kontamination mit RNasen zu verhindern. Zuerst wurden auf Eis 3 µg RNA und 1 µL Oligo dT (0,5 µg/µL) pipettiert und auf ein Volumen von 12 µL mit DEPC H₂O aufgefüllt. Die Proben

wurden dann für 5 min im Eppendorf Mastercycler bei 70 °C inkubiert, um das Aufschmelzen der RNA und die anschließende spezifische Primerhybridisierung am Poly(A)-Terminus der mRNA bei der folgenden Abkühlung auf Eis zu realisieren. Zu den Proben wurden nun je 7 µL des erst direkt vor Gebrauch hergestellten Mastermixes gegeben. Dieser beinhaltete pro Ansatz 4 µL RT-Puffer (5x) und 2 µL 10 mM dNTP-Mix sowie 1 µL Ribonuclease Inhibitor (20 U/µL). Dann erfolgte erneut eine Inkubation im Mastercycler (5 min bei 37 °C) und anschließend die Zugabe von 1 µL Revert Aid (M-MULV RT) zur Probe bzw. je 1 µL H₂O zum Superscript und Eigenleerwert. Die Proben wurden nun für 60 min bei 42 °C inkubiert, was die Erststrangsynthese der cDNA zur Folge hatte. In einem abschließenden Schritt wurden die Ansätze für 10 min auf 70 °C erhitzt, um die RT und verbliebene RNA-Typen zu denaturieren. Die erhaltene cDNA-Lösung (20 µL) wurde mit 40 µL DEPC H₂O gebrauchsfertig verdünnt und bis zu ihrer weiteren Verwendung in der PCR bei -20 °C gelagert.

3.7.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Es gelten wie bei der Reversen Transkription weitestgehend sterile Bedingungen. Aus Gründen der Praktikabilität wurden alle verwendeten Primer vor Gebrauch auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt (Tabelle 4).

Tabelle 4 Verwendete Primer

<p>bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) Primer <i>forward</i> (10 nmol/µL) Sequenz: 5' CATCCACCCCGACGGC 3' Primer <i>reverse</i> (10 nmol/µL) Sequenz: 5' TGTGTGCTAACCGTTACCTGGC 3' Länge des Amplifikates: 89 bp</p>
<p>TGF-β₁ (Transforming Growth Factor β₁) (R&DSystems) Primerpair (7,5 pmol/µL) Länge des Amplifikates: 442, 439 bp Positive Control: 340 bp</p>
<p>Kollagen I Primer <i>forward</i> (10 nmol/µL) Sequenz: 5' TACAGCGTCACTGTTCGATGGC 3' Primer <i>reverse</i> (10 nmol/µL) Sequenz: 5' TCAATCACTGTCTTGCCCCAG 3' Länge des Amplifikates: 61 bp</p>
<p>Kollagen III (Quiagen) Primer <i>forward</i> (10 nmol/µL) Sequenz: 5' TGGAGGATGGTTGCACGAAA 3'</p>

<p>Primer <i>reverse</i> (10 nmol/μL) Sequenz: 5' GCCAACGTCCACACCAAATTC 3' Länge des Amplifikates: bp</p>
<p>Kollagen V (Quiagen) Primer <i>forward</i> (10 nmol/μL) Sequenz: 5' GATTGAGCAGATGAAACGGCC 3' Primer <i>reverse</i> (10 nmol/μL) Sequenz: 5' CCTTGGTTAGGATCGACCCAG 3' Länge des Amplifikates: 120 bp</p>
<p>Decorin (Quiagen) Primer <i>forward</i> (10 nmol/μL) Sequenz: 5' TGATGCAGCTAGCCTGAAAGG 3' Primer <i>reverse</i> (10 nmol/μL) Sequenz: 5' AGGCGTGTTGGCCAGAGAG 3' Länge des Amplifikates: 101 bp</p>
<p>Biglykan (Quiagen) Primer <i>forward</i> (10 nmol/μL) Sequenz: 5' GCCAAGCTGACTGGCATCC 3' Primer <i>reverse</i> (10 nmol/μL) Sequenz: 5' AGTAGCGAAGCAGGTCCTCCA 3' Länge des Amplifikates: 106 bp</p>
<p>Versican (Quiagen) Primer <i>forward</i> (10 nmol/μL) Sequenz: 5' GTGGAAGGCACGGCAATCTA 3' Primer <i>reverse</i> (10 nmol/μL) Sequenz: 5' TCTCCGCTGTATCCTGGCAC 3' Länge des Amplifikates: 128 bp</p>
<p>Perlecan (Quiagen) Primer <i>forward</i> (10 nmol/μL) Seq: 5' TGTGTCGAGATGGAATCAAAGGA 3' Primer <i>reverse</i> (10 nmol/μL) Sequenz: 5' GTCGGACTCTGCTATGCCATGT 3' Länge des Amplifikates: 174 bp</p>
<p>Syndecan1 Primer <i>forward</i> (10 nmol/μL) Sequenz: 5' ACAACTTCTCCGGCTCAGG3' Primer <i>reverse</i> (10 nmol/μL) Sequenz: 5' CACTTCTGGCAGGACTACAGC 3' Länge des Amplifikates: 206 bp</p>
<p>Syndecan 2 Primer <i>forward</i> (10 nmol/μL) Sequenz: 5' GGAGTCGAGAGCAGAGCTGA 3' Primer <i>reverse</i> (10 nmol/μL) Sequenz: 5' TGGAGCAGCACTAGTCAACA 3' Länge des Amplifikates: 199 bp</p>
<p>Syndecan 3 Primer <i>forward</i> (10 nmol/μL) Seq: 5' AATCATCTAGACACTGCAACCTCTT 3' Primer <i>reverse</i> (10 nmol/μL) Seq: 5' GTGTTCTGTGATATGTCTTGATTGG 3' Länge des Amplifikates: 382 bp</p>
<p>Syndecan 4 Primer <i>forward</i> (10 nmol/μL) Seq: 5' GTCTGGCTCTGGAGATCTGG 3' Primer <i>reverse</i> (10 nmol/μL) Seq: 5' CACCTTGTTGGACACATCCT 3' Länge des Amplifikates: 208 bp</p>

Die grundlegende Vorgehensweise für die Vorbereitung einer Polymerase Chain Reaction (PCR) begann mit der Herstellung des Mastermixes auf Eis. Dieser bestand aus 10-fach Puffer, dNTP's, Primer *forward*, Primer *reverse* (bzw. Primerpair), Hot Star Taq-Polymerase und wurde mit autoklaviertem destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 23 μL aufgefüllt. Zuletzt

wurden 2 μL der gewonnenen cDNA hinzupipettiert. Die anteiligen Volumina und Konzentrationen der jeweiligen Komponenten in einem PCR-Ansatz sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5 Mastermixzusammensetzung

Taq-Polymerase(5 U/ μL)	0,125 μL
cDNA	2 μL
Autokl. dest. H_2O	15,88 μL
10x Puffer	2,5 μL
dNTP's (2 mM)	2,5 μL
Primer <i>forward</i> (10 μM)	1 μL
Primer <i>reverse</i> (10 μM)	1 μL
(Primerpair (7,5 μM))	2 μL
Gesamtvolumen	25 μL

Waren alle erforderlichen Reaktionselemente im Gefäß vereint, wurden diese durch Vortexen gründlich gemischt und in den Eppendorf Mastercycler überführt, in dem die zyklische Ansteuerung der für Denaturierung, Annealing und Elongation geeigneten Temperaturen in einer für jeden Primer separat optimierten Weise stattfand (Tabelle 6). Vor dem Beginn der eigentlichen Amplifikationszyklen sorgte eine vorgeschaltete Denaturierungsphase für den gleichmäßigen Schmelzzustand aller Proben zum Reaktionsstart. Nach dem ersten Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsschritt wurden diese drei Phasen gemäß den Angaben der Tabelle mehrfach wiederholt, ehe eine zehnminütige Periode im Bereich des Temperaturoptimums der Taq-Polymerase bei 72 °C dem Enzym ermöglichte, die im Laufe der PCR eventuell nicht vollständig verlängerten Stränge zu ergänzen. Mit diesem Schritt wurde die PCR-Reaktion beendet, die Amplifikate wurden automatisch auf 4 °C abgekühlt und konnten aus dem Mastercycler entnommen werden bzw. bis zum Auftrag auf ein Agarosegel bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 6 Ablauf einer PCR hinsichtlich Temperaturfolge und Dauer der Einzelschritte zur Amplifikation der verschiedenen verwendeten Primer (Col= Kollagen I, III, V; ECM= Biglykan, Versican, Perlecan, Decorin; bFGF=basic Fibroblast Growth Factor; Syn= Syndecan 1,2,3,4; TGF- β_1 = Transforming Growth Factor β_1)

Einzelschritt / Primer	Col, ECM, bFGF	Syn	TGF- β_1
1. initiale Denaturierung	94 °C, 4 min	94 °C, 4 min	94 °C, 4 min
2. Denaturierung	94 °C, 45 sec	94 °C, 45 sec	94 °C, 45 sec
3. Annealing	60 °C, 45 sec	59 °C, 45 sec	55 °C, 45 sec
4. Elongation	72 °C, 45 sec	72 °C, 45 sec	72 °C, 45 sec
Rücksprünge (ad 2.)	34	39	34
5. Schlußschritt	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min
6. Kühlen	4 °C	4 °C	4 °C

3.7.4 cDNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld. Agarose besteht aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose und dient als interne Matrix, in dem DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückrad der DNA zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der Molekülgröße, der Konformation der DNA, der Agarosekonzentration und der angelegten Gleichspannung. Lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente bewegen sich im Agarosegel indirekt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Die bei der Agarosegelelektrophorese eingesetzte Agarosekonzentration ist abhängig von dem DNA-Molekulargewichtsbereich, in dem eine effektive Auftrennung der Fragmente erfolgen soll.

3.7.4.1 Herstellung eines 2 %igen Agarosegels

Für die Herstellung einer 2 % Agaroselösung wurden 3 g Seakem-LE-Agarose (Biozym) in 150 mL TAE Puffer (einfach) gelöst und durchmischt. Die Agarosegellösung wurde in der Mikrowelle aufgekocht, bis alle Schlieren verschwunden waren. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur bis auf ca. 60 °C unter stetigem Rühren (Rührfisch) abgekühlt und anschließend, mit 9 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL) versetzt, luftblasenfrei in einen vorbereiteten Gelträger mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels (ca. 30-45 min) konnte der Kamm vorsichtig herausgezogen werden. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer mit 1 l TAE-Laufpuffer (einfach) eingesetzt und vollständig mit Puffer überschichtet. Die Taschen mussten an der negativen Elektrode der Kammer zu liegen kommen, weil die DNA durch die negativ geladenen Phosphatreste zur positiv geladenen Anode wandern.

3.7.4.2 Elektrophorese

Zunächst wurde der Farbmarker, je nach PCR-Produkt mit oder ohne Bromphenolblau (BPB) bzw. Xylencyanol (XC) in einer Konzentration von 0,05 % bis 0,25 %, zu den DNA-Proben aus der PCR zum Abschätzen der bereits gelaufenen Strecke im Gel hinzu gegeben. Der DNA-Leiter (Generuler™ 50 bp DNA Ladder; 0,1 mg DNA/mL; MBI Fermentas) enthielt bereits einen Farbmarker. Der DNA-Leiter und die Proben wurden mit einer Pipette in die Geltaschen pipettiert (je nach Größe der Taschen von 6 µL bis zu 9 µL Ladevolumen). In der Elektrophoresekammer (Pharmacia Biotech Powersupply ESP 300) wurde nun bei 120-140 Volt (die Stromstärke sollte hierbei unter 100 mA liegen) ein elektrisches Feld erzeugt, durch das die Proben in die Gelmatrix diffundierten. Kleine DNA-Fragmente wanderten schnell, große langsam durch das Gel. Die DNA war währenddessen nicht sichtbar. Daher wurde der Fortschritt an der Farbfront abgelesen, die sich schneller als kleinste DNA-Fragmente durch das Gel bewegte. Hatte die Farbfront das Ende des Gels erreicht, war die elektrophoretische Auftrennung der Proben komplett (in Abhängigkeit von der Probe nach 45-90 Minuten).

3.7.4.3 Fotografieren des Agarosegels

Während der Elektrophorese kam es zur Interkalierung des Ethidiumbromids in die DNA. Da das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid unter UV-Licht fluoresziert und so die DNA-Banden sichtbar wurden, wurde das Gel in eine Weißlicht/UV-Kammer gelegt und zunächst unter Weißlicht das Bild des Gels auf dem Monitor auf die passende Größe, Schärfe und Helligkeit eingestellt. Anschließend wurde die Kamera unter UV-Licht nachgestellt und das Gel mit einer Polaroid-Kamera unter Verwendung eines Polaroid-professional 665-Films fotografiert.

3.7.4.4 Densitometrische Auswertung des Agarosegelfotos

Die Densitometrie ist die quantitative Messung der Farbdichte, i.e. der Farbmenge pro Flächeneinheit. Die Densitometrie basiert auf der Linearität zwischen Farbmenge und optischer Dichte. Je mehr Farbe, desto weniger Licht wird reflektiert. Mit Hilfe der Auswertungssoftware AlphaEase™ FC war es möglich, das IDV (Integrated Density Value) der DNA-Banden des Agarosegelfotos zu bestimmen und diese so einer vergleichenden statistischen Auswertung zugänglich zu machen. Dadurch war eine Aussage über die quantitative Menge der vorhandenen spezifischen mRNA in verschiedenen Proben möglich.

3.8. Statistische Analyse

Die im folgenden Abschnitt 4 aufgeführten Ergebnisse wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen ermittelt. Die statistische Signifikanz wurde durch die Durchführung der Teststatistik eines gepaarten Student'schen t-Tests beurteilt. Ein p-wert $< 0,05$ gilt als statistisch signifikant.

4.0 Ergebnisse

4.1 Wachstum und Teilung kultivierter arterieller SMCs unter dem Einfluss von Lovastatin

Die Zellproliferation und -morphologie wurden auf Basis der [³H]Thymidininkorporation, der Zellzählung, der Proteinsynthese, des mittleren Zelldurchmessers, des mittleren Zellvolumens und der mikroskopischen Beurteilung der vaskulären SMCs festgestellt. Der Grad der Inhibition durch Lovastatin wurde aufgrund folgender Grundlage berechnet:

$$\% \text{ Inhibition} = (100/\text{Nettowachstum der Kontrolle}) * \text{Nettowachstum in Anwesenheit des Inhibitors}$$

Das Nettowachstum der Kontrollkultur und der mit Lovastatin behandelten Zellen wurde ermittelt, indem die Anfangs- von der Endzellzahl subtrahiert wurde. Lovastatin zeigte dosis- und zeitabhängig antiproliferative Effekte auf humane vaskuläre SMCs und führte zu einem hypertrophen Phänotyp dieser Zellen. Nach einer Inkubation von 48 h lag die Reduktion der Zellzahl bei durchschnittlich 64 % (p= 0,00007) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen (100 %) (Abbildung 15). Subkonfluente SMC-Monolayer, die sich nach der Aussaat und vor der Lovastatinzugabe 48 h in Zellkultur befanden, sprachen weniger sensitiv auf eine 1.0 µM Lovastatinbehandlung an als weniger konfluente Kulturen, die nur 24 h Anwachszeit hatten.

Dieser Lovastatin-bedingte antiproliferative Effekt war mit einer Erhöhung des zellulären Gesamtproteingehalts assoziiert, der um durchschnittlich 39% (p= 0,00001) erhöht war. Diese Ergebnisse werden durch die mikroskopischen Beobachtungen verstärkt, da humane SMCs unter Lovastatineinfluss hypertrophieren. Ausdruck dieser konzentrationsabhängigen Hypertrophie ist neben dem Anstieg des Gesamtproteingehalts pro Zelle (Abbildung 9) die sowohl messbare als auch unter dem normalen Lichtmikroskop beobachtbare Zunahme des mittleren

Zelldurchmessers (Abbildung 11) und des mittleren Zellvolumens (Abbildung 12).

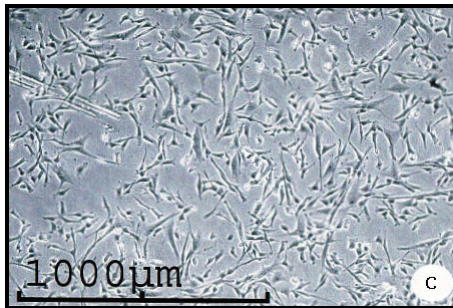


Abb. 8 A Kontrolle (5fach)

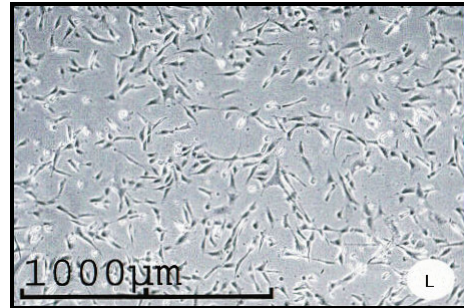


Abb. 8 B Lovastatin (5fach)

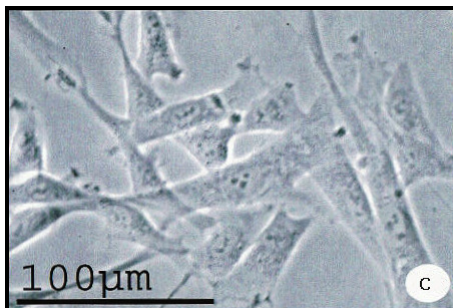


Abb. 8 C Kontrolle (40fach)

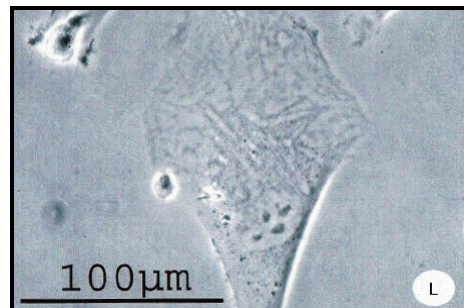


Abb. 8 D Lovastatin (40fach)

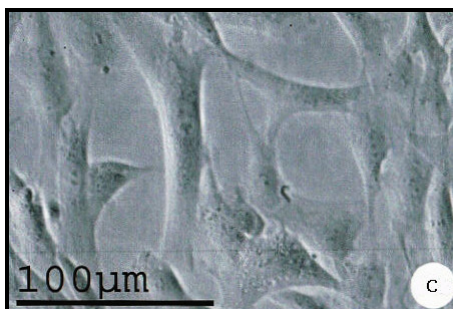


Abb. 8 E Kontrolle (40fach)



Abb. 8 F Lovastatin (40 fach)

Abbildungen 8 A-F Humane vaskuläre SMC-Zellkulturen nach Inkubation in Gegenwart oder Abwesenheit (Kontrolle) von 1 μM Lovastatin für 48 h; lichtmikroskopische Vergrößerung: 5fach bzw. 40fach.

Die Abbildungen 8 A, C und E der Kontrollkulturen zeigen typische längliche humane SMCs, die einen konfluenten Monolayer mit typischem „hill and

valley“ Wachstumsmuster formen, wohingegen antiproliferative Statineffekte in den Abbildungen 8 B, D und F bei geringer Vergrößerung durch eine signifikant geringere Zelldichte bzw. Zellzahl sichtbar sind. Bei stärkerer Vergrößerung wird die hypertrophe Wirkung auf die Zellabmessungen deutlich. Beispielsweise sind die Zellkerne der SMCs in den Abbildungen 8 D und F im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 8 C und E) stark vergrößert. Diese morphometrischen Veränderungen waren auch konzentrations- und zeitabhängig (nicht gezeigt).

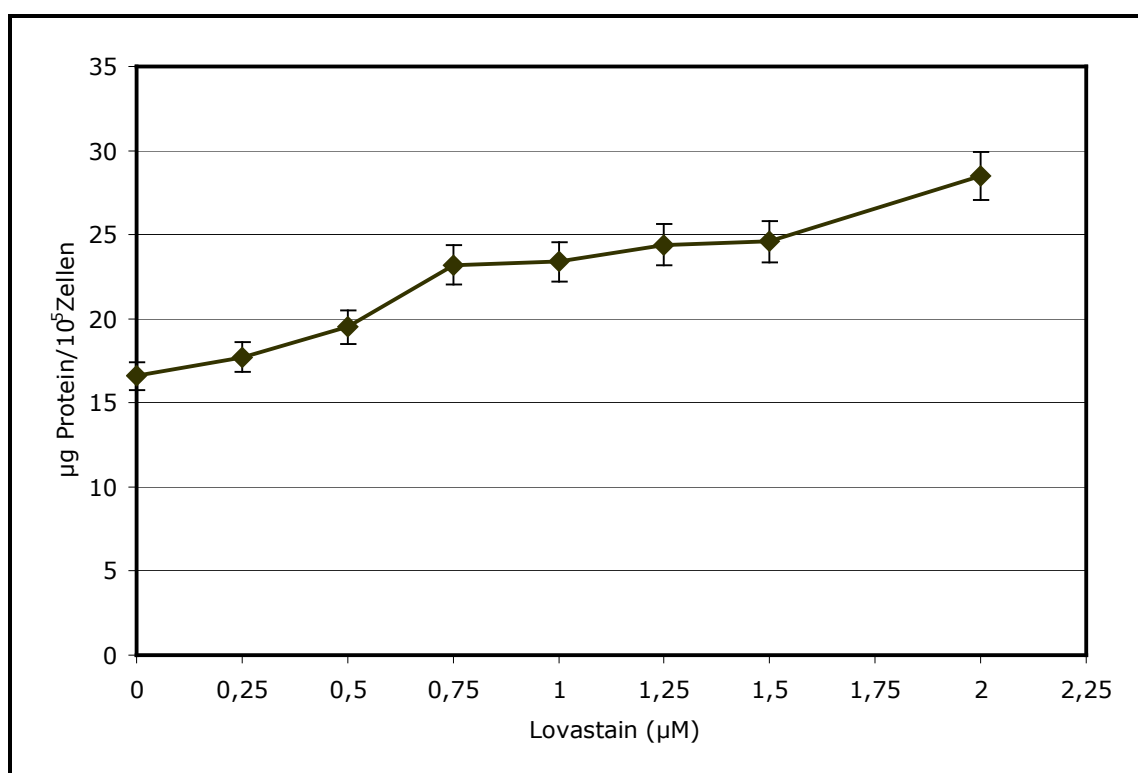


Abbildung 9 Dosisabhängige Veränderungen des Proteingehaltes vaskulärer SMCs nach 48 h Inkubation in Gegenwart von Lovastatin.

75000 Zellen wurden in 35 mm Ø Petrischalen in Medium 231 ausgesät und nach 48 h für weitere 48 h mit verschiedenen Lovastatinkonzentrationen (0.25-2.0 µM) inkubiert. Der Proteingehalt der Zellen wurde nach Lowry bestimmt und parallel dazu die Zellzahl. Der Proteingehalt/100000 der Zellen wurde bei einer Lovastatinkonzentration von 1.0 µM durchschnittlich um 39 % ($p = 0,00001$) von 19,1 µg/100000 Zellen auf 26,5 µg/100000 Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kulturen gesteigert (Abbildung 9). Je

stärker die Lovostatinkonzentration gesteigert wurde, desto mehr erhöhte sich auch der Proteingehalt pro Zelle.

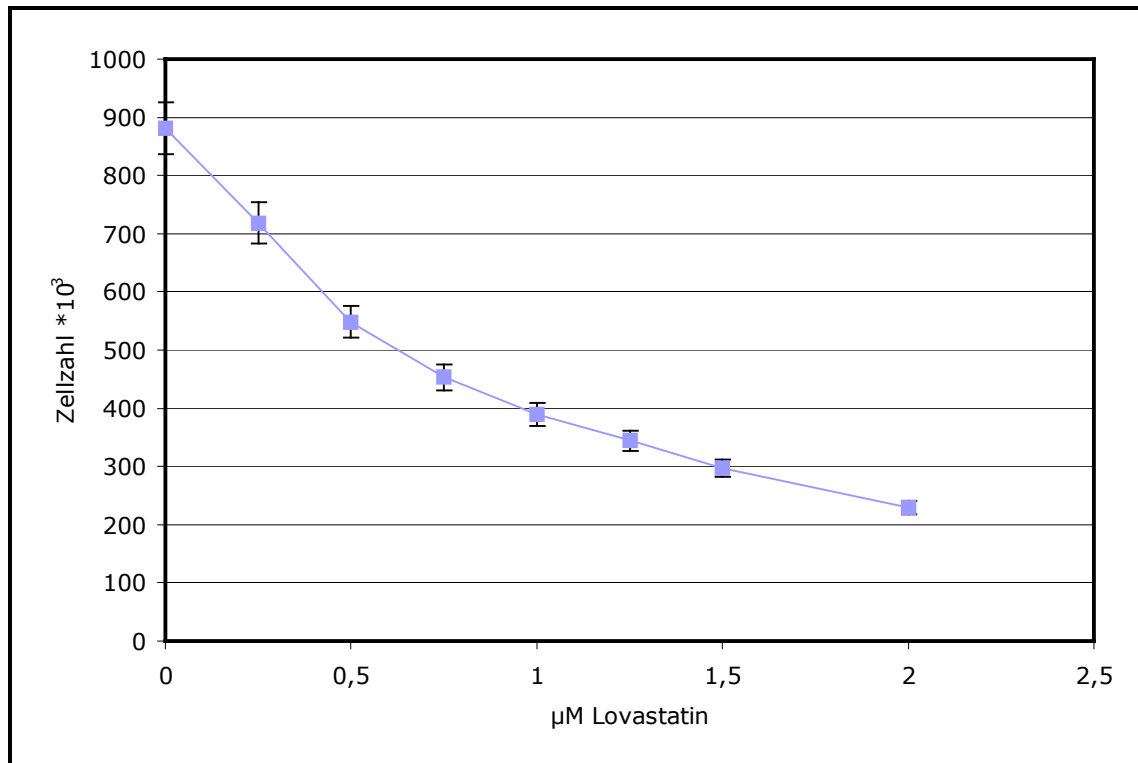


Abbildung 10 Konzentrationsabhängigkeit der Zellzahl humaner SMCs von der Lovostatinkonzentration.

Die Zellzahl nahm proportional zur Erhöhung der Lovostatinkonzentration ab (Abbildung 10). Bei einer Konzentration von 1.0 µM lag die Inhibition bei durchschnittlich 64 % ($p = 0,00007$). Bei dieser Lovostatinkonzentration nahm die Zellzahl im Durchschnitt von 557000 auf 201000 Zellen/Zellkulturschale ab. Bei höheren Lovostatinkonzentrationen (2.0 µM) war häufiger die Abrundung und Ablösung der vaskulären SMCs von der Kulturschale unter dem Mikroskop, als Zeichen einer erhöhten Apoptoserate, zu beobachten (Abbildung 15).

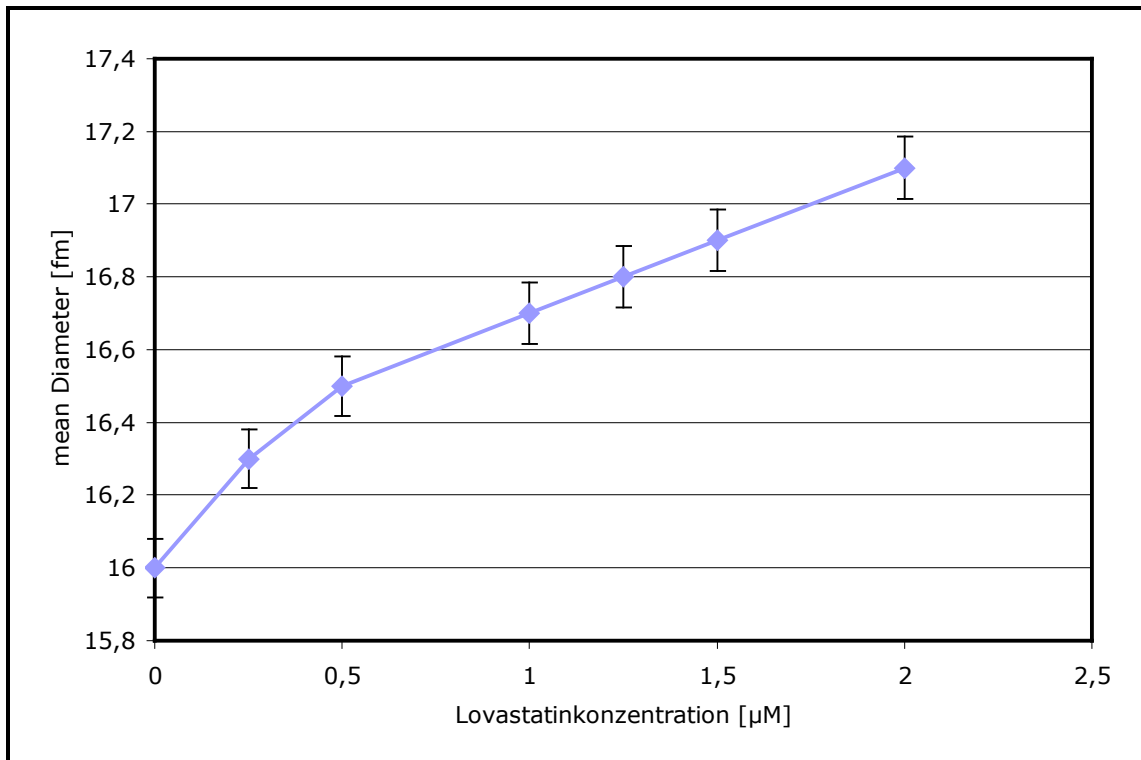


Abbildung 11 Einfluss von Lovastatin auf den mittleren Zelldurchmesser humaner koronarer arterieller glatter Muskelzellen.

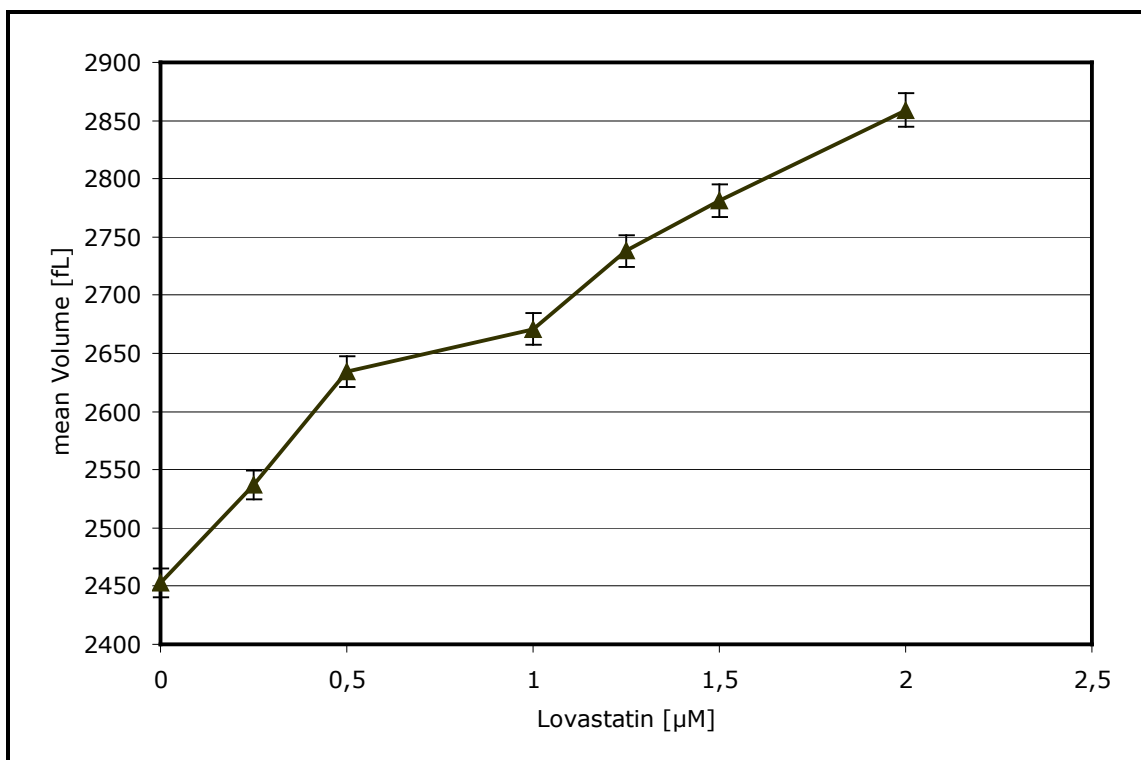


Abbildung 12 Einfluss verschiedener Lovastatinkonzentrationen auf das mittlere Zellvolumen humaner SMCs.

Wie die Abbildungen 11 und 12 zeigen, führte die Anwesenheit von Lovastatin konzentrationsabhängig zu einer hochsignifikanten Zunahme des mittleren Zelldurchmessers um 7% ($p < 0,00001$) von durchschnittlich 15,8 fm auf 16,9 fm und des mittleren Zellvolumens um 21 % ($p < 0,00001$) von 2367 fL auf 2874 fL humaner kultivierter vaskulärer SMCs.

4.1.1 Lovastatin-abhängige [³H]Thymidineinbaurate

Die DNA-Synthese der humanen vaskulären SMCs unter Einfluss von 1.0 μ M Lovastatin wurde durch die Bestimmung der [³H]Thymidineinbaurate im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt. 50000 Zellen wurden in 35 mm \varnothing Petrischalen in Medium 231 ausgesät und nach 24 h mit 1.0 μ M Lovastatin inkubiert. Den Zellkulturen wurde für 8 h vor der Lovastatinzugabe 1 μ Ci/mL Tritiummarkiertes Thymidin ins Medium gegeben. Alle 24 h wurden mit dem gleichen zeitlichen Abstand Mediumwechsel, Lovastatinzugabe und [³H]Thymidinmarkierung wiederholt. Die Bestimmung der [³H]Thymidininkorporation in die DNA erfolgte nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h. Die Hemmung der [³H]Thymidininkorporation um 78% bereits nach einer Einwirkzeit von 24h ist Ausdruck der Lovastatin-assoziierten Verminderung der DNA-Synthese. In der Kontrollkultur nahm der [³H]Thymidineinbau nach einer Einwirkzeit von 96 h ab, da die unbehandelten Zellkulturen volle Konfluenz erreicht hatten.

Die Inhibition der DNA-Synthese durch Lovastatin war, wie Abbildung 13 zu entnehmen ist, reversibel. Als nach 48 h Inkubation der Zellen das mit 1.0 μ M Lovastatin versetzte Kulturmedium durch Standardmedium ersetzt wurde, nachdem der Zellrasen zweimal mit 3 mL PBS gewaschen wurde, nahm die [³H]Thymidineinbaurate in die DNA und damit die DNA Synthese annähernd normale Werte an.

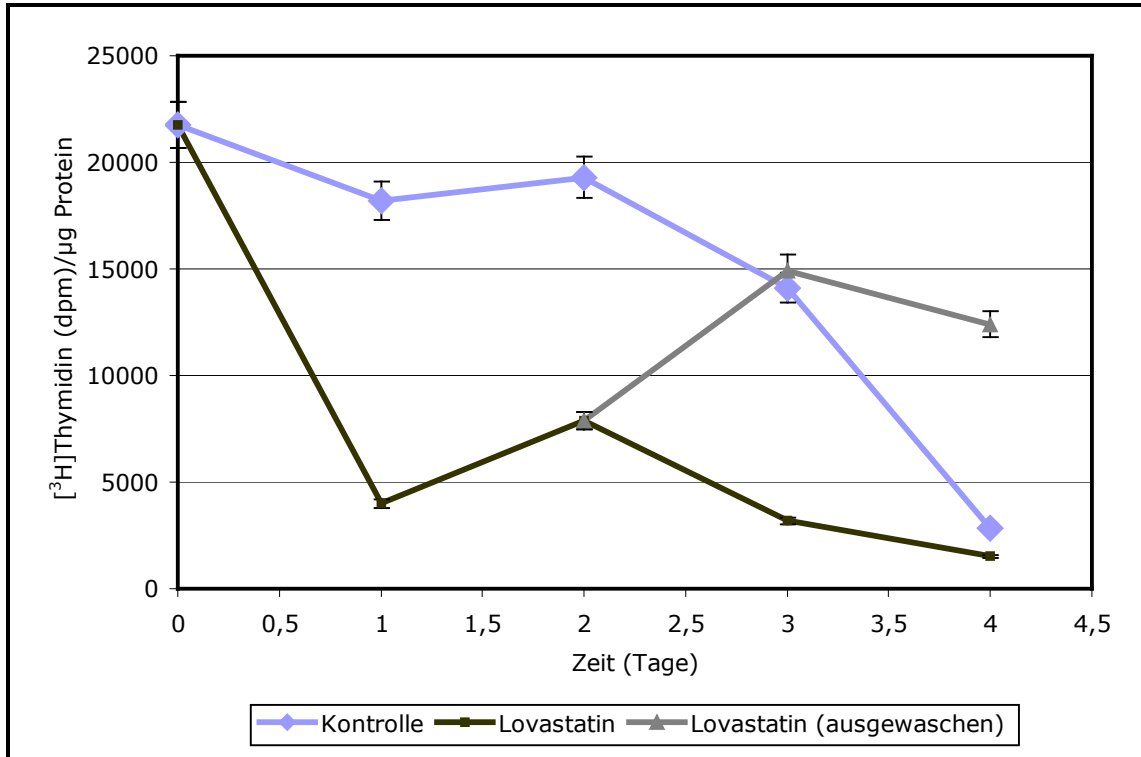


Abbildung 13 Lovastatin-abhängige Veränderungen der [³H]Thymidineinbaurate humaner SMCs bezogen auf den Proteingehalt; $t_0=48h$ nach Aussaat der Zellen.

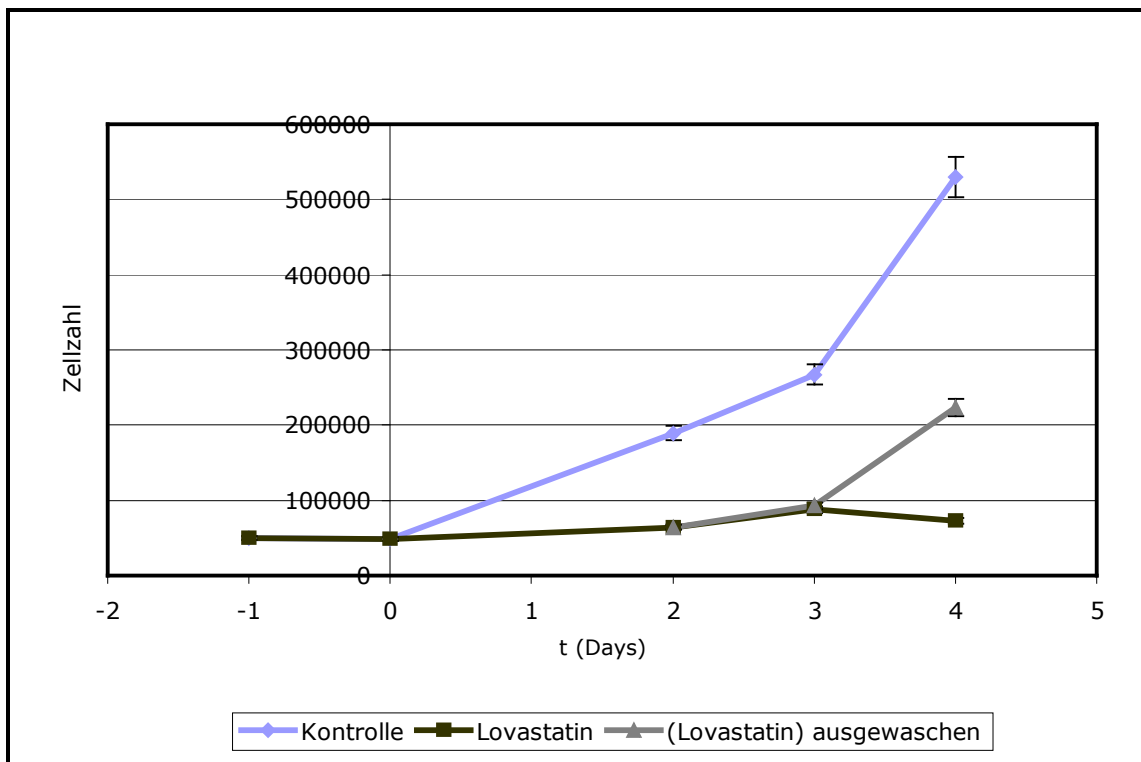


Abbildung 14 Reversibilität der Lovastatinwirkung auf die Zellzahl humaner SMCs.

Der antiproliferative Effekt von Lovastatin auf die Zellteilung humaner vaskulärer SMCs war analog zur verminderten [³H]Thymidininkorporation, wie in Abbildung 14 dargestellt ist, auch reversibel. Nachdem Zellen das mit 1.0 µM Lovastatin versetzte Kulturmedium nach 48 h Inkubation durch Standardmedium ersetzt wurde, stieg die Zellzahl wieder an, so dass nach zwei Tagen ein Anstieg des Wachstums auf 160000 Zellen zu verzeichnen war. Bei der Kontrollzellkultur lag das Nettowachstum in dem vergleichbaren Zeitraum von 24 h bei einem Wert von 141000 Zellen.

4.1.2 Cell-Death-Detection in Abhängigkeit von Lovastatin

Die in den Experimenten eingesetzten Zelllinien zeigten bei einer Lovastatinkonzentration von 1.0 µM unter mikroskopischer Beurteilung keine Anzeichen zytotoxischer Effekte. Bei höheren Konzentrationen wurde die Überlebensfähigkeit der SMCs auf eine dosis- und zeitabhängige Weise beeinträchtigt. Charakteristisches bei höheren Lovastatinkonzentrationen (2.0 µM) beobachtbares mikroskopisches Merkmal der Zytotoxizität war die Abrundung und Ablösung der vaskulären SMCs von der Kulturschale. Intrazelluläre Effekte wie die Freisetzung zytoplasmatischer Histon-assoziiierter-DNA-Fragmente konnten durch den Cell Death Detection Elisa^{PLUS} erfasst werden.

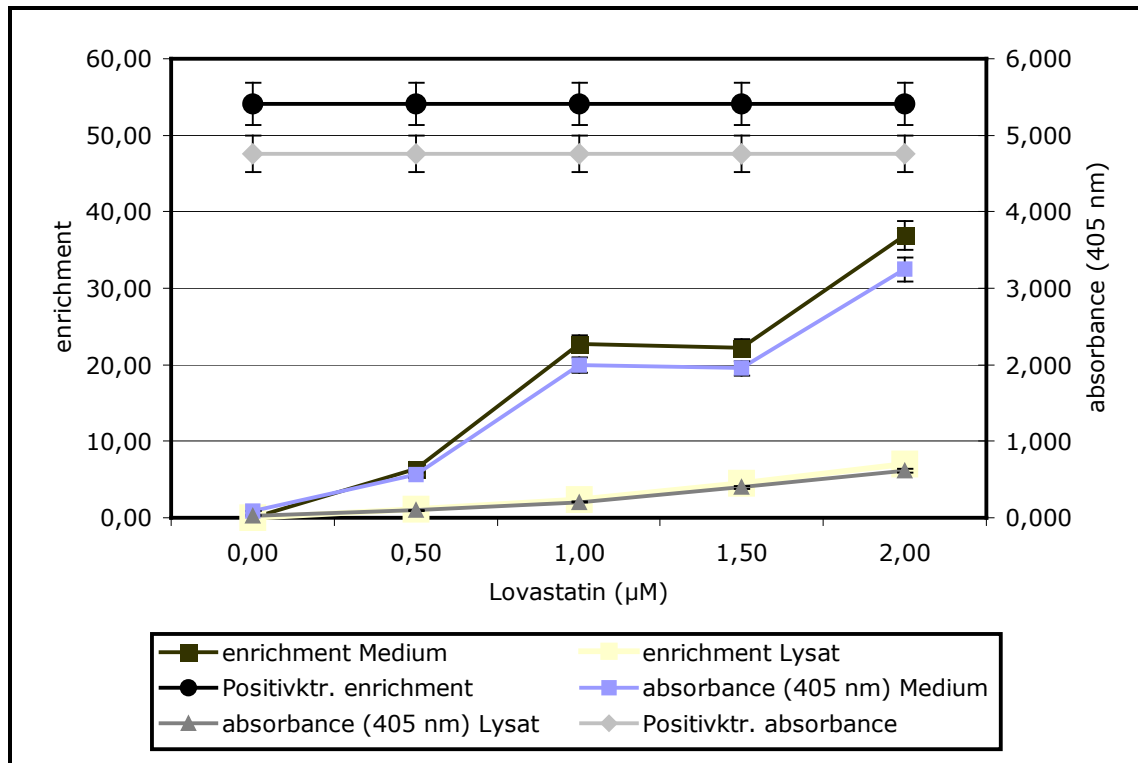


Abbildung 15 Zytotoxisches Potential verschiedener Lovastatinkonzentrationen auf Zellkulturen humaner SMCs.

Bei höheren Lovastatinkonzentrationen sind im Medium und Zelllysat vermehrt zytoplasmatische Mono- und Oligonukleosomen nachweisbar. In den unbehandelten Kontrollkulturen, die zum Vergleich der Lovastatin-assoziierten Zytotoxizität herangezogen wurden, lag der Absorbance- bzw. Enrichmentfaktor sowohl im Zellkulturmedium als auch im Zelllysat unterhalb der Nachweisgrenze. Abbildung 15 ist zu entnehmen, dass in Abhängigkeit der Lovastatinkonzentration der Absorbance und Enrichmentfaktor im Zelllysat leicht linear ansteigt. Im Kulturmedium ist dieser Anstieg stärker, liegt aber bei einer Lovastatinkonzentration von 2.0 µM noch weit unterhalb der vom Hersteller gelieferten Positivkontrollen des Absorbance- und Enrichmentfaktors. Das zytotoxische Potential der in den Experimenten eingesetzten Lovastatinkonzentration von 1.0 µM ist als sehr gering einzustufen.

4.2 Lovastatin-assoziierte Überexpression von TGF- β_1 und bFGF

4.2.1 Transforming Growth Factor β_1 (TGF- β_1)

Der Wachstumsfaktor TGF- β_1 wird von kultivierten glatten Muskelzellen unter Standardbedingungen in nur geringen Konzentrationen exprimiert. Eine Stimulation mit 1.0 μM Lovastatin führt dosisabhängig (Abbildung 16) nach einer Inkubation von 48 h zu einer Hochregulation dieses Wachstumsfaktors, der sich im Wesentlichen auf drei Kompartimente verteilt.

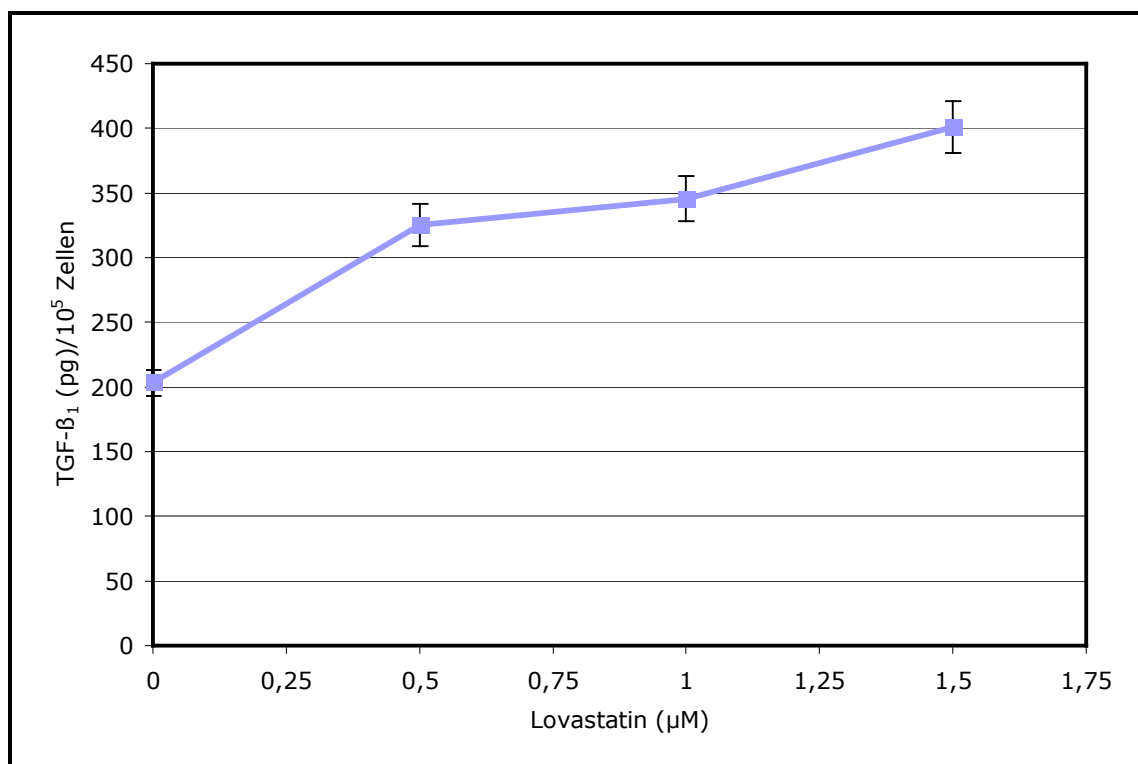


Abbildung 16 Änderungen der TGF- β_1 Konzentration pro 10^5 Zellen im Medium humaner SMCs in Abhängigkeit von Lovastatin.

Im Zellkulturmedium erhöhte sich der TGF- β_1 Gehalt auf den 2-4 fachen Wert bezogen auf den Proteingehalt (Abbildung 19) und gemessen an der Zellzahl (Abbildung 18). Der verbliebene Teil des überexprimierten TGF- β_1 ist überwiegend in der zellfreien subzellulären Matrix zu finden, die durch Lyse der Zellen freigelegt und so für die Analyse mit Antikörpern in einem

hochspezifischen Enzymimmunsystem (ELISA) vorbereitet wurde. Der Anstieg im Peri- und Intrazellulärraum war nicht signifikant.

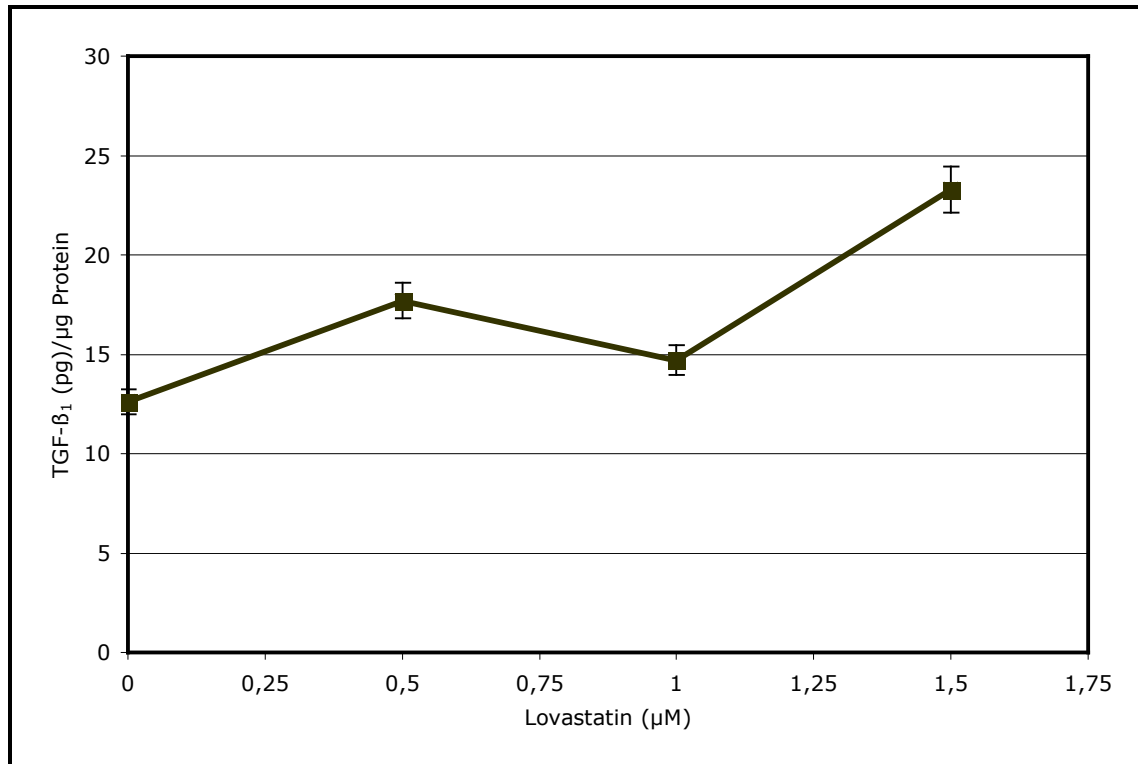


Abbildung 17 Veränderungen der TGF-β₁ Konzentration/ Protein (μg) im Medium humaner SMCs unter Lovastatineinfluss.

Mit steigender Lovastatinkonzentration im Zellkulturmedium nahm auch die TGF-β₁ Konzentration zu. Es wurden 75000 Zellen in 35 mm Ø Petrischalen in Medium 231 ausgesät und nach 48 h für weitere 48 h mit verschiedenen Lovastatinkonzentrationen (0.25-2.0 μM) inkubiert. In Parallelkulturen wurden der Proteingehalt der Zellen nach Lowry sowie die Zellzahl bestimmt. Die TGF-β₁ Konzentration war sowohl bezogen auf die Zellzahl als auch auf den Gesamtproteingehalt der Zellen proportional zur Lovastatinkonzentration (Abbildungen 16 und 17).

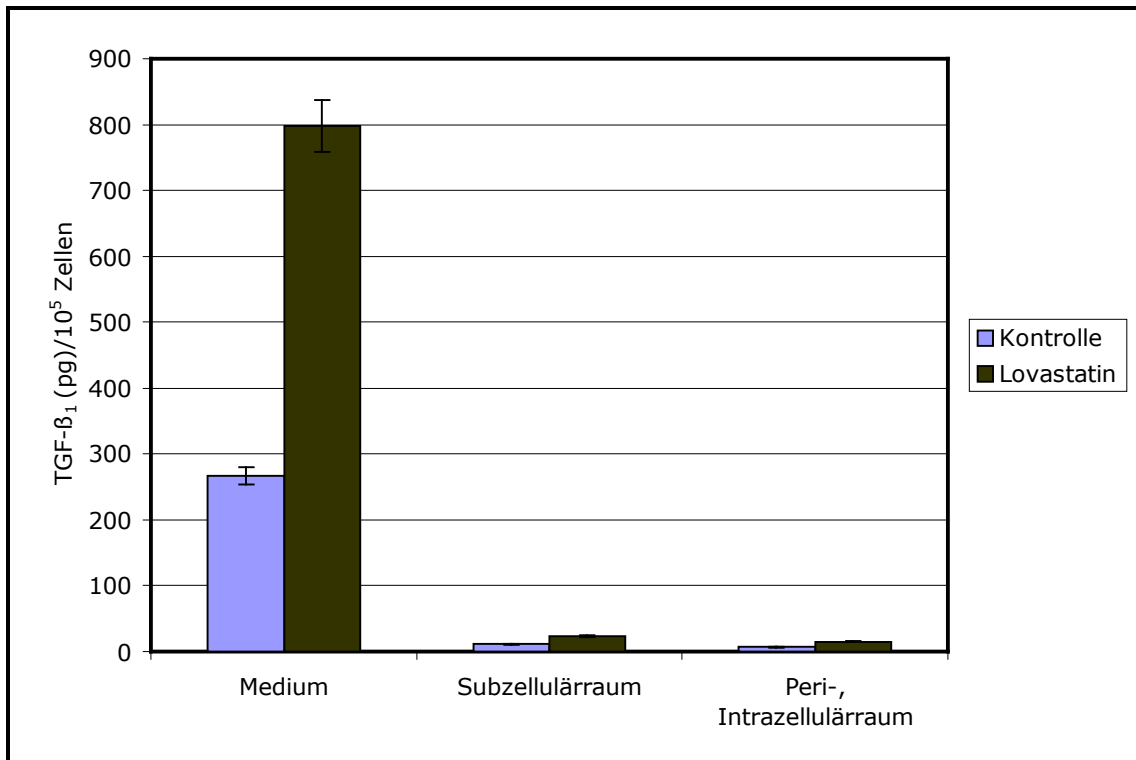


Abbildung 18 TGF-β₁ Konzentration/ 10⁵ Zellen in verschiedenen Zellkompartimenten unter dem Einfluss von Lovastatin (1.0 μM) für 48 h.

Die TGF-β₁ Konzentration im Zellkulturmedium/100000 Zellen wurde bei einer in den Experimenten vorwiegend verwendeten Konzentration von 1.0 μM Lovastatin im Vergleich zu unbehandelten Kulturen um durchschnittlich 199% (p= 0,03) statistisch signifikant gesteigert.

Im Subzellulärraum führte eine Lovastatinbehandlung zu einer signifikanten Stimulation der TGF-β₁ Expression um 104 % (p= 0,02). Im Peri- und Intrazellulärraum erhöhte sich die TGF-β₁ Konzentration im Vergleich zu Kontrollkulturen um 116 % (p= 0,16), wobei jedoch keine statistische Signifikanz nachweisbar war.

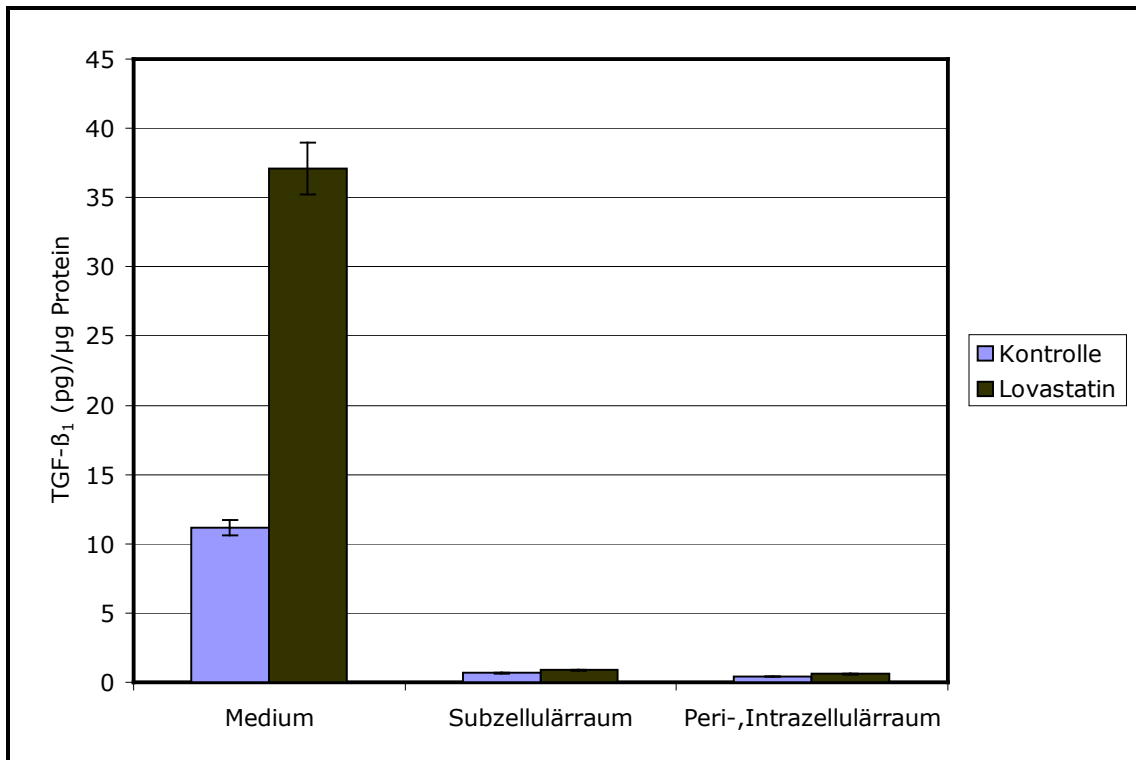


Abbildung 19 Lovastatinabhängigkeit (1.0 μM) der TGF- β_1 Konzentration bezogen auf den Proteingehalt vaskulärer SMCs in unterschiedlichen Kompartimenten.

Im Medium konnte bezogen auf den Gesamtproteingehalt eine Lovastatin assoziierte Steigerung der TGF- β_1 Expression um 232 % ($p= 0,03$), im Subzellulärraum um 28 % ($p= 0,06$) und im Peri- und Intrazellulärraum um 39 % ($p= 0,17$) festgestellt werden.

Die Lovastatinbehandlung der vaskulären glatten Muskelzellen war mit einer erhöhten Transkription der TGF- β_1 -Gene und einer entsprechenden Erhöhung der TGF- β_1 spezifischen mRNA, die nach Translation die beobachtete Mehrsynthese von TGF- β_1 herbeiführt, verbunden.

Die Gesamt-RNA wurde aus den mit oder ohne 1.0 μM Lovastatin behandelten SMC-Kulturen isoliert und durch die Agarosegelelektrophorese der cDNA, die zuvor durch RT und PCR mittels TGF- β_1 spezifischer Oligonukleotidprimer gewonnen wurde, sichtbar gemacht. Auf dem Agarosegel (Abbildung 20) sieht man im Vergleich zu den abgeschwächten Kontrollen (C) stärkere Banden der mRNA Lovastatinbehandelter Zellen (L)

in drei verschiedenen unabhängigen Versuchen. Die vom Hersteller mitgelieferte Positivkontrolle ist mit P gekennzeichnet. Die rein optischen Ergebnisse wurden durch eine Densitometrische Analyse verifiziert und bestätigen eine statistisch signifikante Steigerung der TGF- β_1 spezifischen mRNA um 29 % ($p= 0,04$) (Abbildung 33).

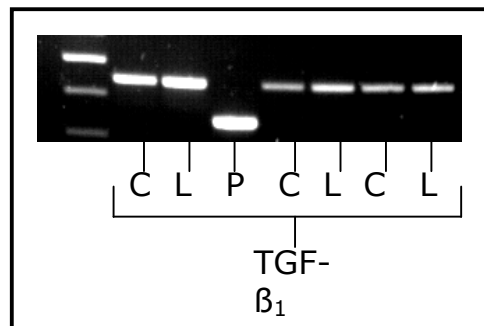


Abbildung 20 Agargelelektrophorese der cDNA von Transforming Growth Factor β_1 . Die Gesamt-RNA der Zellen wurde nach Umschreiben in cDNA in Gegenwart der korrespondierenden Primer einer RT unterworfen; C, Kontrolle; L, Lovastatin-vorbehandelte Zellen; P, Positivkontrolle.

Tabelle 7 IDV von TGF- β_1

	n	Kontrolle \pm STDEV	Lovastatin \pm STDEV	p-Wert
TGF β_1	3	28,6 \pm 9,8	36,9 \pm 10,0	0,04

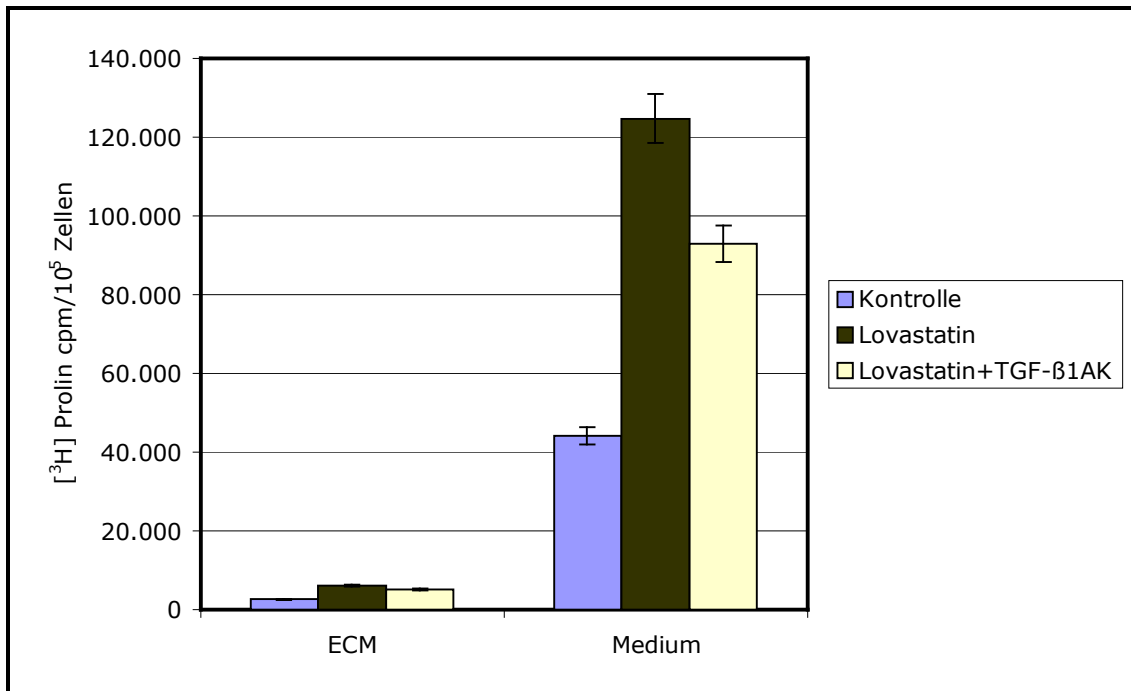


Abbildung 21 neutralisierender Effekt monoklonaler anti-humaner TGF-β₁ Antikörper auf die [³H]Prolin Inkorporation unter Einfluss von Lovastatin.

50000 humane SMCs wurden in 35 mm Ø Petrischalen in Medium 231 für 24 h kultiviert. Kurz vor der Lovastatinzugabe von 1.0 μM wurde das Medium mit 10 μg/10⁵ Zellen monoklonalen anti-humanen TGF-β₁ Antikörpern versetzt. Die Zugabe des TGF-β₁ Antikörpers wurde nach Ablauf von 24h wiederholt. Die Aktivität von TGF-β₁, die anhand der [³H]Prolin Inkorporation in die Extrazelluläre Matrix und das Medium humaner SMCs gemessen wurde, konnte nur zum Teil neutralisiert werden (Abnahme um 40 % (ECM) bzw. 70 % (Medium) im Vergleich zu Lovastatinkulturen ohne Antikörper), nahm aber nicht die Werte der Kontrollkulturen an (um 90 % (ECM) bzw. 110 % (Medium) höhere [³H]Prolin Inkorporation als unbehandelte Zellen). Somit können Statineffekte wie die erhöhte Synthese Extrazellulärer Matrixproteine wie Kollagene oder der Lovastatin-bedingte antiproliferative Effekt, der mit einer Erhöhung des zellulären Gesamtproteingehalts (Abbildung 22), einer Zunahme des mittleren Zelldurchmessers sowie Zellvolumens und einer Inhibition des Gesamtzellwachstums (Abbildung 23) assoziiert ist, nur zum Teil durch eine erhöhte TGF-β₁ Expression durch SMCs erklärt werden.

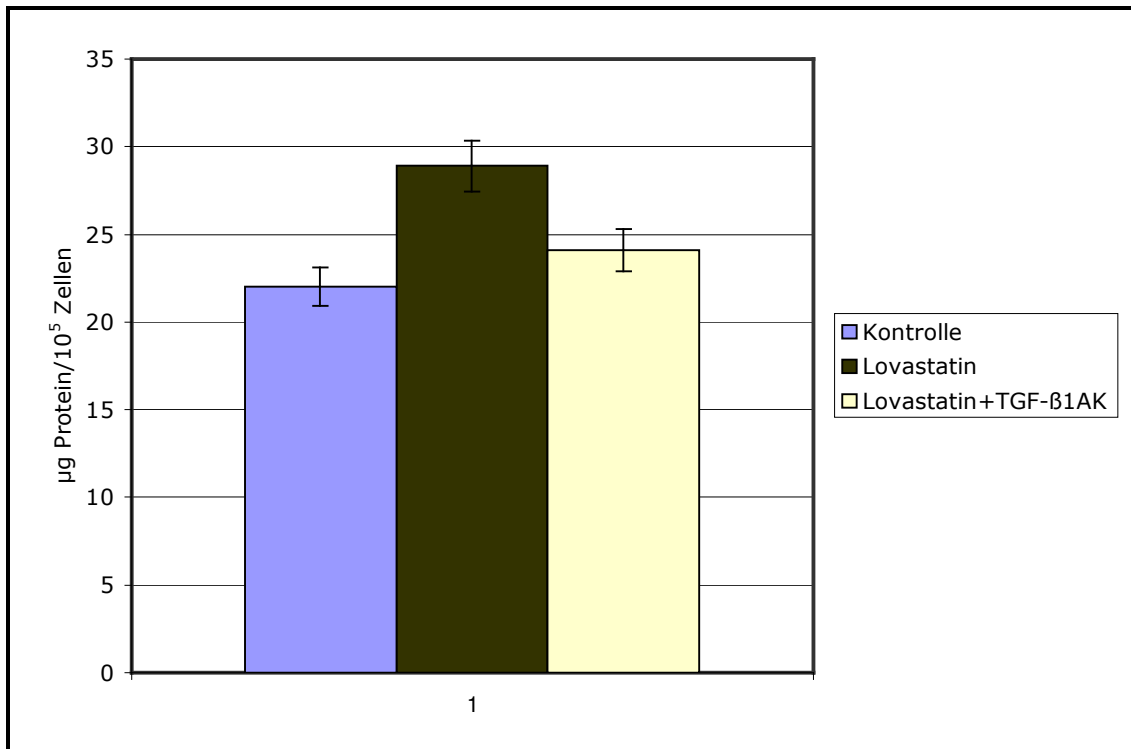


Abbildung 22 Änderungen des Lovastatin-bedingten antiproliferativen Effektes auf humane SMCs durch monoklonale anti-humane TGF-β₁ AK.

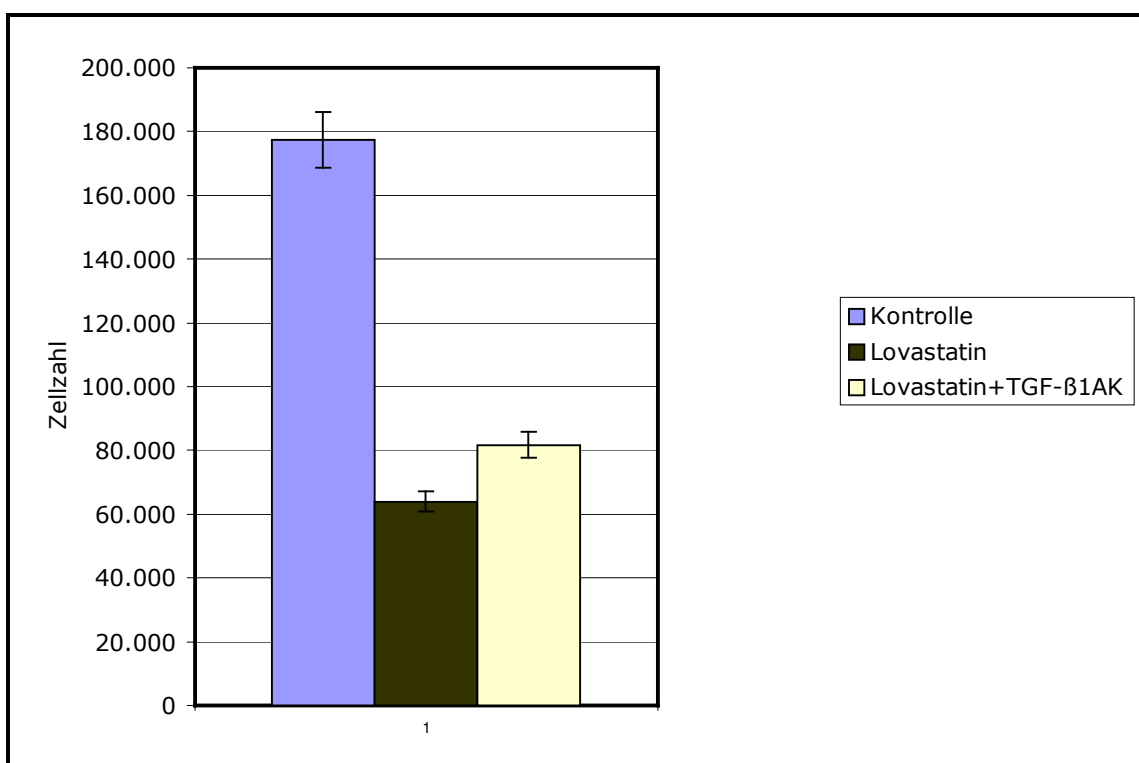


Abbildung 23 Suppression des Gesamtzellwachstums von SMCs nach Behandlung mit Lovastatin und TGF-β₁ Antikörpern.

Die Hemmung des Gesamtzellwachstums von SMCs konnte nur geringfügig aufgehoben werden (um 10 % im Vergleich zu Lovastatinkulturen ohne Antikörperzusatz).

4.2.2 Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)

Der Wachstumsfaktor bFGF wird von kultivierten glatten Muskelzellen synthetisiert und ist eine starke mitogene Substanz für SMCs in vitro und in vivo. Eine Stimulation mit 1.0 μ M Lovastatin führt nach einer Inkubation von 48 h zu einer Hochregulation dieses Wachstumsfaktors und zu einer Verteilung auf verschiedene Kompartimente. Im Zellkulturmedium lag die Erhöhung des bFGF Gehaltes bei einem 4-7 fachen Wert von Kontrollkulturen, sowohl bezogen auf den Proteingehalt (Abbildung 25) als auch gemessen an der Zellzahl (Abbildung 24).

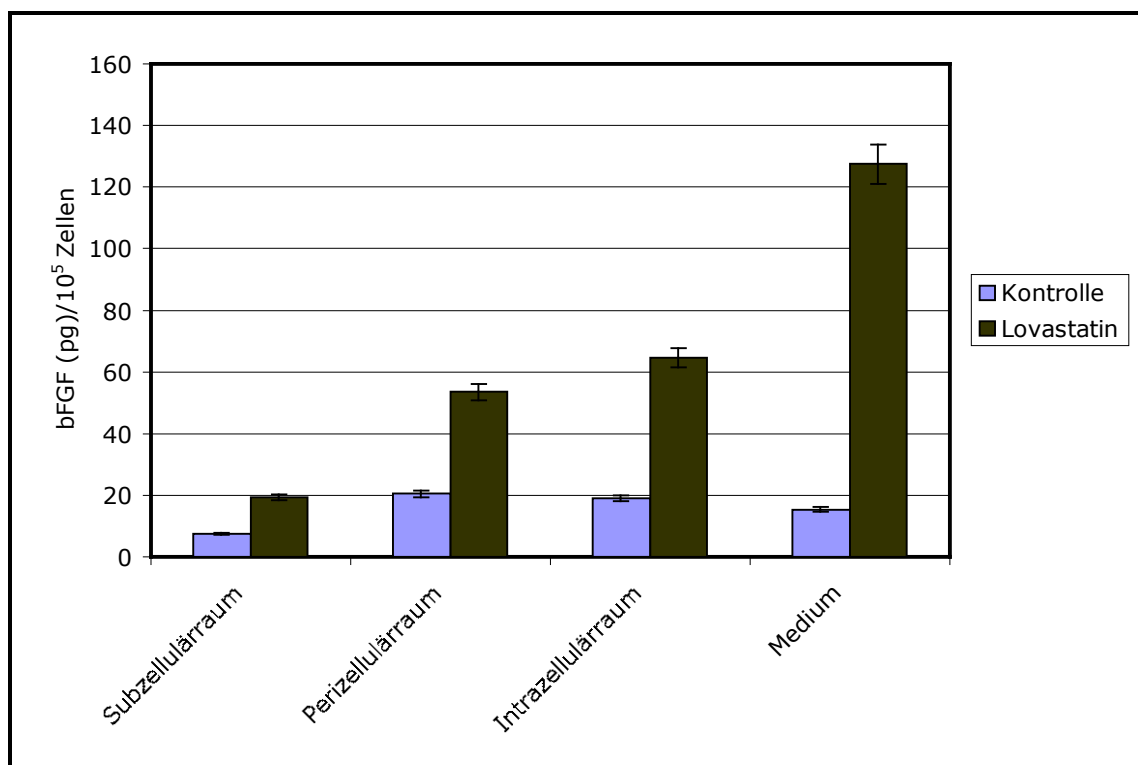


Abbildung 24 Abhängigkeit der bFGF-Konzentration pro 10⁵ Zellen in verschiedenen Zellkompartimenten von Lovastatin (1.0 μ M).

Ein weiterer Teil des durch den Lovastatineinfluss überexprimierten bFGF ist im Intra- und Perizellulärraum sowie in der zellfreien subzellulären Matrix zu finden. Im Medium konnte in Bezug auf die Gesamtzellzahl der Kultur durch die 48 stündige Einwirkung von Lovastatin die bFGF Expression durch SMCs deutlich um 727 % ($p= 0,07$), im Intrazellulärraum um 238 % ($p=0,15$), im Perizellulärraum um 162 % ($p=0,05$) und im Subzellulärraum um 161 % ($p= 0,12$) erhöht werden im Vergleich zu Kontrollkulturen.

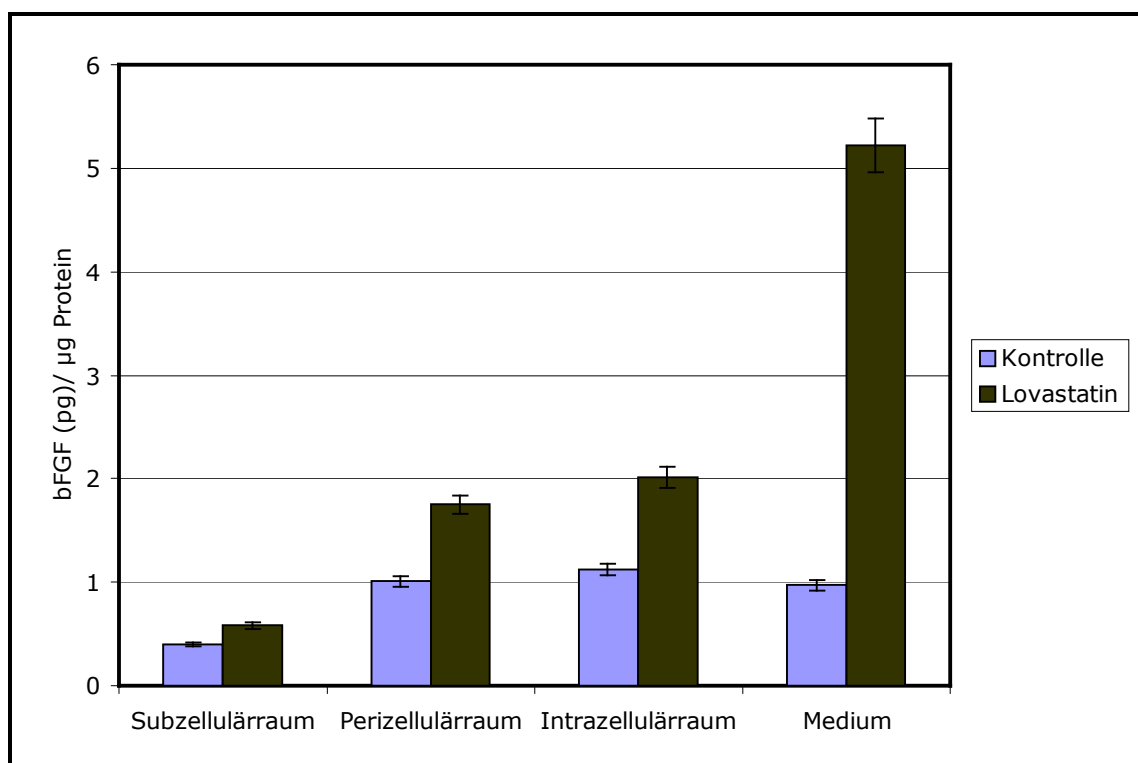


Abbildung 25 Veränderung der bFGF Konzentration verschiedener Zellkompartimente bezogen auf den Gesamtproteingehalt vaskulärer SMCs unter Lovastatineinfluss (1.0 µM).

Abbildung 25 zeigt, dass eine Behandlung mit Lovastatin in allen Kompartimenten bezogen auf den Proteingehalt die bFGF-Konzentration erhöht. Im Medium wurde eine Steigerung um 438 % ($p= 0,04$) beobachtet, im Intrazellulärraum um 79 % ($p= 0,21$), im Perizellulärraum um 73 % ($p= 0,06$) und im Subzellulärraum um 45 % ($p= 0,13$). Es herrschten gleiche Versuchsbedingungen wie für Abbildung 24. Die Inkubation humaner SMCs mit 1.0 µM Lovastatin über einen Zeitraum von

48h führte zu einer erhöhten Expression der bFGF mRNA. Der Nachweis der erhöhten Transkription bFGF-spezifischer Gene erfolgte durch RNA-Isolierung, Reverse Transkription, PCR und Agarosegelelektrophorese der gewonnenen cDNA. Auf der Abbildung 26 sind in drei unabhängigen Versuchen bei den mit Lovastatin (L) behandelten Zellen stärkere Banden zu erkennen als bei den entsprechenden Kontrollen (C). Die densitometrische Analyse zeigt eine statistisch signifikante Steigerung der bFGF Expression von 15% ($p=0,04$) (Abbildung 33).

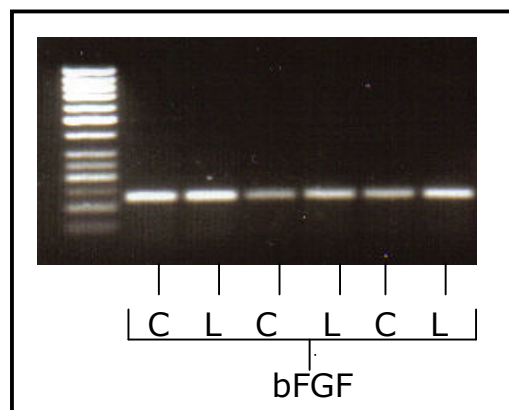


Abbildung 26 Agargelelektrophorese der cDNA von Basic Fibroblast Growth Factor. Die Gesamt-RNA der Zellen wurde nach Umschreiben in cDNA in Gegenwart der korrespondierenden Primer einer RT unterworfen; C, Kontrolle; L, Lovastatin-vorbehandelte Zellen.

Tabelle 8 IDV von bFGF

	n	Kontrolle \pm STDEV	Lovastatin \pm STDEV	p-Wert
bFGF	3	43,8 \pm 6,2	50,3 \pm 3,1	0,04

4.3 Lovastatin-bedingte Veränderung von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM)

Die Synthese von Extrazellulären Matrixkomponenten wurde untersucht durch die Beurteilung der Inkorporation von [^3H]Prolin und anorganischem [^{35}S]Sulfat in die Matrixkomponenten des Zellkulturmediums und in die

zellfreie subzelluläre Matrix, die von den vaskulären glatten Muskelzellen während der Kulturphase von 48 h gebildet wurde. Zusätzlich wurde die ECM spezifische mRNA der vaskulären glatten Muskelzellen mit und ohne Lovastatinbehandlung untersucht, da die beobachtete Mehrsynthese der extrazellulären Matrixkomponenten zunächst zu einer erhöhten Transkription der ECM spezifischen Gene, dann zur gesteigerten Translation und schließlich zur vermehrten Proteinbiosynthese führt.

4.3.1 Proteoglykane ($[^{35}\text{S}]$ Sulfat-Markierung von Zellkompartimenten, cDNA-Agarose-Gelelektrophorese von Versican, Decorin, Biglykan, Perlecan, Syndecan 1- 4)

Die radioaktive Markierung von sulfatierten Glucosaminoglykanen erfolgte für 48 h durch 5 μCi $[^{35}\text{S}]$ Sulfat /mL Standardmedium. Die $[^{35}\text{S}]$ - Inkorporation in Medium-, Zell- und in Extrazelluläre Proteoglykane wurde nach Auftrennung der proteingebundenen Radioaktivität mittels Gelfiltration durch Scintillationszählung ermittelt. Der Effekt der Inkubation von 1.0 μM Lovastatin über 48 h auf die Synthese von Glucosaminoglykanen vaskulärer SMCs ist in Abbildung 27 dargestellt. Kultivierte SMCs synthetisieren Proteoglykane und verteilen sie im Medium sowie extrazellulären Raum, in perizellulären und intrazellulären Kompartimenten. Unter in vitro Bedingungen befindet sich der Großteil der sulfatierten Glucosaminoglykane (ca. 60 %) im Medium sowohl von Kontroll- als auch mit Lovastatin behandelten Kulturen. Nach Lovastatinbehandlung ist insgesamt ein größerer Anteil der inkorporierten $[^{35}\text{S}]$ Sulfat Radioaktivität in allen Kompartimenten der Zellen feststellbar. Im Zellkulturmedium ist eine hochsignifikante Steigerung der inkorporierten $[^{35}\text{S}]$ Sulfat Aktivität von 104 % ($p= 0,005$) bezogen auf die Zellzahl zu registrieren, im zellfreien subzellulären Raum ist sie um 145 % ($p= 0,03$) erhöht und im Intrazellulärraum (einschließlich des Perizellulärraums) um 42 % ($p= 0,04$) gesteigert.

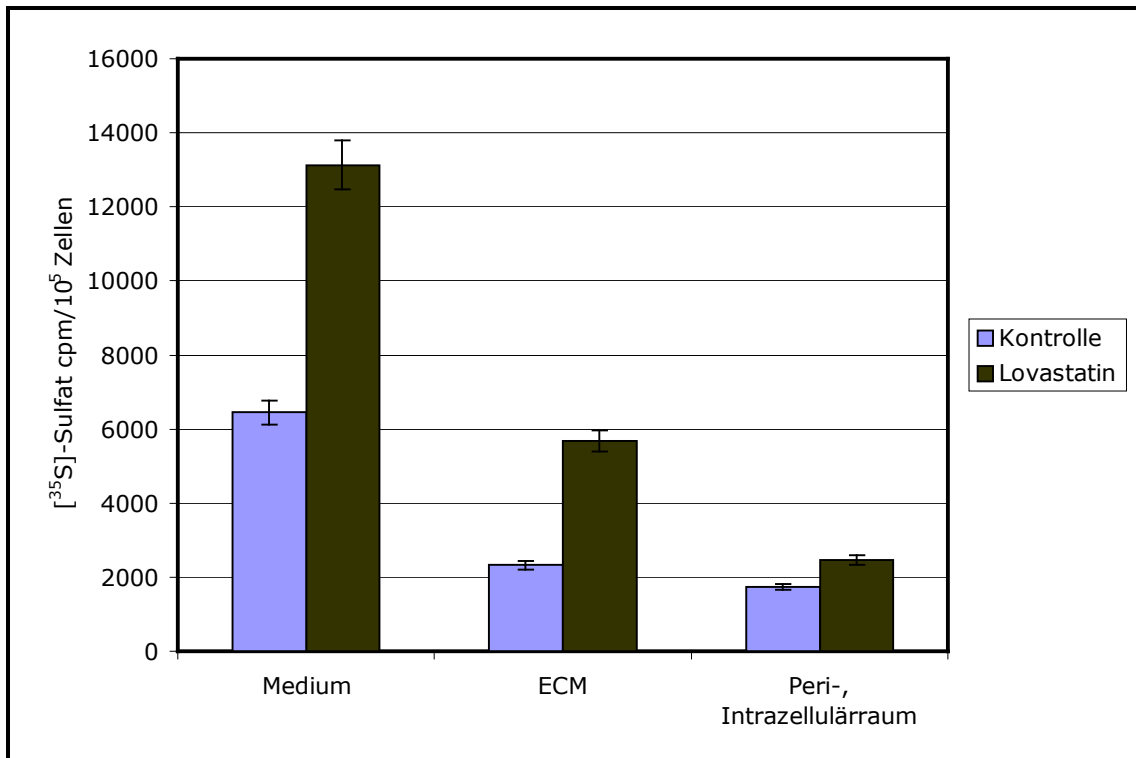


Abbildung 27 [³⁵S]-Sulfat Inkorporation in sulfatierte Proteoglykane in verschiedene Zellkompartimente unter Lovastatineinfluss (1.0 μM). ECM, nach Zellyse verbliebene Extrazelluläre Matrix.

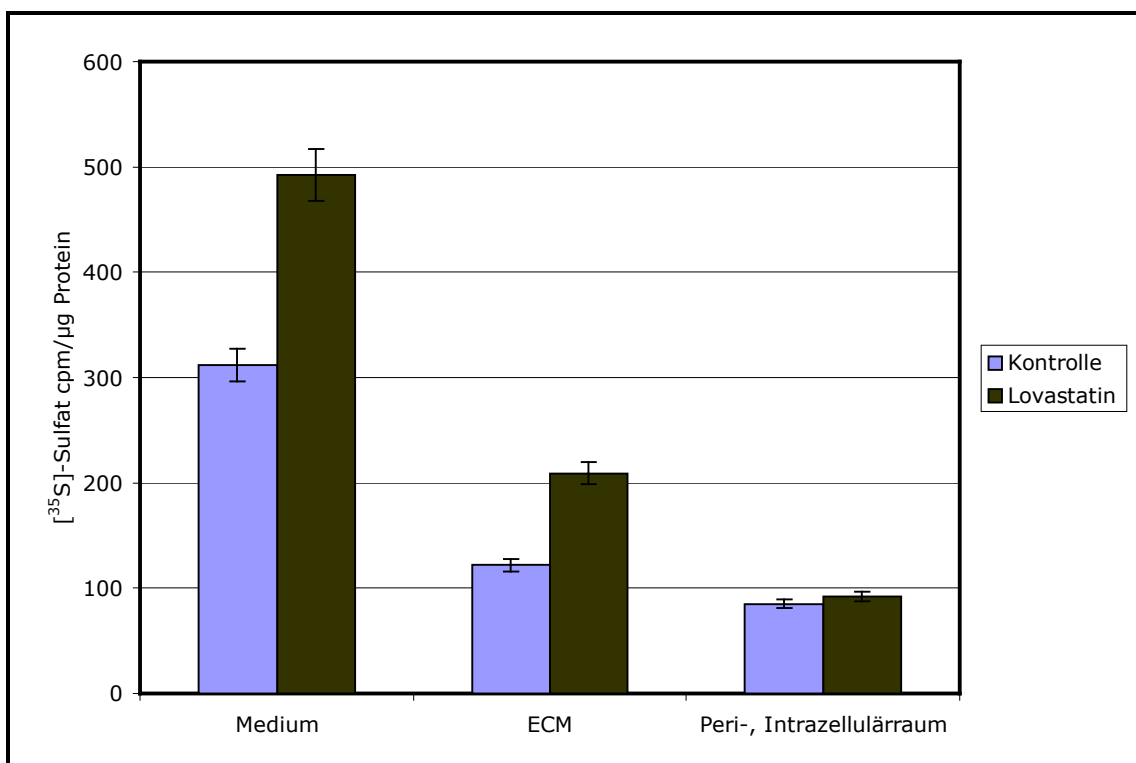
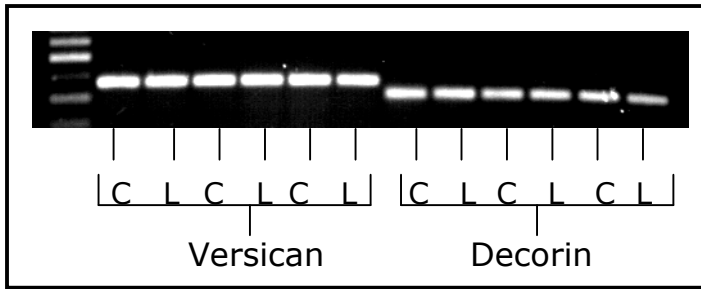


Abbildung 28 [³⁵S]-Sulfat Inkorporation in Medium-, Zell- und extrazelluläre Proteoglykane unter Lovastatineinfluss (1.0 μM)/μg Protein.

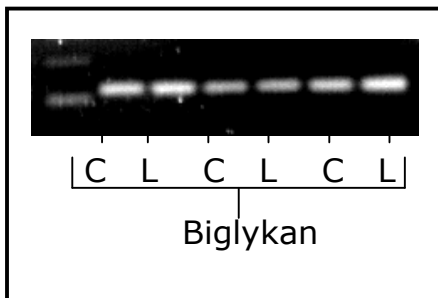
Im Zellkulturmedium ist eine signifikante Erhöhung der inkorporierten [³⁵S]Sulfat Aktivität bezogen auf den Gesamtzellproteingehalt der Zellen im Medium von 58% (p= 0,004) zu registrieren, in der Extrazellulären Matrix ist sie um 71% (p= 0,06) gestiegen. Im Intrazellulärraum (einschließlich des Perizellulärraums) konnten im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden (Anstieg um 8%; p= 0,16).

Die Gesamt-RNA wurde aus den in An- oder Abwesenheit von 1.0 µM Lovastatin behandelten SMC-Kulturen isoliert und durch die Agarosegelelektrophorese der Proteoglykan-spezifischen mRNA nach Umschreibung in cDNA sichtbar gemacht. Die Originalagarosegelphotos (Abbildung 29 A-F) aller verwendeten Proteoglykanspezifischen Oligonukleotidprimer sind aufgeführt, obwohl sichtbare signifikante Unterschiede hinsichtlich einer entsprechenden erhöhten mRNA Expression nur bei Syndecan 2 (Abbildung 29 E) nachweisbar sind. Die Banden der Kontrollkulturen sind im Vergleich zu denen der Lovastatinkulturen deutlich schwächer und schmaler, was die geringere PCR-Produktmenge und somit den geringeren mRNA Gehalt der Kontrollzellen nachweist.

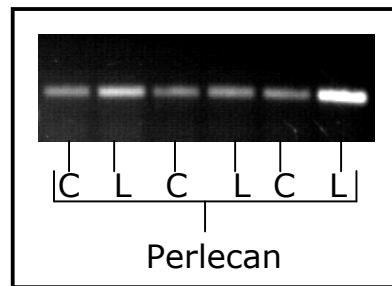
Die Densitometrische Analyse bestätigt eine signifikante Erhöhung in der Expression der mRNA von Syndecan 2 (29%; p= 0,02) im Vergleich zur entsprechenden mRNA von Kontrollkulturen. Bei Perlecan (164 %; p= 0,12) war trotz ähnlich steigender Tendenz in drei unabhängigen Versuchsreihen keine Signifikanz nachweisbar. Bei allen anderen Primern (Syndecan 1, 3 und 4 sowie Biglykan, Decorin, Versican) waren nach einer Lovastatininkubation von 1.0 µM über 48 h keine signifikanten Unterschiede in der Expression der mRNA bezogen auf die Kontrollen zu verzeichnen.



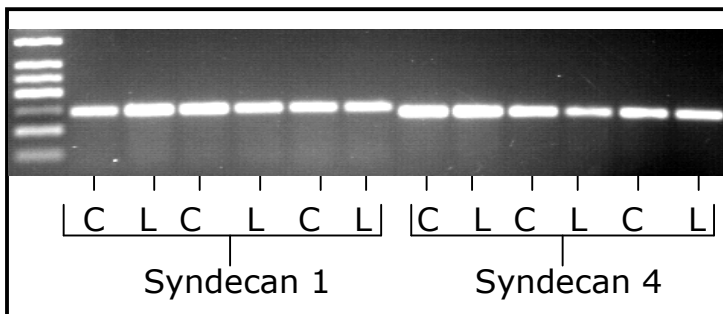
A



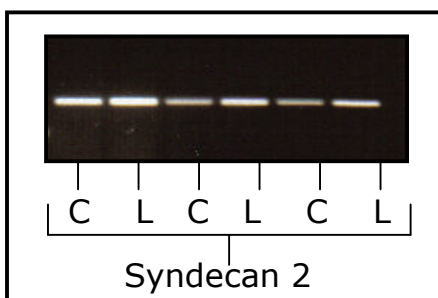
B



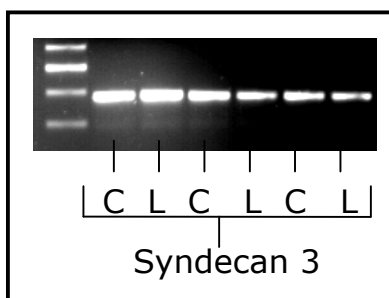
C



D



E



F

Abbildung 29 A-F Agargelelektrophorese der cDNA von Proteoglykanen der Extrazellulären Matrix. Die Gesamt-RNA der Zellen wurde nach

Umschreiben in cDNA in Gegenwart der korrespondierenden Primer einer RT unterworfen; C, Kontrolle; L, Lovastatin-vorbehandelte Zellen.

Tabelle 9 IDV von Proteoglykanen der Extrazellulären Matrix

Proteoglykantyp	n	Kontrolle +/- STDEV	Lovastatin +/- STDEV	p-Wert
Syndecan 2	3	22,1 +/- 5,6	36,9 +/- 4,0	0,03
Perlecan	3	10,3 +/- 1,3	27,3 +/- 18,9	0,12
Syndecan 1	3	36,9 +/- 5,1	39,52 +/- 7,5	0,36
Syndecan 3	3	33,7 +/- 12,0	31,3 +/- 11,7	0,17
Syndecan 4	3	43,7 +/- 0,4	39,6 +/- 8,8	0,25
Biglykan	3	58,6 +/- 0,4	60,7 +/- 2,5	0,12
Versican	3	44,7 +/- 2,4	45,1 +/- 2,3	0,2
Decorin	3	38,4 +/- 0,9	39,9 +/- 1,1	0,08

4.3.2 Kollagen ([³H]Prolin-Markierung, Agargelelektrophorese der cDNA der Kollagentypen I, III, V)

Kollagen wurde für 48 h durch 2,5 µCi [2,3-³H]Prolin /mL Standardmedium markiert. Abbildung 30 zeigt den Lovastatin bedingten Effekt auf die Synthese von Kollagen I, III und V durch SMCs. Es wird deutlich, dass in allen untersuchten Kompartimenten der Lovastatinbehandelten Kulturen der Anteil an Proteingebundenem [³H]Prolin (bzw [³H]Hydroxyprolin) erhöht war. Im Medium konnte in Bezug auf die Zellzahl eine Steigerung der [³H]Prolin-Inkorporation um durchschnittlich 284 % (p= 0,02) in drei verschiedenen unabhängigen Versuchen ermittelt werden. Die signifikante Erhöhung der inkorporierten [³H]Prolin Aktivität in die zellfreie sub- und extrazelluläre Matrix beträgt 155 % (p= 0,02), in den Intra- sowie Perizellulärraum zeigt [³H]Prolin-Inkorporation eine steigende Tendenz von 26 %.

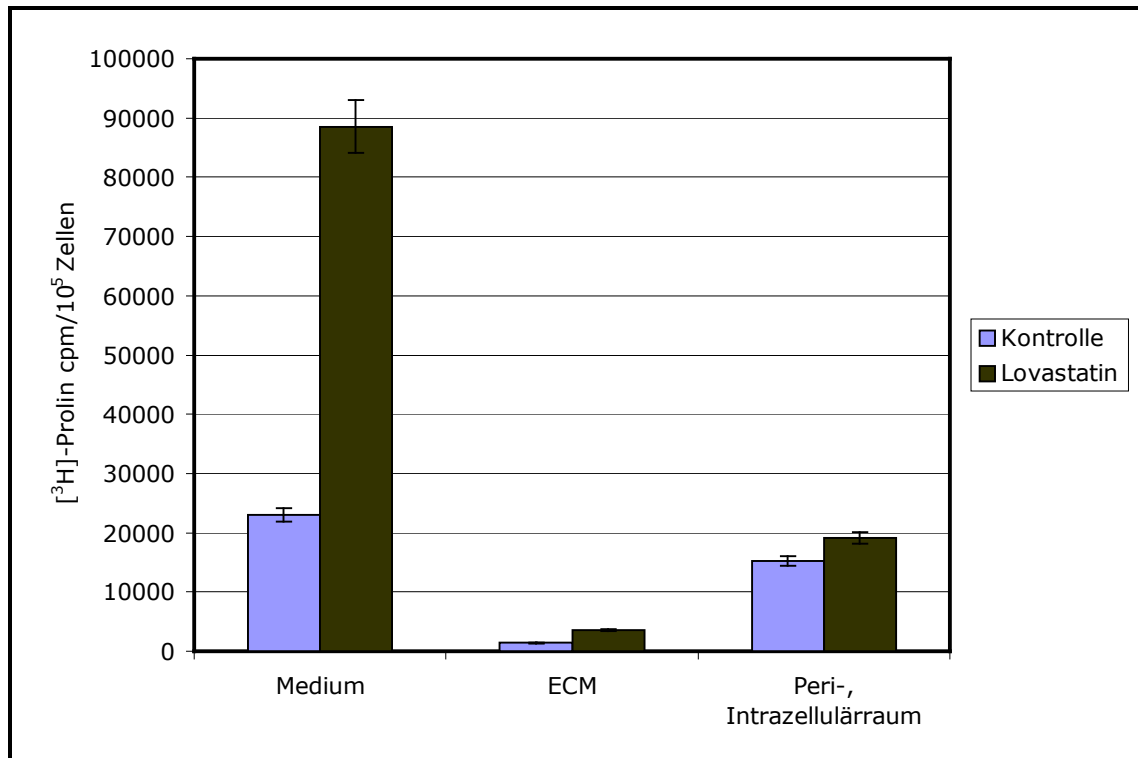


Abbildung 30 [³H]Prolin Aktivität im Medium, in der ECM und im Peri- sowie Intrazellulärraum vaskulärer SMCs unter dem Einfluss von Lovastatin (1.0 μM).

Der gemessene Absolutwert der Matrix-assoziierten [³H]Prolin-Inkorporation ist mehrere Größenordnungen geringer als der des Mediums, vermutlich aufgrund der verzögerten Zusammensetzung von löslichen Kollagenmolekülen in unlösliche Fibrillen unter in vitro Bedingungen.

Abbildung 31 zeigt, dass in allen untersuchten Kompartimenten der Lovastatinbehandelten Kulturen der Anteil an Proteingebundenem [³H]Prolin (bzw [³H]Hydroxyprolin) auch in Bezug auf den Gesamtproteingehalt der Zellen gesteigert wurde. Die erhobenen Werte zeigen eine ähnliche Tendenz wie in Abbildung 30. Im Medium war die signifikanteste Erhöhung der [³H]Prolin-Inkorporation um durchschnittlich 199 % ($p= 0,03$) festzustellen. Die Steigerung der inkorporierten [³H]Prolin Aktivität in die zellfreie sub- und extrazelluläre Matrix beträgt 101 % ($p= 0,02$), in den Intra- sowie Perizellulärraum zeigt [³H]Prolin-Inkorporation keine signifikanten Unterschiede.

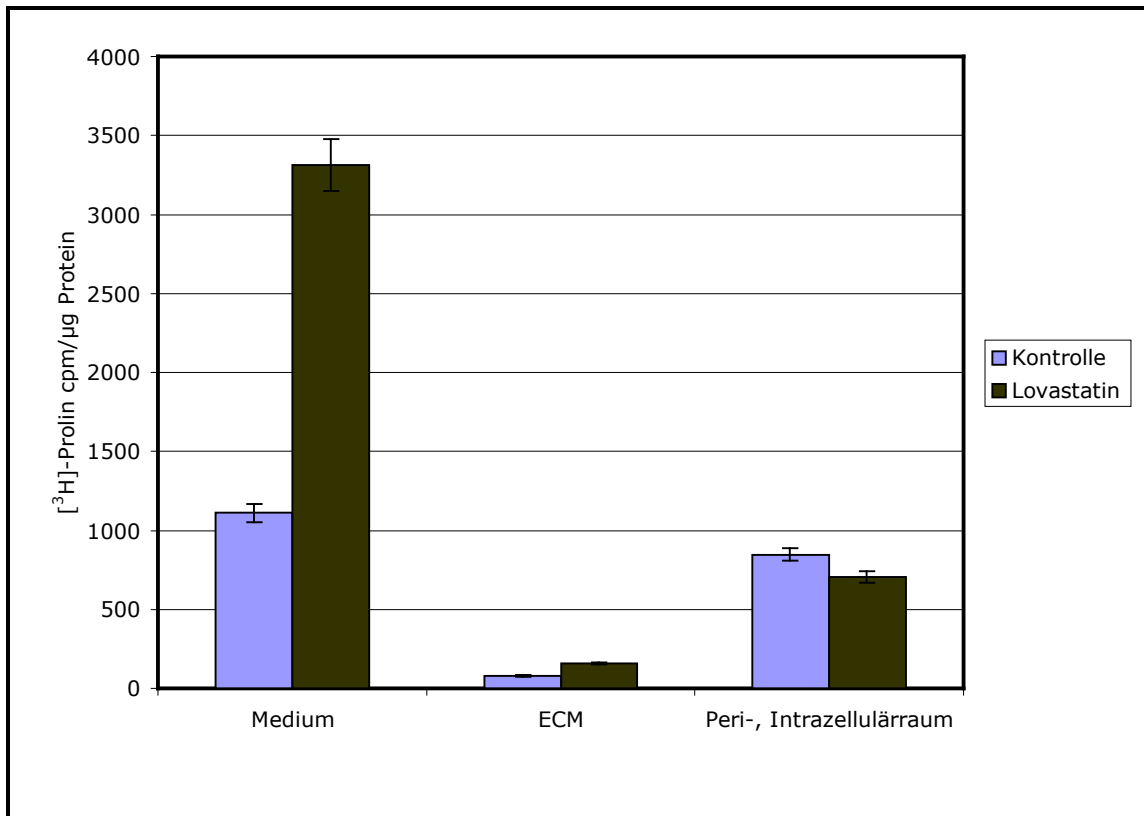


Abbildung 31 [³H]Prolin Inkorporation in das Medium, die ECM und den Peri- sowie Intrazellulärraum vaskulärer SMCs unter dem Einfluss von Lovastatin (1.0 μM)/Protein (μg).

Die Lovastatinbehandlung der vaskulären glatten Muskelzellen ging mit einer erhöhten Transkription der Kollagengene und einer entsprechenden Erhöhung der Kollagen-spezifischen mRNA, die nach Translation die beobachtete Mehrsynthese von Kollagen herbeiführt. Aus den mit oder ohne 1.0 μM Lovastatin behandelten SMC-Kulturen wurde die Gesamt RNA isoliert und mittels Agarosegelelektrophorese der cDNA, die zuvor durch RT und PCR mit spezifischen Oligonukleotidprimern gewonnen wurde, sichtbar gemacht. Auf den Abbildungen 32 A und B sind fast keine Unterschiede zwischen den Proben erkennbar. Die PCR-Produkte des Kollagen Typ V Primers (Abbildung 32 C) zeigte stärkere Banden der mRNA Lovastatinbehandelter Zellen (L) als in Abwesenheit von Lovastatin (C) in drei verschiedenen unabhängigen Versuchen. Die visuellen Ergebnisse wurden durch eine Densitometrische Analyse verifiziert und bestätigen eine Steigerung der Kollagen V spezifischen mRNA um 23 % (p= 0,1) (Abbildung

33). Eine statistische Signifikanz war nicht nachweisbar. Die anderen Primer (Kollagen I und III) zeigten auch nach densitometrischer Auswertung keine signifikanten Unterschiede in der Expression der mRNA bezogen auf die Kontrollen.

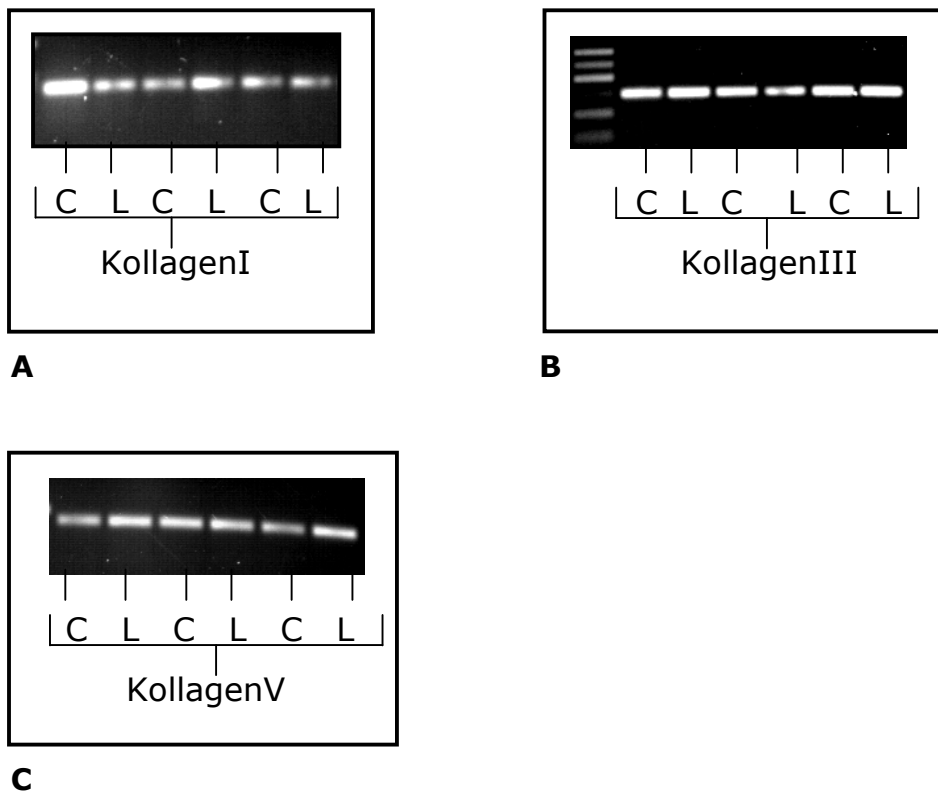


Abbildung 32 A-C Agargelelektrophorese der cDNA von Kollagen I, III, V. Die Gesamt-RNA der Zellen wurde nach Umschreiben in cDNA in Gegenwart der korrespondierenden Primer einer RT unterworfen; C, Kontrolle; L, Lovastatin-vorbehandelte Zellen.

Tabelle 10 IDV der Kollagentypen I, III, V

Kollagentyp	n	Kontrolle +/- STDEV	Lovastatin +/- STDEV	p-Wert
Kollagen I	3	21,3 +/- 9,41	20,9 +/- 5,1	0,46
Kollagen III	3	30,5 +/- 3,5	31,0 +/- 4,6	0,43
Kollagen V	3	33,8 +/- 5,6	41,7 +/- 2,4	0,1

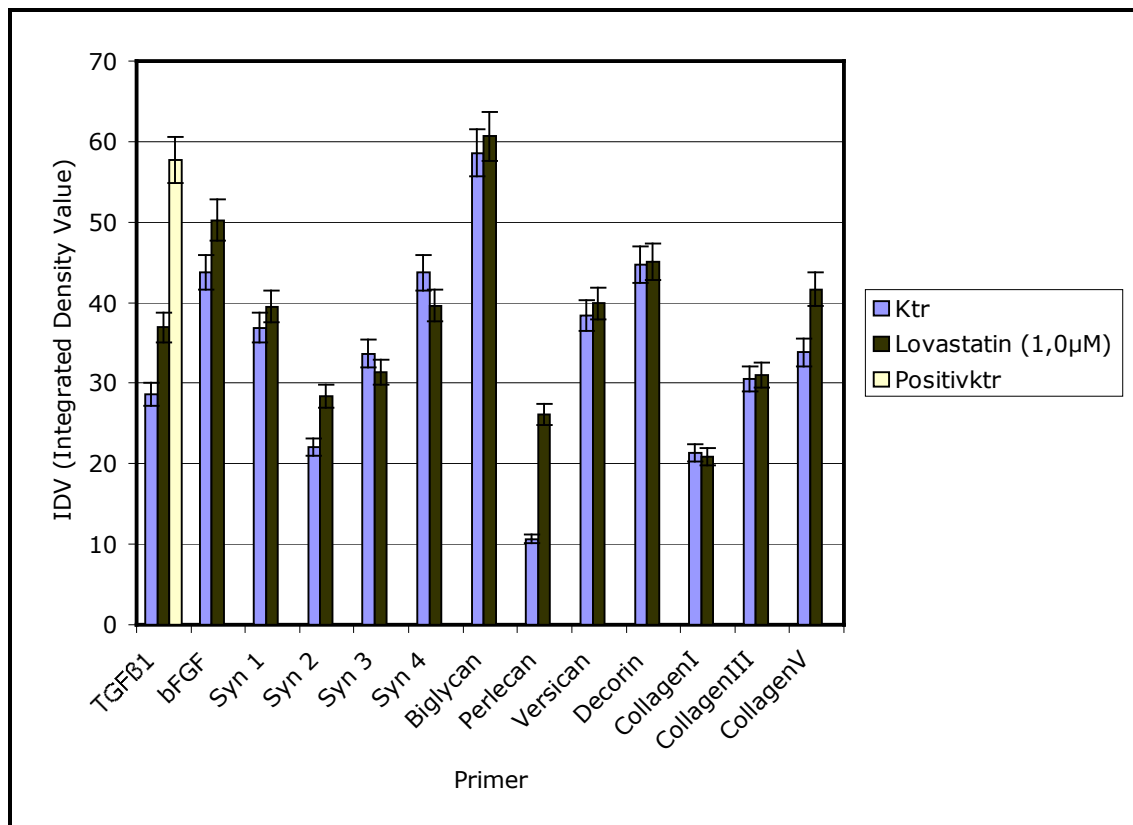


Abbildung 33 Zusammenfassende Übersicht über die Densitometrische Auswertung der Expression aller verwendeten Primer der Kontroll- und Lovastatinkulturen (Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen).

Die Densitometrische Analyse zeigt zusammenfassend eine signifikante Erhöhung in der Expression der mRNA der Wachstumsfaktoren TGF- β_1 (29 %; $p=0,04$) und bFGF (15 %; $p=0,04$), des Proteoglykans Syndecan 2 (29%; $p=0,03$). Bei den Primern Perlecan (164 %; $p=0,12$) sowie Kollagen Typ V (23 %; $p=0,11$) müssen die erhobenen Daten mit einer gewissen Einschränkung betrachtet werden. Obwohl der Probenumfang relativ gering war ($n=3$), was teilweise die Möglichkeit signifikante Unterschiede mittels Student'schen t-Tests festzustellen limitiert hat, ist eine ähnlich steigende Tendenz in allen Experimenten im Vergleich zur entsprechenden mRNA von Kontrollkulturen zu beobachten. Alle anderen verwendeten Primer (Syndecan 1, 3 und 4 sowie Biglykan, Decorin, Versican und Kollagen I und III) zeigten nach einer Lovastatininkubation von 1.0 μM über 48 h keine signifikanten Unterschiede in der Expression der mRNA bezogen auf die Kontrollen.

5.0 Diskussion

Akute Komplikationen bei Koronaren Herzkrankheiten sind häufig auf arteriosklerotische Plaquerupturen zurückzuführen, wobei diese in erster Linie nicht abhängig sind von dem Ausmaß der Lumeneinengung durch die arteriosklerotische Plaque, sondern vielmehr von der Pathomorphologie der Plaque und deren dadurch bestimmten Rupturanfälligkeit. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Lovastatin auf den Stoffwechsel der Extrazellulären Matrix glatter Muskelzellen aus humanen Coronararterien geben Hinweise auf die Annahme, dass sich die Wirkung der Statine auf den Stoffwechsel der ECM des arteriellen Gefäßsystems erstreckt und der von SMC gebildeten ECM eine wichtige Funktion als fibröse Deckschicht über der lipidreichen arteriosklerotischen Plaque zukommt. Unter der Wirkung von Statinen wird eine spezifische stabile extrazelluläre Matrix erzeugt, die einer arteriosklerotischen Plaque bessere mechanische Eigenschaften verleiht und zu einer Stabilisierung arteriosklerotischer Läsionen beitragen kann. Aus diesem Grund sollte heute Ziel einer Statintherapie neben der LDL-Cholesterinsenkung vielmehr eine Stabilisierung von Plaques durch die Verbesserung der Endothelfunktion, Hemmung der Inflammation, Senkung der Thrombozytenaggregation und Veränderung der Proliferation bzw. Migration glatter Muskelzellen sowie deren ECM-Syntheseprofil sein.

5.1 Bedeutungen der Statine für die Prävention und Behandlung der Arteriosklerose

Bei der Entwicklung der Arteriosklerose handelt es sich, wie unter 1.3.3.1 beschrieben, um ein komplexes Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren, allerdings konnte durch diverse klinische Interventionsstudien (u.a. der Scandinavian Simvastatin Survival Studie, 4S; der Cholesterol And Recurrent Events Studie, CARE; der Heart Protection Studie, HPS; der Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Studie, AFCAPS/TexCAPS; der Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease Studie,

LIPID; der West of Scotland Coronary Prevention Studie, WOSCOPS) vor allem ein klarer Zusammenhang hergestellt werden zwischen einem erhöhten Plasmaspiegel des atherogenen LDL-Cholesterins (LDL-C) und dadurch gesteigerten Arterioskleroserisiko. Die Wichtigkeit der Senkung des LDL-C Plasmaspiegels mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren sowohl in der Primär- als auch der Sekundärprävention von Koronaren Herzerkrankungen (CHD) ist weltweit unbestritten und Therapie der Wahl (Liao et al. 2002, Vaughan et al. 2000). Darüberhinaus ist diese medikamentöse Cholesterinsenkung eine sichere nebenwirkungsarme Langzeittherapie, mit einem exzellenten Sicherheitsprofil und einer guten Verträglichkeit, die durch klinische Studien in ihrer Validität wie kaum eine andere Therapieform gesichert ist (Waters 2006).

Bei Hochrisikopatienten mit stattgehabtem Myokardinfarkt und erhöhten Serumlipidspiegeln (122-300 mg/dl) lässt sich die Infarktrate, wie in der mit Simvastatin durchgeführten 4S Studie gezeigt werden konnte, im Sinne einer Sekundärprävention signifikant um 34% verringern (Haass 2002). In der CARE Studie führte eine Pravastatinbehandlung von Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt und normalen bis mäßig erhöhten Cholesterinwerten (150-174 mg/dl) zu einer signifikanten Senkung eines tödlichen koronaren Ereignisses um 24% (Rutishauser 2006). Die LIPID Studie mit Pravastatin zeigte eine signifikante Reduktion der Koronarletalität um 24% bei Patienten mit klinisch manifester KHK und erhöhten Cholesterinwerten (155-271 mg/dl) (Rutishauser 2006). Aus ethischen Gründen durch den evidenten Behandlungsvorteil in der Statingruppe musste die Studie sogar frühzeitig abgebrochen werden. Hinsichtlich der Primärprävention zeigt u.a. die WOSCOP Studie, dass bei Patienten mit erhöhten Lipidserumspiegeln (durchschnittlich 190 mg/dl) und ohne Zeichen einer klinisch manifesten KHK die Rate an vaskulären Ereignissen durch Pravastatin signifikant um 31% gesenkt werden kann (Waters 2006). Lovastatin führt in der AFCAP/TexCAP Primärpräventionsstudie bei Patienten mit normalen Lipidserumspiegeln (durchschnittlich 171 mg/dl) zu einer Reduktion koronarer Ereignisse von 37% (Waters 2006). Allerdings sollte sich die reine Primärprävention

aufgrund der relativ ungünstigen Kosten-Nutzen Relation auf Hochrisikopatienten beschränken (Prosser 2000). In den meisten randomisierten kontrollierten Studien führte eine Statinbehandlung zu einer relativen Risikoreduktion für kardiovaskuläre Ereignisse von 25-30% sowie zu einer vergleichbaren Verringerung des Schlaganfallrisikos (Rutishauser 2006), obwohl bisher keine Studie nachweisen konnte, dass ein erhöhter LDL-C Plasmaspiegel ein Risikofaktor für einen Schlaganfall darstellt. Bei der HP Studie, bei der im Gegensatz zu anderen Studien Hochrisikopatienten sowie quantitativ Patienten mit einem LDL -Cholesterin $<130\text{mg/dl}$ ($>50\%$), mit einem Alter >70 Jahre (28%) und Frauen (24%) eingeschlossen wurden, konnten vaskulär bedingte Ereignisse (Myokardinfarkt, Schlaganfall und Revaskularisation) um 24% reduziert werden unabhängig von Alter, Geschlecht und der Höhe des LDL-Cholesterins zu Studienbeginn (Haass 2002).

Die klinischen angiographisch kontrollierten Regressionsstudien zeigen, dass die Lipidsenkende Therapie mit Statinen eine größere Reduktion der kardiovaskulären Ereignissrate bewirkt als man anhand der nur geringfügigen Beeinflussung des Stenosegrades erwarten würde (Vaughan 2000, Grines 2006). Weiterhin setzt dieser protektive Effekt unmittelbar ein bevor eine Wirkung auf die Progression arteriosklerotischer Läsionen feststellbar ist. Dieser protektive Effekt der Statine ist sowohl auf die LDL-Senkung als auch auf pleiotrope Prozesse zurückzuführen, auf die unter 1.2 ausführlich eingegangen wird. Statine führen zu einer Verminderung der Progression und geringfügigen Reduktion arteriosklerotischer Gefäßlumeneinengungen sowie zu einer klinisch bedeutsameren Plaquestabilisierung, die bedingt ist durch den günstigen Einfluss auf plaquedestabilisierende entzündliche Vorgänge in der Gefäßwand sowie Verbesserung der gestörten Endothelfunktion, Verminderung der Zelladhäsion und Reduktion der Thrombogenität von Plaques (Haass 2002).

5.2 Statine und der Stoffwechsel der vaskulären ECM

Die pleiotropen Effekte von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren wie Lovasatin erstrecken sich über eine Vielzahl zellulärer Funktionen wie die Hemmung des Wachstums humaner arterieller glatter Muskelzellen sowie Veränderungen der Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix. Grundlage und Voraussetzung der vorliegenden experimentellen Arbeit war die Annahme, dass eine veränderte ECM Synthese und beschleunigtes SMC Wachstum zu pathologischen Vorgängen wie Intimaverdickung sowie Plaqueformation beitragen und Lovastatin protektive Effekte hinsichtlich der Entwicklung arteriosklerotischer wie auch restenotischer Läsionen sowie instabiler arteriosklerotischer Plaques haben könnte. Die extrazelluläre Matrix der Gefäßwand beinhaltet eine Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlichsten Funktionen, von denen in dieser in vitro Studie einige Vertreter exemplarisch untersucht wurden, wie die Proteoglykane Syndecan 1, 2, 3 und 4, Perlecan, Biglykan, Decorin und Versican sowie die Faser- und Strukturproteine Kollagen I, III und V. Weiterhin wurden Veränderungen der Expression von TGF- β_1 und bFGF erhoben, da ein Einfluss dieser Wachstumsfaktoren auf die ECM-Proteinakkumulation bereits beschrieben wurde (Schmidt et al. 2006, Lawrence et al. 1994, Amento et al. 1991).

Das HMG-CoA-Reduktase-Produkt Mevalonat ist ein Intermediat der Cholesterinsynthese und zugleich ein Vorläufermolekül vieler phosphorylierter Isoprenoide (Farnesylpyrophosphat, Geranylgeranylpyrophosphat, Dolichol), die als Lipidanker für die posttranslationale Modifikation von Signaltransduktionsmolekülen benötigt werden. Die Reduktion der Isoprenoidmenge durch Statine führt konsekutiv zu einer Inhibition der intrazellulären Signaltransduktion (Liao JK 2002, Laufs et al. 2000, Bellosta et al. 1998), was die Proliferation und Migration vaskulärer Zellen verringert (Sindermann et al. 2000, Axel DI et al. 2000, Munro 1994) sowie die Expression von ECM-Proteinen verändert (Siegel-Axel et al. 2003, Riessen et al. 1999). Vor allem die kleinen GTP-bindenden Proteine der Ras-Familie sowie die Rho-Familie (RhoA, RhoB, Rac und

Cdc42) und deren zugehörige Kinasen spielen bei dieser Signaltransduktion eine grosse Rolle, da sie eine posttranslationale Modifikation für ihre Membranlokalisation sowie Aktivität benötigen und in die Zellzyklusregulation involviert sind (Laufs et al. 2000). Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen u.a., dass Statine die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen inhibieren (Reduktion der Zellzahl um durchschnittlich 64 % ; $p= 0,00007$) und einen Hypertrophen Wachstumsstatus induzieren, was mit einer hochsignifikanten Zunahme des mittleren Zelldurchmessers um 7%; $p < 0,00001$ sowie des mittleren Zellvolumens um 21 %; $p < 0,00001$ einherging. Des weiteren zeigte 1,0 μM Lovastatin in vitro Dosis- und Zeitabhängig reversible antiproliferative Effekte auf humane vaskuläre SMCs (verminderte [^3H]Thymidininkorporation) und führte zu einer Hypertrophie dieser Zellen, was mit einer Erhöhung des zellulären Gesamtproteingehalts assoziiert war, der um durchschnittlich 39% ($p= 0,00001$) gesteigert wurde und eine erhöhte ECM-Synthese nachweist. Aorta SMCs von Ratten zeigten nach 24 stündiger Lovastatininkubation (5 $\mu\text{mol/l}$) verglichen mit unbehandelten SMCs einen signifikant erhöhten Anteil an Zellen in der G_0/G_1 Phase sowie eine verminderte Anzahl an Zellen in der S Phase, wobei der Anteil der Zellen in der G_2/M Phase zwischen beiden SMC-Populationen vergleichbar war (Abb. 34 nach Sindermann et al. 2000). Demnach ist die Hemmung der Proliferation in erster Linie bedingt durch die Arretierung des Zellzyklus in der G_0/G_1 Phase, was durch die Zugabe von Mevalonat zu Statinbehandelten Zellen verhindert werden kann und damit die Wichtigkeit der Proteinprenylierung bei der Proliferation glatter Muskelzellen zeigt (Sindermann et al. 2000, Jakobisiak et al. 1991, Vincent et al. 1991). Lovastatin wirkt auf verschiedene Signalproteine beispielsweise durch Verhinderung der Farnesylierung des Wachstum-regulierenden $p21^{\text{ras}}$ Proteins und der Geranylgeranylierung kleiner GTP-bindender Proteine (Riessen et al. 1998), allerdings sind auch Mevalonat-unabhängige Pfade bekannt, durch die Lovastatin die Signaltransduktion in vaskulären glatten Muskelzellen via Modulation des MAPK Phosphorylierungssystems kontrolliert (Sindermann et al. 2001). Das kleine GTP-bindende Protein Ras

fördert die Zellzyklusprogression durch die Aktivierung des MAP Kinasepfades, wohingegen Rho die Zellproliferation durch Destabilisierung des p27^{Kip1} Proteins verursacht (Laufs et al. 2000). Weiterhin hemmt Lovastatin die Cyclin-abhängige Kinase 2, induziert p53 und erhöht das Proteinlevel des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p27^{Kip1} und verursacht so eine G₁-Zellzyklusarretierung (Riessen et al. 1998). Laufs et al. konnten 1999 nachweisen, dass eine Statininduzierte Inhibition der Membrantranslokation von Rho, aber nicht von Ras, sowie die meisten Hemmeffekte der Statine auf glatte Muskelzellen durch GGPP, nicht aber durch FPP oder LDL Cholesterin, aufgehoben werden konnten, so dass die Hemmung von Rho und der Rho GTPase-induzierten Downregulation von p27^{Kip1} der anzunehmende Mechanismus ist, durch den Statine die SMC Proliferation inhibieren (Laufs et al. 1999). So führt die Inhibition einer Rho assoziierten Kinase durch einen spezifischen Inhibitor (Y-27632) in vitro (humane arterielle SMCs) sowie in vivo (Ratten) zu einer Suppression der Neointimahyperplasie nach einer mittels Ballonkatheter durchgeführten experimentellen Gefäßverletzung von Arterien (Sawada et al. 2000).

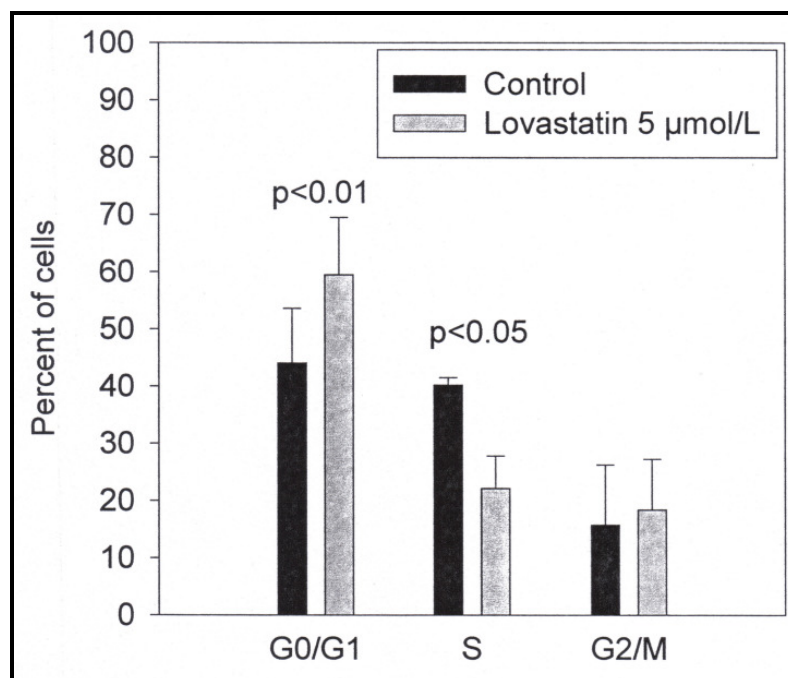


Abbildung 34 Lovastatin-induzierte Arretierung glatter Muskelzellen in der G₀/G₁ Phase des Zellzyklus (nach Sindermann et al. 2000).

Eine Statinbedingte erhöhte Expression des Wachstumsfaktors TGF- β_1 , dessen mRNA Expression in den erhobenen Daten dieser Arbeit unter Lovastatineinfluss signifikant erhöht ist (29 %; $p= 0,04$), ist u.a. mit der Inhibition der Geranylgeranylierung der Rho A GTPase (Park et al. 1999) und mit einer Wachstumsinhibition sowie einem hypertrophen Wachstumsstatus kultivierter vaskulärer glatter Muskelzellen assoziiert (Owens et al. 1988, Schmidt et al. 2001), was darauf hindeutet, dass die TGF- β Signalkaskade in die Vermittlung von Statineffekten zumindest zum Teil involviert sein könnte. HMG-Co-A-Reduktase-Inhibitoren wie auch GGTI-298, ein selektiver Inhibitor der Geranylgeranyltransferase I, induzieren durch einen Effekt auf ein TGF- β responsive element in der Upstreamregion des p21^{WAF1/C1P1} Promotors die Expression von p21^{WAF1/C1P1}, das die Zellzyklusprogression durch Hemmung einer Cyclin abhängigen Kinaseaktivität negativ reguliert (Park et al. 1999). Daraus resultiert eine Statinassoziierte sowie TGF- β vermittelte Hemmung der unkontrollierten vaskulären Muskelzellproliferation, die teilweise für den positiven Effekt der Statine hinsichtlich der Reduktion arteriosklerotischer Ereignisse verantwortlich ist.

Siegel-Axel et al. (2003) sowie Riessen et al. (1999) konnten in vitro auch den Hemmeffekt der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Cerivastatin und Lovastatin auf die mRNA Expression vaskulärer glatter Muskelzellen von ECM-Proteinen (Kollagen I, Biglykan, Thrombospondin) durch Koinkubation mit Mevalonat vollständig aufheben. Diese Tatsache beweist, dass Mevalonat selbst bzw. die herabgesetzte Isoprenoidverfügbarkeit an der Regulation der Genexpression spezifischer ECM Proteine ebenso beteiligt ist wie an der Zellproliferation. Ein spezifischer Rho Kinase Inhibitor (Y-27632) kann die Cerivastatineffekte auf humane arterielle SMCs hinsichtlich Wachstum und mRNA Expression von Thrombospondin imitieren (Siegel-Axel et al. 2003). Demnach beeinträchtigen Statine durch Reduktion des Isoprenoids GGPP die Geranylgeranylierung und dadurch die Anheftung, Membrantranslokation und Aktivität der kleinen GTPase Rho sowie dessen wichtigstem Effektor, der Rho Kinase (Siegel-Axel et al. 2003). Die Rho Kinase vermittelt über diesen Mechanismus die Progression des Zellzyklus,

die SMC-Proliferation und vermutlich auch die Genexpression spezifischer ECM Proteine (Siegel-Axel et al. 2003).

Die Erhöhung des zellulären Gesamtproteingehalts ist das Ergebnis der de novo Synthese verschiedener Extrazellulärer Matrixproteine wie Kollagene und Proteoglykane. Das Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der vaskulären extrazellulären Matrix bestimmt die Größe und Zusammensetzung arteriosklerotischer Plaques (Wight 1995), zudem ist die ECM an der Regulation der Proliferation, Migration und Phänotypdifferenzierung von Zellen beteiligt (Newby et al. 1999). Arteriosklerotische Plaques enthalten zum Großteil strukturelle Matrixproteine wie die Kollagentypen I und III, wobei auch der Gehalt an Kollagen V erhöht ist (Rekhter 1999). Kollagene spielen bei Plaquewachstum und mechanischer Plaquestabilität eine ambivalente Rolle, da Kollagenabbau kombiniert mit einer inadäquaten Kollagensynthese arteriosklerotische Plaques schwächt und diese dadurch rupturanfällig macht, Kollagen allerdings auch zu einer Stabilisierung der fibrösen Deckplatte beitragen kann, wohingegen unkontrollierte Kollagenakkumulation zur Gefäßstenose führen kann (Rekhter 1999). Die Stabilisierung von arteriosklerotischen Läsionen beruht also weniger auf einer bloßen Kollagenansammlung als vielmehr auf der Bildung einer strukturell stabilen Matrix charakterisiert durch ein bestimmtes ECM-Profil. Bezüglich des Einflusses von Statinen auf die Bildung und Regulation der vaskulären ECM sind nur spärliche Daten verfügbar (Riessen et al. 1999, Siegel-Axel et al. 2002, Meyers et al. 2003). Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen u.a. den Lovastatin bedingten Effekt auf die Synthese von Kollagen I, III und V durch SMCs. Es wird deutlich, dass in Lovastatinbehandelten Kulturen der Anteil an Proteingebundenem [³H]Prolin (bzw. [³H]Hydroxyprolin) signifikant erhöht wird (2-3 fach, $p < 0,05$), was eine gesteigerte Kollagensynthese nachweist. Die Lovastatin-assoziierte verstärkte [³H]Prolin-Inkorporation in Kollagenmoleküle ist mit einer erhöhten Transkription von Kollagentyp V und einer entsprechenden Erhöhung der Kollagen V spezifischen mRNA um 23 % ($p = 0,1$), die nach Translation die beobachtete Mehrsynthese von Kollagen V herbeiführt,

verbunden. Allerdings konnten diese Beobachtungen nicht durch eine statistische Analyse bestätigt werden. Erhöhte Anteile von Kollagentyp V sind verglichen mit normalen Gefäßwänden, wo Kollagen V nur in geringen Mengen vorkommt, regelmäßige Bestandteile arteriosklerotischer Läsionen, vor allem in stabilen fibrozytären Plaques (Wight 1996). Kollagen V interagiert mit Kollagentyp I bei der Regulation des Fibrillendurchmessers sowie bei der initialen Bildung der Kollagenfibrillen in der Extrazellulären Matrix und scheint vor allem auch als Rahmenstruktur bei der Fibrillenreifung unentbehrlich zu sein (Kypreos et al. 2000). Die Beobachtung, dass sowohl durch Lovastatin eine gesteigerte Synthese von Kollagen V durch vaskuläre SMCs induziert wird als auch dass ein erhöhter Gehalt an Kollagen V regelmäßig in arteriosklerotisch erkrankten Gefäßen auftritt, legt eine im Vergleich zu normalen Gefäßen veränderte Fibrillenarchitektur nahe, die möglicherweise Einfluss auf die mechanische Stabilität und Integrität der Extrazellulären Matrix arteriosklerotischer Plaques haben kann. In den vorliegenden Ergebnissen ist ein Lovastatineffekt auf die Kollagentypen I und III nicht nachweisbar, obwohl die Arbeitsgruppe um Riessen et al. 1999 und 2003 eine inhibitorische Wirkung von Lovastatin, Simvastatin und Cerivastatin u.a auf die mRNA Expression in humanen arteriellen SMCs von Kollagen I nachweisen konnte. Der Wachstumsfaktor TGF- β_1 , dessen mRNA Expression gemäß den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit unter Lovastatineinfluss auch signifikant erhöht, scheint bevorzugt die Synthese von Kollagentyp V zu steigern (Lawrence et al. 1994, Schmidt et al. 2006), allerdings wird auch die Bildung von Kollagen I und III stimuliert (Amento et al. 1991, Kubota et al. 2003, Schmidt et al. 2006). Der Lovastatineffekt bezüglich der gesteigerten Kollagen V Expression könnte demnach TGF- β_1 vermittelt sein.

Der Gehalt und die Verteilung von Proteoglykanen verändern sich auch im Verlauf der verschiedenen Phasen der Plaqueeentwicklung sowie durch den Einfluss von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Riessen et al. 1999, Siegel - Axel et al. 2002, Meyers et al. 2003). Die in dieser experimentellen Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass eine Inkubation kultivierter vaskulärer SMCs mit 1.0 μ M Lovastatin über 48 h zu einer signifikant gesteigerten [35 S]Sulfat

Inkorporation in Glucosaminoglykane (0,5-1,5fach; $p < 0,05$) führt. Die vorliegenden Ergebnisse weisen weiterhin auf RNA-Ebene signifikante Unterschiede hinsichtlich einer entsprechend erhöhten mRNA Expression der Proteoglykane unter Statineinfluss bei Syndecan 2 (29%; $p = 0,02$) nach. Syndecan 2 ist eines von vier transmembranösen Heparansulfatproteoglykanen, die von glatten Muskelzellen synthetisiert werden und als Corezeptoren für Wachstumsfaktoren wie TGF- β dienen, indem sie Liganden an ihre Signalrezeptoren verteilen (Chen et al. 2004). Eine Stimulation mit TGF- β führt in vitro zu einer gesteigerten mRNA-Expression sowohl von Syndecan 2 in vaskulären glatten Muskelzellen aus Rattenaortae (Cizmeci-Smith et al. 1993) als auch von Syndecan 1 in humanen koronaren SMCs (Schmidt et al. 2006), was eine Beteiligung von TGF- β an der Vermittlung von Statineffekten nahelegt. Weiterhin ist Syndecan 2 an Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt mit Matrixproteinen wie Laminin, Fibronectin und kontrolliert die Matrixansammlung an der Zelloberfläche, die bei Zellen mit einem Antisensegen für Syndecan 2 vollständig verloren geht (Klass et al. 2000) und damit die wichtige Bedeutung von Syndecan 2 für die ECM-Assemblierung unterstreicht. Eine Wirkung von Lovastatin auf die mRNA Expression von Syndecan 1, 3 und 4 konnte in den vorliegenden Daten nicht nachgewiesen werden.

In den Ergebnissen dieser Arbeit ist die Lovastatinassoziierte Erhöhung in der Expression der mRNA von Perlecan (164 %; $p = 0,12$) trotz ähnlich steigender Tendenz in drei unabhängigen Experimenten nicht signifikant. Perlecan ist als Heparansulfatproteoglykan (HSPG) ein wichtiger Bestandteil der Gefäßwand, der von vaskulären Zellen synthetisiert und dessen Expression durch Inhibitoren der SMC Proliferation wie TGF- β_1 erhöht wird (Kinsella et al. 2003). Perlecan kann in vitro direkt die SMC Proliferation hemmen und limitiert durch Akkumulation nach vaskulärer Verletzung die SMC Proliferation auch im Tiermodell (Kinsella et al. 2003). Diese Inhibition wird vermittelt durch die Bindung bzw. Modifikation Heparin-bindender Wachstumsfaktoren sowie von HS-Bindungsdomänen von ECM-Proteinen wie Fibronectin und Laminin durch Perlecan, wodurch direkt oder indirekt

eine Beeinflussung von Zell-ECM-Interaktionen erfolgt, die wichtig für die Kontrolle von Zellproliferation, Migration und Phänotypexpression glatter Muskelzellen sind (Kinsella et al. 2003). Zudem hemmt Perlecan die Adhäsion von Fibronektin an vaskuläre glatte Muskelzellen und dadurch Fibronektinassoziierte Integrinsignale, die die Zellproliferation durch Wachstumsfaktorstimulation vermitteln (Lundmark et al. 2001). Perlecan ist auch in die bFGF Signaltransduktion involviert, indem es die Bindung von bFGF an einen hochaffinen Rezeptor fördert und dadurch moduliert (Aviezer D et al. 1994). Eine Suppression der Zellproliferation kann demnach zum Teil auch durch eine gesteigerte Perlecanakkumulation bedingt sein und das Ausmaß der Intimaexpansion und Gefäßstenose auf diese Weise begrenzen. Bei allen anderen verwendeten Primern dieser Arbeit (Biglykan, Decorin, Versican) konnten keine signifikanten Unterschiede auf mRNA Ebene festgestellt werden. Die Arbeitsgruppe Riessen et al. konnte allerdings 1999 und 2003 zeigen, dass die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Lovastatin, Simvastatin und Cerivastatin einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die mRNA Expression in humanen arteriellen SMCs von Biglykan haben. Biglykan, ein normaler Bestandteil der vaskulären Intima und Media, sowie Decorin, das in normalen Gefäßwänden mit Ausnahme der Adventitia nicht vorkommt, wurden als charakteristische Bestandteile fortgeschrittener arteriosklerotischer und restenotischer Läsionen beobachtet (Riessen et al. 1994). Weiterhin können sowohl Biglykan als auch Decorin TGF- β binden und neutralisieren, was im Sinne eines natürlichen Feedbackmechanismus die biologische Aktivität von TGF- β und damit der ECM Formation regulieren könnte (Riessen et al. 1994), da TGF- β in vitro u.a. die Biglykanexpression erhöht und die Decorinexpression verringert (Schmidt et al. 2006).

Versican, ein von vaskulären Zellen synthetisiertes Chondroitinsulfatproteoglykan (CSPG), ist normaler Bestandteil von Blutgefäßen und stark erhöht in arteriosklerotischen Läsionen vor allem im Grenzbereich des nekrotischen Kerns in unmittelbarer Nähe zu abgelagerten Lipoproteinen (Wight et al. 2004). Die Retention von Lipoproteinen durch Komponenten der Extrazellulären Matrix ist ein kritischer Schritt in der Initiation der Atherogenese, vor allem Proteoglykane wie Versican (O´Brien

et al. 2004), Biglykan und Decorin werden mit der Ablagerung sowie Akkumulation von Lipoproteinen in Verbindung gebracht (Wight et al. 2004, Meyers et al. 2003, Schmidt et al. 2006). Die negativ geladenen Seitenketten der Proteoglykane interagieren hierbei mit den positiv geladenen Aminosäureresten von Apolipoprotein B und E, was zu einer Lipoproteinretention führt (Chait et al. 2000). Proliferierende SMCs synthetisieren Proteoglykane mit längeren Glucosaminoglykanketten, die LDL stärker binden als ruhende Zellen und dadurch proatherogen sind (Meyers et al. 2003). Statine hemmen die SMC Proliferation von Affen in vitro und führen zu einer Synthese von Proteoglykanen mit verlängerten Glucosaminoglykanseitenketten und herabgesetztem Sulfatierungsgrad dieser GAG Seitenketten, was deren negative Ladung verringert, dadurch die Bindungsaffinität für LDL senkt und so die Retention von Lipoproteinen in die Arterienwand verringert (Meyers et al. 2003). Dies ist neben der Plaquestabilisierung ein weiterer Statineffekt, der unabhängig von der Lipidsenkung für die Behandlung der Arteriosklerose von großer Bedeutung ist. Zytokine wie TGF- β_1 und bFGF sind an der Regulation der Synthese von Proteoglykanen wie Versican in glatten Muskelzellen beteiligt (Wight et al. 2004, Schmidt et al. 2006). Eine Behandlung von arteriellen SMCs von Affen mit TGF- β_1 erhöht allerdings durch eine Verlängerung der Glucosaminoglykanketten von Proteoglykanen die Bindung an LDL (Little et al. 2002) und unterstützt dadurch eine proatherogene Rolle von TGF- β .

5.3 Stabile und instabile arteriosklerotische Plaques

Die klinische Prognose von arteriosklerotischen Plaques wird nicht nur durch den Grad der Lumeneinengung sondern vielmehr durch die Struktur und Verletzbarkeit der Plaques bestimmt. Grundsätzlich wird unterschieden zwischen einer stabilen Plaque, mit dicker fibröser Kappe, kleinem Kern mit geringem Lipidanteil, wenig Entzündungszellen sowie dichter extrazellulärer Matrix, und einer instabilen, vulnerablen bzw. gefährlichen Plaque, die sich durch einen vergleichsweise großen lipidreichen nekrotischen Kern, eine dünne fibröse Kappe, viele Entzündungszellen (Makrophagen) und wenige

glatte Muskelzellen auszeichnet (Libby et al. 2002). Die Verletzbarkeit einer Plaque beruht u.a. darauf, dass sich im dünnsten Anteil der fibrösen Deckschicht überwiegend in der Schulterregion der Plaque am Übergang zur normalen Gefäßwand der mechanische Stress aus Scher- und Druckkräften des Blutstroms konzentriert und dadurch die Kappe einreißen kann (Lee et al. 1997), was zu einem akuten thrombogenen Geschehen führen kann. In einer arteriosklerotischen Läsion mit einer dünnen fibrösen Deckplatte und mäßigen Stenose (50-70%) ist der mechanische Stress und damit das Rupturrisiko stark erhöht (Li et al. 2006). Der Stenosegrad allein ist für das Rupturrisiko allerdings kein Hauptfaktor und verringert sogar bis zu einem gewissen Maß den mechanischen Stress, der auf die arteriosklerotische Plaque einwirkt (Lee 2000). Dies erklärt auch das in Studien beobachtete Phänomen, dass die meisten Plaques bereits bei einem Stenosegrad von weniger als 50% rupturieren (van der Wal et al. 1999). Gefäße mit vulnerablen lipidreichen arteriosklerotischen Plaques, die mit vielen Entzündungszellen infiltriert sind, sind häufiger assoziiert mit einer lokalen kompensatorischen Vasodilatation und nur geringfügigen Stenose, wohingegen fibröse stabilere Plaques häufig mit einer lokalen Kontraktion bzw. Schrumpfung der Gefäßwand einhergehen und so einen höheren Stenosegrad aufweisen (van der Wal et al. 1999). Weiterhin bestimmt die Lipidzusammensetzung der Plaque (Verhältnis von Cholesterinestern, Monohydratcholesterin und Phospholipiden) wie weich der Lipidkern ist und beeinflusst dadurch auch den mechanischen Stress auf die fibröse Deckschicht und das damit verbundene Rupturrisiko (Lee 2000). Biologische Faktoren, die die fibröse Kappe eines Atheroms schwächen können, sind eine verhältnismäßig herabgesetzte Kollagensynthese, ein gesteigerter Kollagenabbau durch Matrixmetalloproteinasen und eine erhöhte Infiltration der fibrösen Deckschicht mit Zellen (Makrophagen, T-Zellen), die u.a. diesen katabolen Stoffwechsel fördern, sowie eine verringerte Anzahl an glatten Muskelzellen, die vor allem durch die Synthese der Extrazellulären Matrix die mechanische Integrität der fibrösen Kappe aufrechterhalten (Lee et al. 1997). Die extrazelluläre Matrix der fibrösen Deckplatte hat eine entscheidene Stabilisierungsfunktion und unterliegt einem dynamischen

Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau. Dementsprechend wird intensiv über den Einfluss destabilisierender Mechanismen sowie das therapeutische Konzept der Plaquestabilisierung geforscht und diskutiert (Koh 2000, Lee 2000, Libby et al. 2002, Rackley 2002, Shah 1996, Shah 2002, Stoll et al. 2006, van der Wal et al. 1999). Vulnerable Plaques können unter anderem stabilisiert werden durch die Veränderung der Festigkeit der fibrösen Kappe (u.a. Reduktion der Entzündungsreaktion, Zunahme der extrazellulären Matrix und Verbesserung der Dysfunktion des Endothels) einerseits und durch Verkleinerung des Lipidkerns andererseits (Lee 2000). Potentielle Mechanismen hinsichtlich der Plaquestabilisierung durch Statine neben der durch die LDL-Cholesterinsenkung hervorgerufene Reduktion des lipidreichen Kerns sind: Herabsetzung des mechanischen Stresses auf die Fibröse Deckschicht, Förderung der Kollagensekretion und -reifung in der fibrösen Kappe, Senkung inflammatorischer Reize (Oxidativer Stress, Chemotaktische Faktoren), Verringerung der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und dadurch verringerte Einwanderung von Leukozyten (Monozythen, Makrophagen), Verbesserung der bei der Arteriosklerose gestörten Endothelfunktion (Thrombogenität) sowie direkte Effekte auf glatte Muskelzellen und Leukozyten (Lee 2000). Die mechanische Stärke arteriosklerotischer Plaques wird vor allem vom Gehalt an fibrillärem Kollagen sowie deren Querbrücken und der Verteilung in der Läsion bestimmt (Wight 1996), so dass sich Plaquerupturen vornehmlich am Übergang zwischen Kollagenreichen und Kollagenarmen Regionen der fibrösen Deckplatte, sogenannte Schulterregion der Plaque, ereignen (Wight 1995). Weiterhin konnte bezüglich der Stabilität der fibrösen Kappe und des Gehalts an Extrazellulärer Matrix gezeigt werden, dass Kollagen und Proteoglykane unterschiedlich in stabilen und instabilen Plaques verteilt sind, was bestätigt, dass nicht nur der ECM-Gehalt sondern vielmehr die Zusammensetzung herausragende Bedeutung für die Stabilität arteriosklerotischer Läsionen haben. Demnach waren stabile fibröse Kappen mit Versican, Biglykan und Kollagen I angereichert, wohingegen instabile Deckplatten vornehmlich Hyaluronsäure, Versican und Kollagen III aufwiesen, was von einer Reduktion alpha-Aktin positiver SMCs und der

gesamten Matrixmenge begleitet war (Kolodgie et al. 2002). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass Lovastatin das Syntheseprofil glatter Muskelzellen in vitro dahingehend verändert, dass die ECM Komponenten (Kollagene, Proteoglykane sowie regulative Wachstumsfaktoren) verstärkt exprimiert werden, die die mechanischen Eigenschaften der die Plaque bedeckenden fibrösen Deckschicht verbessern und so eine instabile vulnerable arteriosklerotische Läsion in eine stabile Plaque umwandeln können (Abb. 35). Zudem hemmt Lovastatin die Zellteilung kultivierter glatter Muskelzellen und überführt diese in einen hypertrophen Wachstumsstatus mit vergrößertem Zellvolumen und erhöhtem Gesamtproteingehalt. Die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen spielen bei der Entstehung arteriosklerotischer Plaques eine wichtige Rolle, da die Muskelzellen teilweise in die Intima aus der Tunica media einwandern und sich dort unter Einwirkung von Wachstumsfaktoren durch Zellteilung vermehren. Diese zelluläre Akkumulation in der Intima sowie der Einfluss der Wachstumsfaktoren führen zu einem Wandumbau der betroffenen Arterie sowohl bei der Bildung arteriosklerotischer Plaques als auch bei der Entwicklung einer Restenose nach Angioplastie (Buddecke 2002). Klinischer Nutzen, der mit der antiproliferativen Wirkung der Statine auf glatte Muskelzellen verbunden ist, beinhaltet die Reduktion der Restenoserate (>50%) nach Stentimplantation und Angioplastie (Walter et al. 2000, Iwata et al. 2006, Sahni et al. 1991). Demnach ist eine Lovastatintherapie mit einer signifikant reduzierten Restenoserate nach Angioplastie (Lovastatingruppe: 12% und Kontrollgruppe: 44,4%; $p < 0,001$; Sahni et al. 1991) bzw. 25,4% in der Statingruppe verglichen mit 38% in der Kontrollgruppe und einem insgesamt besseren klinischen Resultat nach Stent Implantation assoziiert (Walter et al. 2000) sowie die Höhe des LDL-Cholesterinspiegels ein kritischer Faktor bei der Prävention einer Restenose nach Stentimplantation (Iwata et al. 2006).

In einem Tiermodell konnten Rekhter et al. 2000 demonstrieren, dass Hypercholesterinämie in arteriosklerotischen Plaques von Hasen zu Plaquewachstum und Plaquedestabilisierung führten, die wiederum mit einer Kollagendegradation und einem Verlust zellulärer Elemente als Quelle der

Kollagensynthese assoziiert war. Crisby et al. zeigten 2001 in einer klinischen Studie, dass die Behandlung mit Pravastatin in Proben arteriosklerotischer Plaques von Patienten, die sich einer Endarterioektomie unterzogen, mit signifikanten Veränderungen der Plaquezusammensetzung assoziiert waren. Eine Pravastatin induzierte Lipidsenkende Therapie führte in arteriosklerotischen Läsionen zu einem geringeren Lipidgehalt, zu einer herabgesetzten LDL-Oxidation, zu einer Verminderung der Entzündung (weniger Makrophagen und T-Zellen), zu einer Abnahme der Apotoserate von glatten Muskelzellen, zu einem Rückgang von MMP-2 (Matrixmetalloproteinase 2) und demgegenüber zu einer Erhöhung von TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1) sowie zu einem Anstieg des Kollagenanteils, was den Plaquestabilisierenden Effekt der Statine beim Menschen bestätigt (Crisby et al. 2001).

Eine Statinassoziierte Überexpression von TGF- β_1 (Park et al. 1999, Porreca et al. 2002, Baccante et al. 2004), wie sie auch in den Daten dieser Arbeit ermittelt wurde, kann ebenfalls als plaquestabilisierend betrachtet werden, da TGF- β die Stabilität arteriosklerotischer Läsionen im wesentlichen durch zwei Mechanismen fördert, einerseits durch Stimulation der ECM Produktion durch vaskuläre SMCs und die dadurch bedingte Stärkung der fibrösen Deckplatte, sowie andererseits durch Begrenzung der Inflammation und direkte oder indirekte Suppression der T-Zellaktivität (Bobik 2006). Tatsächlich ist die Expression von TGF- β_1 in asymptomatischen humanen arteriosklerotischen Läsionen signifikant erhöht (Cipollone et al. 2004) und diese Läsionen weisen eine geringere Infiltration mit Entzündungszellen (Makrophagen, T-Lymphozyten) sowie einen höheren Kollagengehalt auf. Demgegenüber führt eine Hemmung der TGF- β_1 Signalkaskade zu einer Beschleunigung der Progression der Arteriosklerose und ruft einen instabilen Plauephänotypen bei Mäusen hervor, der durch erhöhte inflammatorische Komponenten sowie eine Kollagenreduktion gekennzeichnet ist (Mallat et al. 2001).

5.4 Regulative Effekte von Wachstums- und Transformationsfaktoren

Das vaskuläre Gewebe ist dem ständigen Einfluss von verschiedenen Faktoren wie dem Wachstumsfaktor Fibroblast Growth Factor (FGF) und Transformationsfaktor Transforming Growth Faktor β (TGF- β) ausgesetzt, die eine wichtige regulative Rolle sowohl beim physiologischen Remodelling der Gefäßwand als auch bei pathologischen vaskulären Umbauvorgängen im Rahmen arteriosklerotischer Gefäßveränderungen spielen (Chabrier 1996). Die TGF- β Superfamilie besteht aus zahlreichen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, welche die transformierenden Growth Faktoren TGF- $\beta_{1,2,3}$ einschließen und deren Mitglieder an der Embryonalentwicklung und an der Homöostase erwachsener Gewebe beteiligt sind. TGF- β ist ein potenter anti-inflammatorischer, immunsuppressiver und profibrotischer Faktor, der die immuno-inflammatorischen Balance in arteriosklerotischen Läsionen moduliert (Lutgens et al. 2002, Mallat et al. 2002, Tedgui et al. 2006, Grainger 2004) sowie als ein entscheidender Plaquestabilisierender Faktor (Mallat et al. 2001, Cipollone et al. 2004) ,wie Schmidt et al. 2006 zeigen konnten, in vitro in humanen koronaren SMCs eine spezifische Extrazelluläre Matrix generiert und dadurch eine potentielle antiatherogene Potenz besitzt. Grainger et al. zeigten 1995 erstmals, dass die Serumkonzentration von aktivem TGF- β in arteriosklerotischen Läsionen herabgesetzt ist, was eine Korrelation zwischen TGF- β Plasmaspiegel und Arteriosklerose bzw. die Bedeutung von TGF- β als diagnostischen bzw. prognostischen Marker nahe legte. Tatsächlich hatten Patienten mit manifester koronarer Herzkrankheit (CAD) und niedrigem TGF- β_1 Plasmaspiegel eine signifikant schlechtere Überlebensprognose als vergleichbare Patienten mit hohen TGF- β_1 Plasmaspiegeln, was die prognostische Signifikanz von TGF- β_1 Plasmakonzentrationen bei Patienten mit CAD impliziert (Tashiro et al. 2002). Weiterhin konnten Cipollone et al. 2004 nachweisen, dass asymptotische Plaques, die durch Endarterioektomie gewonnen wurden, einen dreifach höheren Gehalt an TGF- β_1 hatten als vergleichbare symptomatische Plaques und zudem

weniger Makrophagen, T-Lymphozyten und mehr Kollagen enthielten. TGF- β_1 defiziente Mäuse sterben im Uterus bzw. perinatal durch unkontrollierte Entzündungen in nahezu jedem Organsystem (Tedgui et al. 2006, Lutgens et al. 2002), was auf die fehlenden potenten antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften von TGF- β_1 zurückzuführen ist. Die entscheidende Rolle von TGF- β_1 für die Regulation der ECM Produktion durch glatte Muskelzellen und für die Plaquestabilität wurde anhand von Studien mit apo E^{-/-} Mäusen nachgewiesen (Mallat et al. 2001, Lutgens et al. 2002), da TGF- β eine Reduktion der Entzündung in Plaques sowie eine spezifische Matrixproduktion herbeiführt. Neutralisierende TGF- β_1 , TGF- β_2 sowie TGF- β_3 Antikörper beschleunigen bei diesen apo E^{-/-} Mäusen die Entwicklung der Arteriosklerose mit arteriosklerotischen Läsionen, die mehr Entzündungszellen und weniger Kollagen enthielten (Mallat et al. 2001). Des Weiteren verursachte eine Behandlung von apo E^{-/-} Mäusen mit einem löslichen TGF- β -Rezeptor II Protein (TGF-RII:Fc), der die TGF- β Signalgebung blockiert, eine erhöhte Infiltration arteriosklerotischer Läsionen mit Makrophagen sowie T-Zellen und einen verminderten Kollagengehalt (Lutgens et al. 2002). Diese beiden sowie weitere, allerdings nicht alle (Little et al. 2002), Studien schreiben den regulativen Effekten von endogenem TGF- β eine protektive Rolle in der Atherogenese, speziell in der Plaquestabilisierung zu, da dieser transformierende Wachstumsfaktor das Gleichgewicht zwischen einem entzündeten instabilen Plaquephänotypen und einer stabilen Matrixreichen arteriosklerotischen Läsion regulieren kann.

Die vorliegenden Daten dieser Arbeit liefern zusätzliche Hinweise hinsichtlich eines protektiven Plaquestabilisierenden Potentials von TGF- β_1 wie auch der Statine, deren Wirkung mit einer Steigerung der TGF- β_1 Expression verbunden ist. TGF- β_1 wird von kultivierten glatten Muskelzellen unter Standardbedingungen nur in geringen Konzentrationen exprimiert. Unter dem Einfluss von HMG-Co-A-Reduktase-Inhibitoren (Simvastatin, Pravastatin, Atorvastatin) ist die TGF- β_1 Expression auf Transkriptionsebene signifikant erhöht (Park et al. 1999, Porreca et al. 2002, Baccante et al. 2004). In dieser experimentellen Arbeit führte eine 48 stündige Stimulation

mit 1.0 μM Lovastatin auf Protein- und Transkriptionsebene dosisabhängig zu einem signifikantem Upstream dieses Wachstumsfaktors, der sich vor allem im Zellkulturmedium signifikant erhöhte (auf den 2-4 fachen Wert ($p=0,03$) bezogen auf den Proteingehalt und gemessen an der Zellzahl). Diese Beobachtung korreliert mit der Feststellung, dass signifikant erhöhte TGF- β_1 Plasmaspiegel in vivo durch eine HMG-Co-A-Reduktase-Inhibition mit Pravastatin auftreten (Porreca et al. 2002) und mit einer insgesamt besseren Prognose sowie stabileren asymptomatischen arteriosklerotischen Läsionen einhergehen (Grainger et al. 1995, Tashiro et al. 2002, Cipollone et al. 2004). Der verbliebene Teil des überexprimierten TGF- β_1 ist überwiegend in der zellfreien subzellulären Matrix zu finden, wo eine Lovastatinbehandlung zu einer signifikanten Stimulation der TGF- β_1 Exprimierung um mehr als 100 % ($p=0,02$) führte. Die Lovastatinbehandlung der vaskulären glatten Muskelzellen war auf Transkriptionsebene mit einer statistisch signifikanten Steigerung der TGF- β_1 spezifischen mRNA um 29 % ($p=0,04$), die nach Translation die beobachtete Mehrsynthese von TGF- β_1 herbeiführte, verbunden. Die Annahme, dass die Lovastatinassoziierte Überexpression von TGF- β_1 die beobachtete gesteigerte Synthese von Komponenten der Extrazellulären Matrix beeinflusst, wird dadurch unterstützt, dass TGF- β_1 in vitro die Synthese von Kollagen I und III in humanen glatten Muskelzellen (Amento et al. 1991) sowie von Kollagen V in bovinen SMCs (Lawrence et al. 1994) stimuliert. Außerdem konnten Schmidt et al. zeigen, dass die Wirkung von exogenem TGF- β_1 auf kultivierte glatte Muskelzellen mit einem hypertrophen SMC Phänotyp mit erhöhtem Proteingehalt und einem Zellzyklusblock (Schmidt et al. 2001) sowie mit einer hochspezifischen stabilen Matrix assoziiert ist, die sich durch strukturelle Integrität und eine stabile Assemblierung ausgewählter ECM-Komponenten (Kollagentypen I und V, Biglykan, Syndecan 1, Fibronektin, Thrombospondin sowie bFGF) auszeichnet (Schmidt et al. 2006). Die in dieser Arbeit festgestellte Lovastatinbedingte Veränderung des Syntheseprofils der Extrazellulären Matrix glatter Muskelzellen (gesteigerte Synthese von Syndecan 1, Perlecan sowie Kollagen V und bFGF) sowie der antiproliferative und

Hypertrophieinduzierende Statineffekt könnte demnach durch die erhöhte TGF- β_1 -Expression getriggert sein und das Potential haben, die der Plaque aufliegenden fibröse Kappe zu stärken und dadurch deren mechanische Stabilität zu erhöhen (Abb. 35). Die Zugabe eines monoklonalen Anti-humanen TGF- β_1 Antikörpers konnte in den Experimenten dieser Arbeit die angenommene Wirkung von TGF- β_1 auf die Exprimierung der Extrazellulären Matrix, die anhand der Protein- und Kollagensynthese ($[^3\text{H}]$ Prolin Inkorporation) sowie der Proliferation humaner SMCs erhoben wurde, nur zum Teil aufheben. Baccante et al. konnten in vitro in humanen Makrophagen (THP-1) eine Pravastatinosisabhängige signifikante Erhöhung der TGF- β_1 mRNA- und Proteinexpression nachweisen, die simultan mit einer Suppression der scavenger receptor class A (SRA) Expression verbunden war. Dieser Pravastatineffekt konnte durch neutralisierende monoklonale anti-TGF- β_1 Antikörper vollständig aufgehoben werden (Baccante et al. 2003), was eine Beteiligung der TGF- β_1 abhängigen Signalweges auf die SRA Gen- und Proteinexpression suggeriert, im Sinne eines weiteren antiatherogenen Effektes durch Hemmung der Lipoproteinaufnahme in Makrophagen und die dadurch reduzierte Schaumzellenbildung.

Simvastatin stimuliert in kultivierten embryonalen atrialen Hühnerzellen die mRNA Expression von TGF- β R II und dessen Liganden TGF- β_1 durch Inhibition der posttranslationalen Geranylgeranylierung der Rho A GTPase, die für die korrekte Membranlokalisierung sowie Funktion dieses kleinen GTP bindenden Proteins benötigt wird und damit die Beteiligung des Cholesterinmetabolismus in der TGF- β Signalgebung nachweist (Park et al. 1999). Demnach führt eine erhöhte Substratverfügbarkeit für die Geranylgeranyltransferase in Form von exogenem GGPP oder durch Induktion des Cholesterinmetabolismus (durch LPDS, Lipoprotein-Depleted Serum) zu einer Inhibition der Expression von TGF- β R II und TGF- β_1 , da das geranylgeranylierte Protein RhoA GTPase die TGF- β Signalkaskade negativ reguliert (Park et al. 1999). Wenn TGF- β Signale die Substratverfügbarkeit für die posttranslationale Modifikation kleiner GTP-bindender Proteine reguliert, könnte ein autokriner Feedbackmechanismus

existieren (Abb. 35), durch den TGF- β die eigene Expression durch Kontrolle der Proteingeranylgeranylierung moduliert (Park et al. 1999). Da die mRNA Expression des TGF- β Rezeptortyps II in Zellen, die aus arteriosklerotischen Läsionen gewonnenen wurden, auffallend gegenüber normalen Zellen vermindert und die Signaltransduktion von TGF- β_1 konsekutiv herabgesetzt ist, allerdings prinzipiell intakt bleibt (McCaffrey 2000), scheint vor allem die Stimulation der Expression von TGF- β R II und dessen Liganden TGF- β_1 unter Statineinfluss (Park et al. 1999) das Potential zu besitzen, die protektive Signaltransduktion von TGF- β_1 in arteriosklerotischen Plaques wiederherstellen zu können. Die intrazelluläre Signaltransduktion von TGF- β wird durch Interaktion des Liganden mit dem TGF- β -Rezeptorkomplex initiiert und erfolgt unter Mitwirkung der SMAD Familie (Tedgui et al. 2006). SMAD-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 sind Effektoren mit Homologie zu den Drosophila MAD-Genen, wobei vor allem SMAD-2 und 3 an der Signaltransduktion und Wachstumsmodulation von TGF- β beteiligt sind. Die Mitglieder der TGF- β Superfamilie entfalten ihre Aktivität durch eine hochaffine Bindung an ein Paar von Membranproteinen, die als Rezeptortyp I und II bezeichnet werden, eine Serin/Threonin Kinase enthalten und in Anwesenheit des Liganden zu einem Signalkomplex assoziieren (Park et al. 1999). Die TGF- β Rezeptoren R I und R II sind an dem Signal der Wachstumshemmung beteiligt. TGF- β R III ist ein transmembranöses Heparansulfat haltiges Proteoglykan (Betaglykan), das TGF- β zwar bindet, jedoch nicht an der Signaltransduktion beteiligt ist. Die Bindung von TGF- β an die Rezeptoren R I und R II führt zur Phosphorylierung von SMAD 1/5/8 und SMAD 2/3, die wiederum SMAD 4 binden, das nach Durchquerung der Kernmembran mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagiert, um die Transkription von Genen durch TGF- β -responsive elements zu regulieren (Kubota et al. 2003) und die TGF- β Effekte auf Zellebene zu vermitteln (Lutgens et al. 2002) (Abb. 35).

Zusammenfassend lassen vorliegenden Ergebnisse den Schluss zu, dass ein HMG-Co-A-Reduktase-Inhibitoren assoziierter Anstieg von TGF- β_1 sowie Veränderungen der TGF- β_1 Signalgebung in zweierlei Hinsicht von therapeutischem Nutzen sein können. Einerseits führt der profibrotische

Faktor TGF- β_1 zu einer Induktion spezifischer Extrazellulärer Matrixkomponenten, die Plaquestabilisierendes Potential besitzen, andererseits hat dieser Wachstumsfaktor antiinflammatorische Eigenschaften, die dazu beitragen könnten, vulnerable instabile Plaques zu stabilisieren.

Fibroblast Growth Factors sind eine große Familie von Wachstumsfaktoren, die an der Regulation von Zellwachstum, Replikation sowie Differenzierung beteiligt sind und Veränderungen der Migration, Morphologie, Funktion und Proliferation von vaskulären Zellen hervorrufen (Galzie et al. 1997). Die wichtigsten Vertreter der Fibroblast Growth Factor Familie sind basic und acidic FGF, die eine beträchtliche strukturelle Homologie aufweisen und sich im Grunde genommen durch ihren basischen (9,6) bzw. sauren (5,6) isoelektrischen Punkt unterscheiden (Chabrier 1996). Der Wachstumsfaktor bFGF (FGF-2) ist eine starke mitogene Substanz für vaskuläre glatte Muskelzellen in vitro und in vivo. Unter normalen in vitro Bedingungen verbleibt ein Großteil der glatten Muskelzellen in der G₀-Phase des Zellzyklus und das Zellwachstum wird unter anderem durch endogene Wachstumsfaktoren wie bFGF reguliert, dessen mitogene Eigenschaften zu einem Wiedereintritt von SMCs in den Zellzyklus, zu Proliferation und Migration führen (Schmidt et al. 1999).

Das neu von kultivierten glatten Muskelzellen synthetisierte bFGF wird in Abhängigkeit vom Wachstumsstatus in verschiedene Kompartimente verteilt. Eine Stimulation mit 1.0 μ M Lovastatin führt nach einer Inkubation von 48 h zu einer Hochregulation dieses Wachstumsfaktors auf Protein- und Transkriptionsebene (Steigerung der bFGF Expression von 15%; p= 0,04) sowie zu einer spezifischen Verteilung auf verschiedene Kompartimente. Im Zellkulturmedium war in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die Erhöhung des bFGF Gehaltes entgegen Ergebnissen früherer Studien an kultivierten bovinen SMCs, wo in vitro unter Kontrollbedingungen kein bFGF im Zellkulturmedium nachgewiesen werden konnte (Schmidt et al. 1995), am stärksten sowohl bezogen auf den Proteingehalt als auch gemessen an der Zellzahl. Ursache für diesen selektiven bFGF Anstieg im Medium könnte ein unter Lovastatineinfluss moderater Anstieg der Apoptoserate sein, so

dass das nicht sezernierte bFGF durch Apoptose oder durch eine Verletzungsbedingte transiente Unterbrechung der Plasmamembran aus dem Intrazellulärraum freigesetzt werden könnte (Schmidt et al. 1995). Bei höheren Lovastatinkonzentrationen ($< 2,0 \mu\text{M}$) sind im Medium zwar vermehrt zytoplasmatische Mono- und Oligonukleosomen nachweisbar, allerdings ist das zytotoxische Potential der in den Experimenten eingesetzten Lovastatinkonzentration von $1.0 \mu\text{M}$ anhand des durchgeführten Cell Death Detection Elisa^{PLUS} als sehr gering einzustufen. Weiterhin sind als bFGF Freisetzungsmechanismen auch endo- und exozytotische Prozesse bekannt (Schmidt et al. 1995). Schmidt et al. konnten zeigen, dass bFGF in Abhängigkeit des Wachstumsstatus glatter Muskelzellen *in vitro* im wesentlichen in den Intrazellulärraum und Perizellulärraum verteilt wird, wobei in exponentiell wachsenden SMCs der intrazelluläre bFGF Gehalt (80%) sinkt und in das Zell-assoziierte Kompartiment transferiert wird, was durch den simultanen Anstieg des perizellulären bFGF (20%) deutlich wird, so dass die bFGF induzierte SMC Proliferation u.a. von der perizellulären Lokalisation von bFGF abhängt. Lovastatin führt zu einer Arretierung des Zellzyklus glatter Muskelzellen, der mit einem hypertrophen Wachstumsstatus verbunden ist, und simultan zu einer Stimulation der bFGF Expression vor allem im Intrazellulärraum, was charakteristisch ist für sich nicht teilende SMCs. Ein Teil des durch den Lovastatineinfluss überexprimierten bFGF ist in den durchgeführten Experimenten im Intra- und Perizellulärraum sowie in der zellfreien subzellulären Matrix zu finden. Diese durch Heparansulfat inaktiv gebundene Form von bFGF könnte eine Art bFGF Speicher sein, der freigesetzt werden kann falls ein Wiedereintritt der SMCs in den Zellzyklus stattfindet (Schmidt et al. 2006). Basic und acidic FGF haben eine hohe Bindungsaffinität für Glucosaminoglykane und Heparin, das die FGF Wirkung durch den Schutz vor Abbau sowie durch eine erhöhte Rezeptoraffinität verstärkt (Chabrier 1996). Weiterhin ist die Bildung eines bFGF-Heparansulfatproteoglykan (HSPG)- Komplexes notwendig für die korrekte Bindung von bFGF an dessen hochaffinen transmembranösen Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, wobei ein aktiver trimolekularer Komplex aus

Heparansulfat (HS), bFGF und dem bFGF Rezeptor entsteht (Schmidt et al. 1995). Während des Übergangs zwischen proliferierendem Wachstumsstatus und dem Zustand sich nicht teilender glatter Muskelzellen erfolgen auch strukturelle Veränderungen transmembranöser Proteoheparansulfate, die durch diese spezifischen Strukturveränderungen die bFGF Rezeptorbindung und Signaltransduktion beeinflussen können (Schmidt et al. 1995). Durch die Bindung des Wachstumsfaktors bFGF an seinen spezifischen Tyrosinkinase Zellmembranrezeptor (FGF-R1) wird eine Sequenz von Proteinkinase-Reaktionen ausgelöst, die zur Phosphorylierung und Aktivierung des Ras induzierten mitogen-activated-protein-kinase (MAPK) Pfades führen (Skaletz-Rorowski 2001). Für die bFGF induzierte Stimulation der Proliferation glatter Muskelzellen ist die Aktivierung der MAPK durch eine spezifische Proteinkinase C Isoform (PKC) notwendig (Skaletz-Rorowski 1999). Die phosphorylierte und aktivierte MAPK migriert in den Nukleus, wo es verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphoryliert (Skaletz-Rorowski 2001) und dadurch die biologischen bFGF Effekte durch Veränderung der Genexpression vermittelt. Das Ausmaß der Proteinphosphorylierung ist abhängig von einem Gleichgewicht zwischen Kinasen und Phosphatasen, wobei HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren wie Lovastatin in bovinen glatten Muskelzellen die PP-1 Phosphatase hemmen, die für die bFGF induzierte DNA Synthese in SMCs benötigt wird (Skaletz-Rorowski 2001). Durch die Inhibition der PP-1 Phosphatase, die für die Dephosphorylierung und Inaktivierung der PKC verantwortlich ist, wird die PKC Aktivität gesteigert, was dementsprechend auch zu einer verlängerten Phosphorylierung sowie Aktivierung der MAPK führt und auf diese Weise die Zellzyklusarretierung der SMCs verursacht (Skaletz-Rorowski 2001). Da Lovastatin diesen wichtigen Wachstumsfaktorsignalweg unterbricht, ist es auch in dieser Hinsicht von potentiell therapeutischen Nutzen, da die unkontrollierte Proliferation vaskulärer Zellen in arteriosklerotischen Läsionen inhibiert werden kann.

Das überexprimierte FGF-2 könnte eine Kontrollfunktion in der TGF- β_1 Signaltransduktion haben, da dieser Wachstumsfaktor unter anderem die TGF- β stimulierte Matrixproduktion (Kollagen I und Elastinsynthese) in

5.5 Schlussfolgerungen und Perspektiven

Die vaskuläre extrazelluläre Matrix einschließlich spezialisierter Zellen ist ein für die Struktur und Funktion von Gefäßen grundlegendes System. Die Regulation der ECM Komponenten ist für die normale Gefäßfunktion von höchster Wichtigkeit, was die Entstehung arteriosklerotischer Gefäßläsionen im Falle einer Dysregulation der Proteinexpression veranschaulicht.

Die derzeitige klinische Therapie und Prävention der Arteriosklerose konzentriert sich nach wie vor auf die Senkung des LDL-Cholesterinspiegels, jedoch lassen die vorliegenden Ergebnisse den Schluss zu, dass die Beeinflussung der vaskulären extrazellulären Matrix sowie der Signalgebung der Wachstums- und Transformationsfaktoren durch HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren wie Lovastatin ein zusätzliches Interventionsfeld in der Prävention und Therapie der Arteriosklerose darstellen. Statine wirken sich auf die posttranslationale Modifikation sowie Isoprenylierung aus, die wichtig für die Membranlokalisation und biologische Aktivität von zahlreichen Proteinen, einschließlich Adapterproteine und Enzyme der Signaltransduktionswege, sind. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine Statinbehandlung vaskulärer glatter Muskelzellen in vitro zu einer signifikanten Veränderung des ECM-Syntheseprofils durch Induktion der Expression spezifischer ECM-Komponenten wie Syndecan 2, Kollagen V und Perlecan sowie bFGF und TGF- β_1 führt, die die mechanischen Eigenschaften der fibrösen Deckplatte per se bzw. durch profibrotische und antiinflammatorische Effekte verbessern können (Abb. 35). Die erhobenen Ergebnisse sowie die derzeitige Datenlage über HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren verstärken dadurch die Hypothese, dass Statine ein innovatives pharmakologisches Potential besitzen, nicht nur für die Lipidsenkende Therapie und Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen, sondern auch für die Stabilisierung arteriosklerotischer Plaques und dadurch bedingten Senkung des koronaren Gesamtrisikos von CAD Patienten. In Zukunft werden weitere Statinstudien zu einem besseren Verständnis der exakten pathophysiologischen Mechanismen der Atherogenese führen und die therapeutischen Möglichkeiten auch bei anderen Erkrankungen verbessern.

6.0 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
∅	Durchmesser
(Autokl. dest.) H ₂ O	(Autoklaviertes destilliertes) Wasser
(v)SMC(s)	(vascular) Smooth Muscle Cell(s)
[³⁵ S]Sulfat	Natrium [³⁵ S]Sulfat
[³ H]Prolin	[2,3- ³ H]Prolin
[³ H]Thymidin	[Methyl- ³ H]Thymidin
4S Studie	Scandinavian Simvastatin Survival Studie
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
AFCAP/TexCAP Studie	Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention
AK	Antikörper
apo E ^{-/-}	Apolipoprotein E defizient
bFGF (FGF-2)	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
CAD	Coronary artery disease
CAM	Cell Adhesion Molecule
CARE Studie	Cholesterol and Recurrent Events Studie
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Col	Kollagen
CRP	C-reaktives Protein
CSPG	Chondroitinsulfatproteoglykan
CYP 450	Cytochrom P450
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSPG	Dermatansulfatproteoglykan

ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEL	external elastic lamina
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
eNOS	endotheliale Stickstoffoxidsynthase
e-Selektin	endotheliales Selektin
EtOH	Ethanol
FGF-R1	Fibroblast Growth Factor Rezeptor 1
FPP	Farnesylpyrophosphat
GAG	Glucosaminoglykan
GDP	Guanosindiphosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GM-CSF	Granulocyte Macrophage colony stimulating factor
GTP	Guanosintriphosphat
GTP-ase	Guanosintriphosphatase
H ₄ B-Oxidation	Tetrahydrobiopterinoxidation
HCl	Salzsäure
HDL	High-Density-Lipoprotein
HMG-Co-A-Reduktase-Inhibitor	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Inhibitor
HP Studie	Heart Protektion Studie
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HWZ	Halbwertszeit
ICAM-1	Intracellular Cell Adhesion Molecule-1
IDL	Intermediate-density-Lipoprotein
IDV	Integrated Density Value
IEL	internal elastic lamina
IFN-gamma	Interferon-gamma
IL	Interleukin

KHK (CHK)	Koronare Herzkrankheit
KSPG	Keratansulfatproteoglykan
LDL(-C)	Low Density Lipoprotein (-Cholesterin)
LIPID Studie	Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease Studie
LP(a)	Lipoprotein (a)
LPDS	Lipoprotein-Depleted Serum
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MEK	MAP-Kinasekinase
MHC II	class II major histocompatibility antigen
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MS	Multiple Sklerose
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natronlauge
NO	Stickstoffmonoxid
p	p-Wert
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RA	Rheumatischer Arthritis
RGD	Arg-Gly-Asp-Sequenzen
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SLE	systemischer Lupus Erythematodes
SMAD	TGF- β Signalmoleküle (Kombination aus der <i>Drosophila</i> (mad) und

	<i>C.elegans</i> (sma) Nomenklatur)
SRA	Scavenger Rezeptor Class A
SREBP	Sterol response element binding protein
β-ME	β-Merkaptoethanol
STDEV	Standardabweichung
Statin	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Inhibitor
Syn	Syndecan
TAE-Puffer	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
TAK-1	TGF-β activated Kinase 1
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
TCA	Trichloressigsäure
TF	Tissue Faktor
TGF-RII:Fc	TGF-β-Rezeptor II Protein
TGF-β R I/II/III	TGF-β Rezeptoren R I /R II/RIII
TGF-β _{1,2,3}	Transforming Growth Factor beta _{1,2,3}
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1
TNF-alpha	Tumor necrosis factor alpha
TRAP-1	TGF-β Rezeptor-assoziiertes Protein-1
TSP	Thrombospondin
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VLDL	Very-Low-Density-Lipoproteine
WOSCOP Studie	West of Scotland Coronary Prevention Studie

7.0 Literaturverzeichnis

- [1] Alberts AW (1988) biochemistry and biology of Lovastatin. Am J Cardiol 62:10J-15

- [2] Almuti K, Rimawi R, Spevack D, Ostfeld RJ (2006) Effects of statins beyond lipid lowering: potential for clinical benefits. Int J Cardiol 109:7-15

- [3] Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P (1991) Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb 11(5):1223-30

- [4] Aviezer D, Hecht D, Safran M, Eisinger M, David G, Yayon A (1994) Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. Cell 79(6):1005-13

- [5] Axel DI, Riessen R, Runge H, Viebahn R, Karsch KR (2000) Effects of cerivastatin on human arterial smooth muscle cell proliferation and migration in transfilter cocultures. J Cardiovasc Pharmacol (4):619-29

- [6] Baccante G, Mincione G, Di Marcantonio MC, Piccirelli A, Cuccurullo F, Porreca E (2004) Pravastatin up-regulates transforming growth factor-beta1 in THP-1 human macrophages: effect on scavenger receptor class A expression. Biochem Biophys Res Commun 314(3):704-10

- [7] Behrendt D, Ganz P (2002) Endothelial Function: From vascular biology to clinical applications. Am J Cardiol 90:L40-L48

- [8] Bellosta S, Bernini F, Ferri N, Quarato P, Canavesi M, Arnaboldi L, Fumagalli R, Paoletti R, Corsini A (1998) Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis* 137 Suppl:S101-9
- [9] Bobik A (2006) Transforming growth factor- β s and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1712-1720
- [10] Bou-Gharios G, Ponticos M, Rajkumar V, Abraham D (2004) Extracellular matrix in vascular networks. *Cell Prolif* 37:207-220
- [11] Buddecke E (2002) Arteriosklerose/Atherosklerose. In: *Molekulare Medizin – eine systematische Einführung*. Ecomed S 127-144
- [12] Chabrier PE (1996) Growth Factors and vascular wall. *Int Angiol* 15:100-3
- [13] Chait A, Wight TN (2000) Interaction of native and modified low-density lipoproteins with extracellular matrix. *Curr Opin Lipidol* 11(5):457-63
- [14] Chen L, Klass C, Woods A (2004) Syndecan-2 regulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 279(16):15715-8
- [15] Cipollone F, Fazio M, Mincione G, Iezzi A, Pini B, Cucurullo C, Uchino S, Spigonardo F, Di Nisio M, Cucurullo F, Mezzetti A, Porreca E (2004) Increased expression of transforming growth factor-beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. *Stroke* 35(10):2253-7
- [16] Cizmeci-Smith G, Stahl RC, Showalter LJ, Carey DJ (1993) Differential expression of transmembrane proteoglycans in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 268(25):18740-7

- [17] Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J (2001) Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation* 103(7):926-33
- [18] Davidson JM, Zoia O, Liu JM (1993) Modulation of transforming growth factor-beta 1 stimulated elastin and collagen production and proliferation in porcine vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-alpha, and insulin-like growth factor-I. *J Cell Physiol* 155(1):149-56
- [19] Galzie Z, Kinsella AR, Smith JA (1997) Fibroblast growth factors and their receptors. *Biochem Cell Biol* 75(6):669-85
- [20] Grainger DJ (2004) Transforming growth factor β and atherosclerosis: so far, so good for the protective Cytokine Hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:399-404
- [21] Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR, Grace AA, Schofield PM, Chauhan A (1995) The serum concentration of active transforming growth factor- β is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med* 1:74-9
- [22] Grines CL (2006) The role of statins in reversing atherosclerosis: what the latest regression studies show. *J Interv Cardiol* 19(1):3-9
- [23] Haass M (2002) Kardioprotektion bei Hochrisikopatienten: Synergismus zwischen CSE-Hemmern und ACE-Hemmern? *Klinik & Forschung Spezial, Statine: Nutzen und Risiko* 78-9

- [24] Igel M, Sudhop T, von Bergmann K (2002) Pharmakologie der Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A-Reduktase (Statine, CSE-Hemmer). *Klinik & Forschung Spezial, Statine: Nutzen und Risiko* 82-6
- [25] Istvan ES, Deisenhofer J (2002) Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J* 144:27-32
- [26] Iwata A, Miura S, Shirai K, Kawamura A, Tomita S, Matsuo Y, Zhang B, Nishikawa H, Kumagai K, Matsuo K, Saku K (2006) Lower level of low-density lipoprotein cholesterol by statin prevents progression of coronary restenosis after successful stenting in acute myocardial infarction. *Intern Med* 45(15):885-90
- [27] Jakobisiak M; Bruno S; Skierski JS, Darzynkiewicz Z (1991) Cell cycle-specific effects of Lovastatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3628-32
- [28] Kawai-Kowase K, Sato H, Oyama Y, Kanai H, Sato M, Doi H, Kurabayashi M (2004) Basic fibroblast growth factor antagonizes transforming growth factor-beta1-induced smooth muscle gene expression through extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(8):1384-90
- [29] Kennedy SH, Qin H, Lin L, Tan EM (1995) Basic fibroblast growth factor regulates type I collagen and collagenase gene expression in human smooth muscle cells. *Am J Pathol* 146(3):764-71
- [30] Klass CM, Couchman JR, Woods A (2000) Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan. *J Cell Sci* 113 (Pt 3):493-506

- [31] Koh KK (2000) Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation and plaque stability. *Cardiovasc Res* 47:648-57
- [32] Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, Wight TN, Virmani R (2002) Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(10):1642-8
- [33] Kubota K, Okazaki J, Louie O, Kent KC, Liu B (2003) TGF-beta stimulates collagen (I) in vascular smooth muscle cells via a short element in the proximal collagen promoter. *J Surg Res* 109(1):43-50
- [34] Kypreos KE, Birk D, Trinkaus-Randall V, Hartmann DJ, Sonenshein GE (2000) Type V collagen regulates the assembly of collagen fibrils in cultures of bovine vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 80(1):146-55
- [35] Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2004) Vascular Effects of Statins Endothelial Function a Critical Determinant in Atherosclerosis? *Circulation* 109:II-27-II-33
- [36] Laufs U, Liao JK (2000) Direct Vascular Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Trends Cardiovasc Med* 10:143-148
- [37] Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK (1999) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem* 274(31):21926-31
- [38] Lawrence R, Hartmann DJ, Sonenshein GE (1994) Transforming growth factor β 1 stimulates type V collagen expression in bovine vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269:9603-9

- [39] Lee RT (2000) Plaque stabilization: the role of lipid lowering Int J Cardiol 74 Suppl 1:S11-5
- [40] Lee RT, Libby P (1997) The unstable atheroma. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(10):1859-67
- [41] Li ZY, Howarth SP, Tang T, Gillard JH (2006) How critical is fibrous cap thickness to carotid plaque stability? A flow-plaque interaction model. Stroke 37:1195-1199
- [42] Liao JK (2002) Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. Int J Cardiol 86(1):5-18
- [43] Liao JK (2002) Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. J Clin Invest 110(3):285-8
- [44] Liao JK, Laufs U (2005) Pleiotropic effects of statins. Annu Rev Pharmacol Toxicol 45:89-118
- [45] Libby P, Aikawa M (2002) Stabilization of atherosclerotic plaques: New mechanisms and clinical targets. Nat Med 11:1257-62
- [46] Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002) Inflammation and atherosclerosis. Circulation 105:1135
- [47] Little PJ, Tannock L, Olin KL, Chait A, Wight TN (2002) Proteoglycans synthesized by arterial smooth muscle cells in the presence of transforming growth factor-beta1 exhibit increased binding to LDLs. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22(1):55-60
- [48] Lundmark K, Tran PK, Kinsella MG, Clowes AW, Wight TN, Hedin U (2001) Perlecan inhibits smooth muscle cell adhesion to fibronectin: role of heparan sulfate. J Cell Physiol 188(1):67-74

- [49] Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Koteliansky VE, Daemen MJ (2002) Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(6):975-82
- [50] Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A (2001) Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 89(10):930-4
- [51] Mallat Z, Tedgui A (2002) The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives. *Curr Opin Lipidol* 13:523-529
- [52] McCaffrey TA (2000) TGF-betas and TGF-beta receptors in atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:103-14
- [53] Meyers CD, Tannock LR, Wight TN, Chait A (2003) Statin-exposed vascular smooth muscle cells secrete proteoglycans with decreased binding affinity for LDL. *J Lipid Res* 44(11):2152-60
- [54] Munro E, Patel M, Betteridge L, Clunn G, Gallagher K, Hughes A, Schachter M, Wolfe J, Sever P (1994) Inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by lovastatin: the role of isoprenoid intermediates of cholesterol synthesis. *Eur J Clin Invest* 24:766-772
- [55] Newby AC, Zaltsman AB (1999) Fibrous cap formation or destruction- the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res* 41;345-360
- [56] O'Brien KD, Lewis K, Fischer JW, Johnson P, Hwang JY, Knopp EA, Kinsella MG, Barrett PH, Chait A, Wight TN (2004) Smooth muscle cell

biglycan overexpression results in increased lipoprotein retention on extracellular matrix: implications for the retention of lipoproteins in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 177(1):29-35

- [57] Owens GK, Geisterfer AA, Yang YW, Komoriya A (1988) Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* 107(2):771-80
- [58] Park HJ, Galper JB (1999) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors up-regulate transforming growth factor-beta signaling in cultured heart cells via inhibition of geranylgeranylation of RhoA GTPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 28;96(20):11525-30
- [59] Porreca E, Di Febbo C, Baccante G, Di Nisio M, Cuccurullo F (2002) Increased transforming growth factor-beta(1) circulating levels and production in human monocytes after 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase inhibition with pravastatin. *J Am Coll Cardiol* 39(11):1752-7
- [60] Prosser LA, Stinnett AA, Goldman PA, Williams LW, Hunink MG, Goldman L, Weinstein MC (2000) Cost-effectiveness of cholesterol-lowering therapies according to selected patient characteristics. *Ann Intern Med* 132(10):769-79
- [61] Rackley CE (2002) Role of statin drugs in acute coronary syndromes. *Current atherosclerosis reports* 4;161-163
- [62] Rekhter MD (1999) Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res* 41;376-384
- [63] Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, Hallak H, Kindt E, Chen J, Rosebury WS, Anderson MK, Kuipers PJ, Ryan MJ (2000) Hypercholesterolemia causes mechanical weakening of rabbit

atheroma: local collagen loss as a prerequisite of plaque rupture. *Circ Res* 86;101-8

[64] Riessen R, Axel DI, Fenchel M, Herzog UU, Roßmann H, Karsch KR (1999) Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on extracellular matrix expression in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 94;322-332

[65] Riessen R, Isner JM, Blessing E, Loushin C, Nikol S, Wight TN (1994) Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries. *Am J Pathol* 144(5):962-74

[66] Ross R (1999) Mechanism of disease: atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-26

[67] Rutishauser J (2006) The role of statins in clinical medicine- cholesterol- lowering and beyond. *Swiss med wkly* 136:41-49

[68] Sahni R, Maniet AR, Voci G, Banka VS (1991) Prevention of restenosis by Lovastatin after successful coronary angioplasty. *Am Heart J* 121:1600-1608

[69] Sawada N, Itoh H, Ueyama K, Yamashita J, Doi K, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Saito T, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Arai H, Ohno N, Komeda M, Nakao K (2000) Inhibition of rho-associated kinase results in suppression of neointimal formation of balloon-injured arteries. *Circulation* 101(17):2030-3

[70] Schmidt A. Non-Lipid Lowering effects of Statins 2005 (in press)

[71] Schmidt A, Goepfert C, Feitsma K, Buddecke E (2002) Lovastatin-stimulated superinduction of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in TNF-

alpha activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 164;57-64

[72] Schmidt A, Goepfert C, Vlodavsky I, Völker W, Buddecke E (2002) Induction of a hypertrophic growth status of coronary smooth muscle cells is associated with an overexpression of TGF- β . *Eur J Cell Biol* 81;138-144

[73] Schmidt A, Lemming G, Yoshida K, Buddecke E (1992) Molecular organization and antiproliferative domains of arterial tissue heparan sulfate. *Eur J Cell Biol* 59(2):322-8

[74] Schmidt A, Lorkowski S, Seidler D, Breithardt G, Buddecke E (2006) TGF-beta1 generates a specific multicomponent extracellular matrix in human coronary SMC. *Eur J Clin Invest* 36(7):473-82

[75] Schmidt A, Skaletz-Rorowski A, Breithardt G, Buddecke E (1995) Growth status-dependent changes of bFGF compartmentalization and heparan sulfate structure in arterial smooth muscle cells. *Eur J Cell Biol* 67(2):130-5

[76] Schmidt A, Vlodavsky I, Völker W, Buddecke E (1999) Differentiation of coronary smooth muscle cells to a cell cycle-arrested hypertrophic growth status by synthetic non-toxic heparin-mimicking compound. *Atherosclerosis* 147;387-397

[77] Shah P (2003) Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J Am Coll Cardiol* 41:15S-22S

[78] Shah P (1996) Pathophysiology of plaque rupture and the concept of plaque stabilization. *Cardiol Clin* 14:17-29

[79] Siegel-Axel DI, Runge H, Seipel L, Riessen R (2003) Effects of cerivastatin on human arterial smooth muscle cell growth and

extracellular matrix expression at varying glucose and low-density lipoprotein levels. *J Cardiovasc Pharmacol* 41(3):422-33

- [80] Sindermann JR; Fan L, Weigel KA, Troyer D, Muller JG, Schmidt A, March KL, Breithardt G (2000) Differences in the effects of HMG-Co A reductase inhibitors on proliferation and viability of smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis* 150:331-41
- [81] Sindermann JR, Schmidt A, Breithardt G, Buddecke E (2001) Lovastatin controls signal transduction in vascular smooth muscle cells by modulating phosphorylation levels of mevalonate-independent pathways. *Basic Res Cardio* 96:283-89
- [82] Skaletz-Rorowski A, Müller JG, Kroke A, Waltenberger J, Pulawski E, Pinkernell K, Breithardt G (2001) Lovastatin blocks basic fibroblast growth factor- induced mitogen- activated protein kinase signaling in coronary smooth muscle cells via phosphatase inhibition. *Eur J Cell Biol* 80;207-212
- [83] Skaletz-Rorowski A, Waltenberger J, Muller JG, Pawlus E, Pinkernell K, Breithardt G (1999) Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor-induced proliferation through mitogen-activated protein kinase in coronary smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(7):1608-14
- [84] Stancu C, Sima A (2001) Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* 5:378-87
- [85] Stoll G, Martin Bendszus (2006) Inflammation and atherosclerosis – Novel insights into plaque formation and Destabilization. *Stroke* 37:1923-1932

- [86] Tashiro H, Shimokawa H, Sadamatu K, Yamamoto K (2002) Prognostic significance of plasma concentrations of transforming growth factor-beta in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 13(3):139-43
- [87] Tedgui A, Mallat Z (2006) Cytokines in Atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 86:515- 581
- [88] Teupser D, Thiery J (2002) „Update“ in der Pathogenese der Atherosklerose und neue Risikofaktoren der KHK. *Klinik & Forschung Spezial, Statine: Nutzen und Risiko* 92-4
- [89] van der Wal AC, Becker AE (1999) Atherosclerotic plaque rupture-pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc Res* 41:334-344
- [90] Vaughan CJ, Gotto AM Jr, Basson CT (2000) The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 35:1-10
- [91] Vincent TS, Wulfert E, Merler E (1991) Inhibition of growth factor signalling pathways by lovastatin. *Biochem Biophys Res Commun* 180:1284-89
- [92] Walter DH, Schachinger V, Elsner M, Mach S, Auch-Schwelk W, Zeiher AM (2000) Effect of statin therapy on restenosis after coronary stent implantation. *Am J Cardiol* 85(8):962-8
- [93] Waters David D (2006) What the statin trials have taught us. *Am J Cardiol* 98:129-134
- [94] Wight TN (1989) Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis* 9:1-20

- [95] Wight TN (1995) The extracellular matrix and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 6(5):326-34
- [96] Wight TN (1996) The vascular extracellular matrix. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ (Hrsg) *Atherosclerosis and Coronary Artery disease*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 421-440
- [97] Wight TN, Merrilees MJ (2004) Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res* 94(9):1158-67

Ich möchte Frau Prof. Dr. Annette Schmidt und Herrn Prof. Dr. Eckhart Buddecke für ihre grosse Unterstützung und für viele hilfreiche Diskussionen sowie konstruktive Anregungen bei der Entstehung dieser Arbeit danken.

Mein Dank gilt auch meinen lieben Eltern, Kerstin und Claus Ahrlich, die mich immer unterstützt haben, sowie meiner ganzen Familie und meinen lieben Freunden.

Außerdem danke ich all denen, die mich beim Erstellen meiner Dissertation begleitet haben, besonders Michaela Tirre für ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

