

**Die Rolle des Fibroblast Growth Factor 7
im makrovaskulären System**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Zaber Khochfar
aus Frankfurt am Main

Gießen 2009

Aus dem Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung

W.G. Kerkhoff-Institut

Leiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Thomas Braun

Gutachterin: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Schaper

Gutachterin: Prof. Dr. G. Euler

Tag der Disputation: 08.03.2010

Für meinen Vater und Großvater

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündliche Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
I. Einleitung	1
1. Physiologie des Blutkreislaufes	2
2. Morphologie der Blutgefäße	2
2.1. Arterien	2
2.2. Kapillaren	3
3. Biologie des Gefäßwachstumes	4
3.1. Angiogenese	4
3.2. Arteriogenese	6
3.2.1. Morphologische Prinzipien	6
3.2.2. Molekulare Mechanismen	7
4. Gefäßaktive Zytokine und Wachstumsfaktoren	9
4.1. Fibroblast Growth Factor (FGF)	10
4.1.1. FGF-2 (basic FGF)	11
4.1.2. FGF-7/KGF (Keratinocyte Growth Factor) und dessen Rezeptor FGFR2/IIIb	11
4.2. Inflammatorische und antiinflammatorische Zytokine	14
4.1.3. Onkostatin M (OSM)	14
4.1.4. Interleukin-4 (IL-4)/ Interleukin 13 (IL-13)	15
5. Zielsetzung	16
II. Materialien	17
1. Geräte und Software	17
2. Chemikalien	17
3. Antikörper	19
3.1. Erstantikörper	19
3.2. Zweitantikörper	20
4. Inhibitoren und Stimulatoren	20
5. Zytokine und Wachstumsfaktoren	21
6. Kommerzielle Kits	21

III. Methodik	22
1. Methoden der Zellkultur	22
1.1. Isolation und Kultur glatter Muskelzellen vom Schwein	22
1.2. Isolation und Kultur makrovaskulärer Endothelzellen vom Schwein	23
1.3. Passagieren von Zellen	23
1.4. Charakterisierung von Zellen	23
1.5. FACS-Analyse (Fluorescence-Activated Cell Sorting)	24
2. Methoden der Proteinchemie	24
2.1. Präparation und Bestimmung von Proteinen	24
2.1.1. Präparation von Zelllysaten glatter Muskelzellen und Endothelzellen	24
2.1.2. Präparation von Zellüberständen glatter Muskelzellen und Endothelzellen	25
2.1.3. Fraktionierung der Kompartimente	25
2.1.4. Bestimmung von Proteinkonzentrationen glatter Muskelzellen und Endothelzellen	25
2.2. Western Blot Analyse	26
2.2.1. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	26
2.2.2. Proteintransfer	27
2.2.3. Immunologische Detektion von Proteinen	28
2.3. Quantifizierung und statistische Auswertung	29
2.4. 2D-Gelelektrophorese	29
2.4.1. Probenvorbereitung	30
2.4.2. Isoelektrische Fokussierung der 1. Dimension	30
2.4.3. Auftrennung der Proteine in der 2. Dimension	30
2.5. Visualisierung und Evaluation der Ergebnisse	31
2.5.1. Silberfärbung für Proteine	31
2.5.2. Massenspektrometrische Identifizierung von 2D-elektrophoretisch getrennten Proteinen	31
2.6. Multiplex System	32
3. Immunfluoreszenz	32
IV. Ergebnisse	34
1. FGF-7 Expression in wachsenden Kollateralarterien	34
2. Charakterisierung glatter Muskelzellen	34
3. 2-D gelelektrophoretische Analyse des sezernierten Proteoms glatter Muskelzellen und Endothelzellen	36

4.	Immunologische Detektion von FGF-7 im Überstand glatter Muskelzellen	37
5.	Sezerniertes FGF-7 ist ein Glykoprotein	38
6.	Glatte Muskelzellen als Hauptquelle der FGF-7 Expression in vitro	39
7.	Welche Faktoren sind an der Regulation des FGF-7 beteiligt?	39
8.	Aktivierung diverser Signaltransduktionswege in glatten Muskelzellen durch Onkostatin M (OSM)	41
8.1.	Gp130 Rezeptoruntereinheit-Aktivierung durch Onkostatin M	42
8.2.	Effekte des OSM auf die Aktivierung des JAK-STAT und des PI3K-AKT Signaltransduktionsweges	43
8.3.	Effekte des OSM auf die Aktivierung der MAP-Kinasen	44
8.4.	Aktivierung der weiter „downstream“ liegenden MAPK-aktivierte Protein Kinase	47
8.5.	Effekte des OSM auf die Aktivierung der „MAPK-Interacting Kinase 1 und 2“ (MNK1/2)	49
8.6.	Effekte des OSM auf die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB und ATF-1	51
9.	Entschlüsselung des für die FGF-7 Sekretion entscheidenden Signaltransduktionsweges	52
9.1.	JAK-STAT und Akt-Signaltransduktionsweg	53
9.2.	JNK/SAPK und NF-κB („Nukleärer Faktor“-κB) Signaltransduktionsweg	54
9.3.	ERK1/2 und p38 MAPK-Signaltransduktionsweg	55
9.4.	CREB Signaltransduktionsweg	57
9.5.	MAPK-aktivierte Proteinkinasen (MK)	58
9.6.	MAPK-interacting Kinase 1 und 2 (MNK1/2)	59
9.7.	IL-13, ein physiologischer Inhibitor der OSM-induzierten FGF-7 Sekretion	61
10.	Zelluläre Lokalisation des FGF-7	61
10.1.	Nukleärer Nachweis von FGF-7	62
10.2.	Nachweis einer intrazellulären FGF-7 Regulation mit Hilfe der Immunofluoreszenz	63
10.3.	Nukleäre Translokation nach externer rFGF-7 Zugabe	64
10.4.	Inhibition der FGF-7 Internalisierung	67
10.5.	Mögliche Auswirkung der Glykosylierungen auf die Lokalisation des FGF-7	68

11.	Effekte des FGF-7 auf das vaskuläre System	70
11.1.	Nachweis des FGF-7 Rezeptors FGFR2/IIIb	70
11.2.	2-D gelelektrophoretische Analyse der FGF-7 Wirkung auf das sekretierte Proteom glatter Muskelzellen und Endothelzellen	70
11.3.	Effekte des FGF-7 auf arteriogenetische Prozesse	71
11.4.	FGF-7 induziert eine FGF-2 Sekretion in aortalen Endothelzellen	72
11.5.	FGF-7 Wirkung <i>in vivo</i>	72
11.5.1.	Nachweis vermehrter gefäßaktiver Substanzen im Serum	73
11.5.2.	Inhibition des Kollateralwachstums nach Palifermin Injektion	73
V.	Diskussion	77
1.	Vaskuläre glatte Muskelzellen des Schweins als Modell zur Untersuchung molekularer Mechanismen des Kollateralwachstums	77
2.	FGF-7 im vaskulären System	78
3.	MNK und nicht cAMP ist entscheidend für die FGF-7 Expression in vaskulären glatten Muskelzellen	80
4.	MNK, eine arteriogenese-relevante Kinase?	82
5.	Parakriner, autokriner und/oder intrakriner FGF-7 Wirkmechanismus	85
6.	FGF-7 Einfluss auf die Bildung neuer Gefäße	88
7.	Ausblick	90
VI.	Zusammenfassung	92
VII.	Summary	94
VIII.	Literaturverzeichnis	95
IX.	Abkürzungsverzeichnis	104
X.	Danksagung	106

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Gefäßwand, modifiziert nach Schiebler	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Angiogenese	5
Abbildung 3: Schematischer Ablauf der Arteriogenese	7
Abbildung 4: Hagen-Poiseuille Gesetz	9
Abbildung 5: Aufbau der „Blotting“-Kammer	27
Abbildung 6: Beispiel einer Ponceau-gefärbten Membran	28
Abbildung 6.1: Prinzip der Detektion mittels HRP-gebundenen Sekundäantikörper	28
Abbildung 7: FGF-7 Expression nach Ligatur	34
Abbildung 8: Vaskuläre glatte Muskelzellen	35
Abbildung 9: FACS Analyse glatter Muskelzellen	36
Abbildung 11: 2-D gelelektrophoretische Analyse	37
Abbildung 12: Detektion von FGF-7 mittels Western Blot	37
Abbildung 13: Darstellung FGF-7	38
Abbildung 14: Einsatz von PNGase F	39
Abbildung 15: FGF-7 Detektion im Überstand	39
Abbildung 16: Stimulation glatter Muskelzellen mit verschiedenen Faktoren	40
Abbildung 17: Stimulation von Endothelzellen mit verschiedenen Faktoren	41
Abbildung 18: Strategie zur Identifizierung des FGF-7 induzierenden Signalweges.	42
Abbildung 19: Rezeptor gp-130 Aktivierung	43
Abbildung 20: JAK-STAT und Akt Signalkaskade	44
Abbildung 21: ERK1/2 Signalkaskade	46
Abbildung 22: JNK/SAPK und p38 Signalkaskade	47
Abbildung 23: MAPK-aktivierte Kinasen (MK)	48
Abbildung 24: MNK1/2 und eIF4E	50
Abbildung 25: CREB Aktivierung durch OSM	51
Abbildung 26: Fortführung der Strategie zur Identifizierung des FGF-7 induzierenden Signalweges	53
Abbildung 27: Einsatz der Inhibitoren Tyr, LY, WT	54
Abbildung 28: Einsatz der Inhibitoren SP, IKK	55
Abbildung 29: Einsatz des Inhibitors UO	55
Abbildung 30: Einsatz der SB-Inhibitorengruppe	56
Abbildung 31: Kombiniertes Einsatz von UO und SB	57

Abbildung 32: Einsatz von CREB Regulatoren	58
Abbildung 33: Einsatz der Inhibitoren BI-D, SL, H89	59
Abbildung 34: Einsatz des Inhibitors CGP	60
Abbildung 35: CGP vs. UO/SB	61
Abbildung 36: Einsatz von IL-13 als Inhibitor	61
Abbildung 37: Fraktionierung nach Stimulation mit OSM und IL-13	62
Abbildung 38: Nachweis FGF-7 mittels Immunofluoreszenz	63
Abbildung 39: Nachweis einer intrazellulären FGF-7 Regulation mittels Immunofluoreszenz	64
Abbildung 40: Nukleäre Translokation von rFGF-7	65
Abbildung 41: Fraktionierung von rTNF α behandelten glatten Muskelzellen	66
Abbildung 42: Nachweis der nukleären Translokation von FGF-7 mittels Immunofluoreszenz	67
Abbildung 43: Inhibition der Internalisierung FGF-7	68
Abbildung 44: Zugabe von glykosyliertem FGF-7	70
Abbildung 45: 2-D gelelektrophoretische Analyse FGF-7 stimulierter Zellen	71
Abbildung 46: FGF-7 stimulierte Endothelzellen	72
Abbildung 47: Behandlung von Balb-c Mäusen mit Palifermin	73
Abbildung 48: Laser-Doppler-Imaging ligierter Mäuse	75
Abbildung 49: Statistische Auswertung der Abb.48	76
Abbildung 50: Zusammenfassung FGF-7 induzierender Signaltransduktionswege	82
Abbildung 51: „Upstream“ und „Downstream“ der MNK	85
Abbildung 52: Schematische Darstellung der FGF-7 Wirkweise	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	17
Tabelle 2: Software	17
Tabelle 3: Puffer, Lösungen und Gele	17
Tabelle 4: Erstantikörper	19
Tabelle 5: Zweitantikörper	20
Tabelle 6: Inhibitoren und Stimulatoren	20
Tabelle 7: Kommerzielle Kits	21
Tabelle 9: Protokoll zum Nachweis spezifischer Proteine mittels Antikörper	29
Tabelle 10: Arbeitsprotokoll zur Silberfärbung von Proteinen	31
Tabelle 11: Protokoll der immunhistologischen Färbungen	33

I. Einleitung

Der Blutkreislauf ist ein rasch regulierbares Transportsystem, das vor allem durch die Beförderung der Atemgase O₂ und CO₂ sowie den Transport von Nährstoffen und deren Metaboliten eine unabdingbare Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen darstellt. Darüber hinaus ist der Blutkreislauf für zahlreiche weitere Funktionen, wie Stofftransport im Dienst des Wasser- und Salzhaushaltes, Beförderung von Hormonen und Stoffen der Immunabwehr sowie Wärmetransport, von lebenswichtiger Bedeutung. Das Herz wiederum stellt das Instrumentarium dar, welches gewährleistet, dass das Blut an alle Orte gelangt und dabei in ständiger Bewegung gehalten wird. Einschränkung sowohl der Pumpfähigkeit des Herzens als auch eines ungehinderten Blutflusses durch die Gefäße hat meist letale Folgen für den Organismus.

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen nach wie vor die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar. 2007 erlitten 565.000 Amerikaner einen Myokardinfarkt und 300 000 Amerikaner einen Reinfarkt (AHA 2007). Ursachen kardiovaskulärer Erkrankungen sind zumeist ein akuter oder progredienter durch Atherosklerose verursachter Verschluss eines pathologisch veränderten Gefäßes. Klinisch verursachen diese Veränderungen am Herzen Angina Pectoris- bzw. Herzinfarkt-Beschwerden (Renz-Polster 2005). Im peripheren Blutkreislauf spiegeln sich die Veränderungen an den Gefäßen zum Beispiel im Bild der „Claudicatio intermittens“ (Schaufensterkrankheit) wider und werden unter dem Krankheitsbild pAVK (periphere arterielle Verschlusskrankheit) zusammengefasst. Prägend für dieses Krankheitsbild ist der Schmerz in den Beinen bei Aktivität, welcher mit Progredienz der Erkrankung immer früher auftritt und schlussendlich in einer Gangrän endet. In diesem Stadium ist eine Amputation der Extremität unabwendbar (Renz-Polster 2005). Eine Prävention dieser pathologischen Veränderungen ist möglich, erfordert jedoch meist eine Abkehr von bestimmten Lebensgewohnheiten, die zu einer Progredienz der Erkrankung führen. Dazu ist der Patient nur selten in der Lage, sodass letztlich die Therapie der Erkrankung im Vordergrund steht und nicht deren Prävention.

Indes geht nicht jede Gefäßverengung bzw. -okklusion mit einer Symptomatik einher (Maseri 1993). Gewisse Umstände, wie ausreichend Zeit und ein geringer Grad der Gefäßstenose, ermöglichen dem Organismus eine Adaptation. Die Adaptation besteht in einer Bildung eines natürlichen Bypasses, welcher aus präexistenten arterio-arteriolaren Anastomosen besteht und letztendlich den Gefäßverschluss kompensieren kann (Fulton 1963). Dieser Vorgang wird mit dem Term „Arteriogenese“ wiedergegeben. Das Verständnis der Mechanismen und Förderung der Arteriogenese stellen seit längerem den Mittelpunkt vieler Forschungsarbeiten dar. Ziel ist es, therapeutische Ansätze zu finden, die die Folgen einer Gefäßokklusion minimieren bzw. verhindern können.

1. Physiologie des Blutkreislaufes

Der Blutkreislauf des Menschen besteht aus einem in sich geschlossenen System aus teils parallel, teils seriell geschalteten Blutgefäßen. Durch zwei funktionell hintereinander geschaltete Pumpen, den rechten und den linken Ventrikel, erzeugt dieses System ein ausreichend hohes Druckgefälle, mit dem eine gerichtete Blutströmung aufrechterhalten werden kann. Die Beförderung der Atemgase O₂ und CO₂ sowie der Transport von Nährstoffen und deren Metaboliten über den Blutkreislauf ist die Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung des Lebens.

Der anatomische Aufbau der Gefäße ist bei allen Gefäßtypen mit Ausnahme der Kapillaren sehr ähnlich. Sie alle weisen einen charakteristischen Wandaufbau in 3 Schichten (Intima, Media, Adventitia) auf, bei dem, je nach Funktion des Gefäßes, die Gewebeanteile innerhalb der einzelnen Schichten variieren. Die Intima besteht aus dem lumenangrenzenden Endothel, welches einer Basalmembran aufliegt, und dem subendothelialen Bindegewebe, welches mit zarten Kollagenfasern und feinen elastischen Netzen durchzogen wird. Die noch zur Intima gehörende elastische Membran, die so genannte Lamina elastica interna, trennt die Intima von der Media. Die Media besteht aus glatten Muskelzellen, Kollagenfasern und elastischen Fasern in überwiegend ringförmiger Anordnung. Die Adventitia ist aus ineinander geflochtenen kollagenen und elastischen Netzen aufgebaut, die das Gefäß in der Umgebung verankern und hierdurch stabilisieren. Während kleine Gefäße durch Diffusion über das Gefäßlumen ernährt werden, weisen größere Arterien und Venen in der Adventitia eigene Versorgungsgefäße auf, die so genannten Vasa vasorum. Innerviert werden Gefäße vom vegetativen Nervensystem, welches die Weitstellung der Gefäße durch Vasokonstriktion bzw. Vasodilatation beeinflussen kann (Schiebler 8.Auflage).

2. Morphologie der Blutgefäße

2.1. Arterien

Arterien lassen je nach Wandaufbau, Funktion und Lage eine Unterscheidung in herznahe Arterien vom elastischen Typ und organnahe Arterien vom muskulären Typ zu. Arterien vom elastischen Typ, denen die Aorta oder die Karotiden angehören, sind vor allem durch den hohen Anteil von Elastin in der Media charakterisiert. So kann das vom Herzen in der Systole ausgeworfene Blut unter Wanddehnung aufgenommen werden und durch elastische Rückstellkräfte weiter befördert werden. Der diskontinuierliche, turbulente Blutstrom wird so in einen kontinuierlichen laminaren Blutstrom umgewandelt. Dadurch werden die hohen Druckspitzen in der Systole abgefangen (Windkesselfunktion). Zu den Arterien des muskulären Typs zählen mittlere und kleine Arterien. Sie zeigen den

Dreischichtenaufbau am deutlichsten (siehe Abb 1). und besitzen ferner viel weniger Elastin in der Gefäßwand. Dieser Typ des arteriellen Gefäßsystems geht in die Arteriolen über, welche durch Vasokonstriktion und Vasodilatation funktionell den stärksten Einfluss auf den Blutdruck und somit auf die Durchblutung der einzelnen Organe ausüben (Schiebler 8.Auflage).

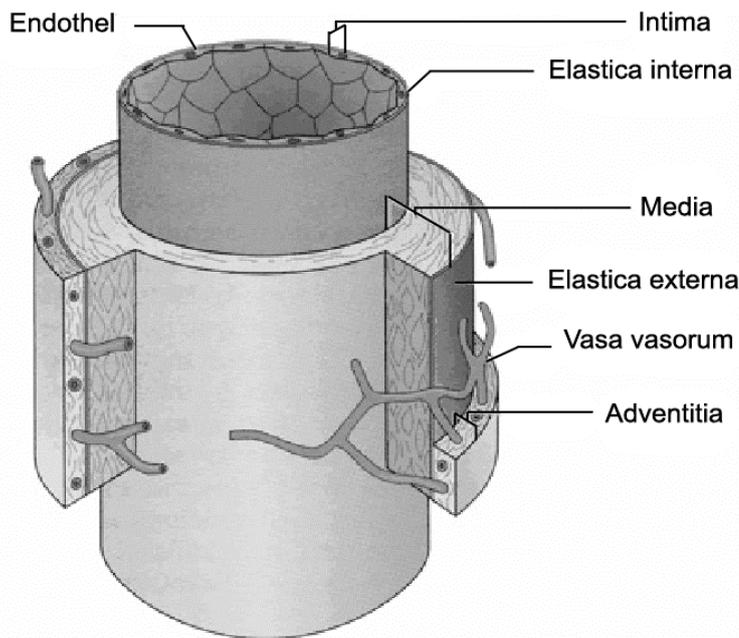


Abbildung 1: Aufbau der Gefäßwand, modifiziert nach Schiebler

2.2. Kapillaren

Kapillaren bestehen hauptsächlich aus einer Endothelschicht. Daran schließt sich eine Basalmembran an, die durchgehend oder unterbrochen sein kann. Die Basalmembran stellt eine essentielle Barriere für die Stoffpassage dar. So genannte Perizyten liegen der Basalmembran abluminal auf. Ihnen wird eine Beteiligung an der Wandstabilisierung und an der Regulation des Stoffaustausches zugesprochen (Schiebler 8.Auflage).

3. Biologie des Gefäßwachstumes

Es werden drei Mechanismen der Vaskularisierung voneinander unterschieden: Vaskulogenese bezeichnet die in den frühen Embryonalstadien stattfindende Entwicklung von kapillären Netzwerken, die maßgeblich an der Entstehung des adulten kardiovaskulären System beteiligt sind (für nähere Details siehe Vasculogenesis (Risau and Flamme 1995)). Aus dem präformierten Gefäßnetzwerk gehen sowohl prä- als auch postnatal weitere Wachstumsprozesse aus, die als Angiogenese bezeichnet werden. Als dritter Mechanismus ist die Arteriogenese zu nennen, die trotz einiger Gemeinsamkeiten deutliche Unterschiede zur Angiogenese aufweist und deshalb von dieser abgegrenzt werden muss.

3.1. Angiogenese

Die Angiogenese beschreibt die Entstehung neuer Kapillaren. Während die Neubildung von Gefäßen physiologisch z.B. im Rahmen der Wundheilung und des weiblichen Zyklus stattfinden kann (Folkman 1995; Buschmann and Schaper 1999), kommt es auch unter pathologischen Bedingungen wie der Atherosklerose, der proliferierenden Retinopathie, dem Tumorwachstum und der rheumathoiden Arthritis, in der das Wachstum neuer Kapillaren unerwünscht ist, zur Angiogenese (Folkman 1995).

Die Art der Bildung neuer Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen kann in eine sprossende und eine nicht-sprossende unterteilt werden. Bei der sprossenden Variante proliferieren zunächst die Endothelzellen und wandern nach Verdauung der extrazellulären Matrix in das Gewebe der Umgebung, wo sie kapilläre Strukturen bilden. Die nicht-sprossende Variante (Intussuszeption) hingegen erfolgt ähnlich der Lunge über eine Teilung präexistierender Gefäße durch transkapilläre Matrixstege (Risau 1997). Den entscheidenden auslösenden Faktor der Angiogenese stellt die Ischämie mit Hypoxie und Hypoglykämie dar, welche zu einer vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1) führt. HIF-1 ist der entscheidende Regulator der Sauerstoffhämostase, indem er z.B. die Bildung von NOS-3 (Stickstoffmonoxidsynthetase) und VEGF in Endothelzellen (vascular endothelial growth factor) initiiert (Forsythe, Jiang et al. 1996; Semenza, Agani et al. 1999; van Royen, Piek et al. 2001). VEGF und FGF-2 (fibroblast growth factor), zwei für die Angiogenese unentbehrliche Wachstumsfaktoren, induzieren eine Proliferation von Endothelzellen und eine erhöhte Bildung von Entzündungsmediatoren wie GM-CSF (granulocyte magrophage-colony stimulating factor), MCP-1 (macrophage chemoattractant protein-1) und TNF α (tumor necrosis factor α). Ferner sensibilisiert die Hypoxie Endothelzellen für Wachstumsfaktoren durch Hochregulation von Rezeptoren auf der Membran. Die Summe aller Mechanismen führt

zum typischen angiogenetischen Erscheinungsbild der Vasodilatation und der Permeabilitätssteigerung der Kapillaren mit Folge eines Ödems. Die Einwanderung der Monozyten ist ein weiterer bedeutsamer Schritt, da sie Entzündungsmediatoren und Metalloproteinasen (MMP) freisetzen, die die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran proteolytisch degradieren und so schließlich den Endothelzellen ermöglichen, sich aus ihrem Zellverband zu lösen und ins umliegende Gewebe zu migrieren. Dort proliferieren sie, bis ein neues Kapillarnetz entsteht (siehe Abb.2). Diese Gefäße verfügen im Vergleich zu Arteriolen über eine höhere Fragilität des Gefäßes, da sie keine glatten Muskelzellen, sondern Perizyten rekrutieren. Das neue, dichtere Kapillarnetz kann nun das ischämische Gebiet besser mit Sauerstoff und Substraten versorgen und eine Abnahme des peripheren Widerstandes bewirken (Risau 1997; Arras, Ito et al. 1998; Helisch and Ware 1999; Carmeliet 2000).

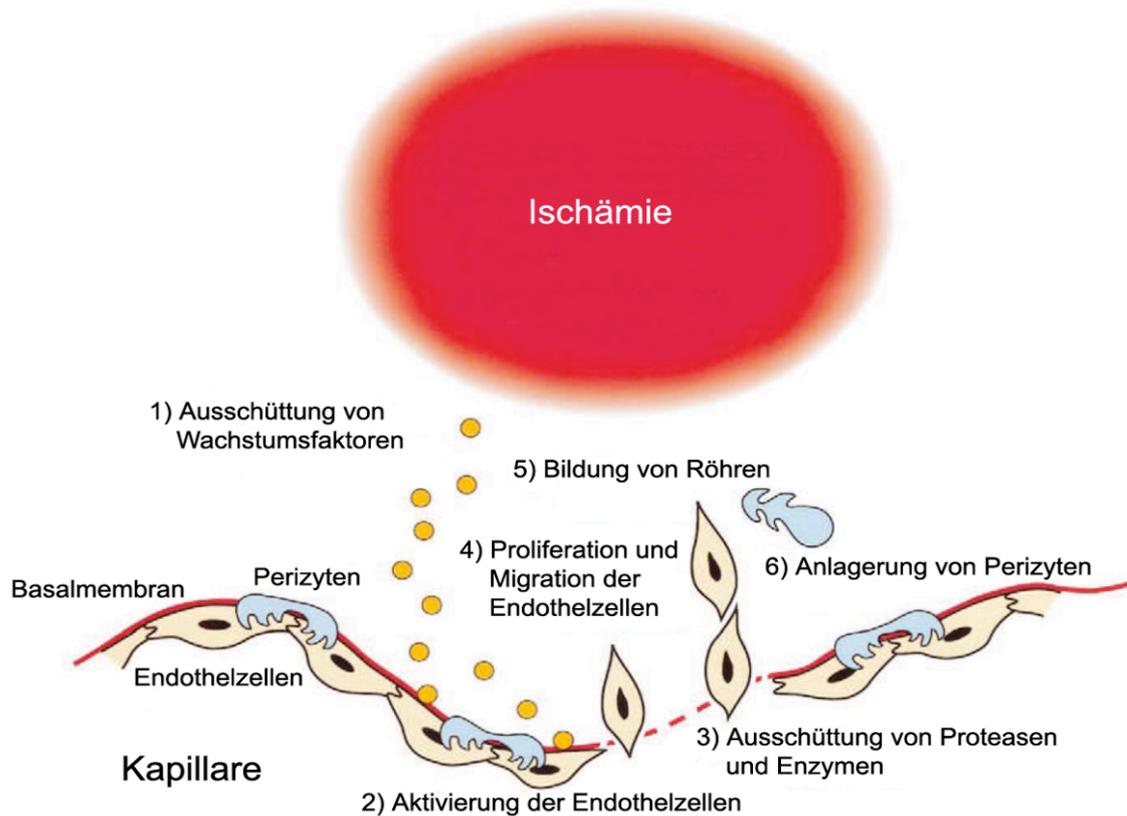


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Angiogenese. Ausgehend von einer bereits bestehenden Kapillare wird ein ischämisches Gebiet im Gewebe durch neu sprossende Kapillaren versorgt. Die auslösenden Reize sind verschiedene Wachstumsfaktoren, die von den Zellen im ischämischen Areal ausgeschüttet werden. Diese Faktoren aktivieren die Endothelzellen angrenzender Kapillaren. Nach einer Auflockerung der extrazellulären Matrix beginnen die Endothelzellen zu proliferieren und migrieren. Die wandernden Endothelzellen können sich im im weiteren Verlauf zu neuen Kapillaren zusammenlagern (nach Wahlberg (2003) verändert).

3.2. Arteriogenese

Der Term „Arteriogenese“ ist wesentlich, da sich die Arteriogenese vom Prozess der Angiogenese klar abgrenzt. Das Ersetzen einer Arterie mit niedrigem Widerstand durch Kapillaren mit hohen Widerständen wie im Falle der Angiogenese ist praktisch unmöglich, da es die Bildung von Millionen neuer Kapillaren erforderlich machen würde, um den erhöhten Blutfluss zu kompensieren. Für eine derart große Menge neuer Kapillaren existiert jedoch kein Platz. In der Arteriogenese hingegen wird das geschlossene Gefäß durch das Wachstum von präformierten Arteriolen zu funktionstüchtigen Arterien kompensiert und was schlussendlich den einzig physiologisch relevanten Mechanismus einer Adaptation nach arterieller Okklusion darstellt (Heil, Eitenmuller et al. 2006).

3.2.1. Morphologische Prinzipien

Die Arteriogenese stellt neben der Angiogenese eine weitere Form des postnatalen Gefäßwachstums dar. Initialisiert wird die Arteriogenese durch eine progressive Stenose oder akute Okklusion, die zu einer Verringerung des Druckes im poststenotischen Gefäßabschnitt führt. Da die normal perfundierten Bereiche über präexistente Arteriolen mit den Gefäßbereichen mit niedrigeren Drücken verbunden sind, kommt es gemäß des Druckgefälles (Weg des geringsten Widerstandes) zu einer Umleitung des Blutstromes. Die Folge ist eine erhöhte Wandschubspannung in den präexistenten Arteriolen, welche den Beginn der Arteriogenese markiert (Scholz, Ito et al. 2000). Am eindruckvollsten sind die Effekte, wenn der Zeitraum vom Beginn der Stenose bis zur kompletten Okklusion 3-5 Tage beträgt (Schaper, Borgers et al. 1972). In diesem Zeitintervall ist eine Verhinderung eines Infarktes durch wachsende Arteriolen möglich. Herzog et al. konnten an Ratten zeigen, dass Kollateralen im Herzen ihren Durchmesser in den ersten 7 Tagen nach Okklusion verdoppeln konnten und ein korkenzieherartiges Aussehen annahmen. Nach diesem Zeitraum konnte kein Wachstum im Durchmesser gemessen werden, wohingegen ein leichtes Wachstum in der Länge weiterhin stattfand.

Morphologisch lassen sich folgende Veränderungen in proliferierenden Arteriolen aufzeigen: Den Start bildet die Aktivierung der Endothelzellen, welche mit einer verstärkten Bildung des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparates einhergeht. Hierbei nehmen sie die Funktion des synthetischen Phänotyps ein. Durch die Aktivierung der Chloridkanäle schwellen die Endothelzellen an und exprimieren verstärkt Adhäsionsmoleküle. Der Abbau der Lamina elastica interna und der extrazellulären Matrix ermöglicht sowohl die Migration der Monozyten als auch die der glatten Muskelzellen in die Media respektive Intima. Einigen Wochen später wird eine neue Lamina elastica interna durch die glatten Muskelzellen gebildet (Scholz, Ito et al. 2000). Durch die Migration der glatten Muskelzellen in die Intima wird eine neue, zellreiche sog. Neointima

gebildet, die sich in einigen Gefäßen so weit entwickeln kann, dass es zur Okklusion kommt (Schaper and Ito 1996). Am Ende dieses komplexen Prozesses entstehen Arterien mit einem vergrößerten Durchmesser, die nun den Blutfluss ins ischämische Gebiet gewährleisten können (siehe Abb.3). Dennoch wird nur in den seltensten Fällen eine vollständige Kompensation des Blutflusses erlangt (Schaper 1993; Schaper and Buschmann 1999).

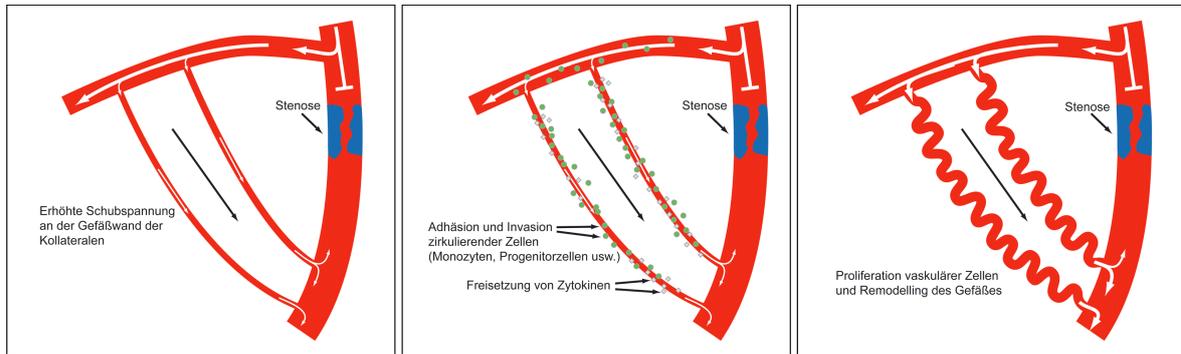


Abbildung 3: Schematischer Ablauf der Arteriogenese. Den Beginn stellt eine erhöhte Schubspannung in den präexistierenden Arteriolen dar, welche das Endothel aktiviert und eine Invasion zirkulierender Zellen ermöglicht. Diese Zellen können ihrerseits Zytokine und andere Proteine in die Gefäßwand ausschütten, welche eine Migration und Proliferation der vaskulären Zellen zur Folge hat. Am Ende des Prozesses entsteht ein Gefäß mit einem vergrößerten Lumen, das in der Lage ist, den Blutfluss des stenosierten Gefäßes zu kompensieren (modifiziert nach Heil).

3.2.2. Molekulare Mechanismen

Der Ablauf der Arteriogenese kann vereinfacht in eine Aktivierungs-, Inflammations-, Proliferations- und in eine Umbauphase unterteilt werden. Im Folgenden werden die charakteristischen molekularen Mechanismen der einzelnen Phasen wiedergegeben.

Aktivierungsphase

Auslöser der Arteriogenese ist die schon oben erwähnte Schubspannung, welche zu einer Aktivierung des normalerweise kaum proliferierenden Endothels führt. Aktivierte Endothelzellen schwellen an und konvertieren zu einem proliferierenden und synthetischen Typ, der unter anderem eine erhöhte Anzahl freier Ribosomen aufweist. Mit der Aktivierung der Endothelzellen geht eine Schwellung einher, die auf die erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der Chloridkanäle zurückzuführen ist (Schaper and Buschmann 1999).

Auf Transkriptionsebene werden einige Gene durch Aktivierung des sog. „Shear stress responsive element“ (SSRE) hochreguliert. Dazu zählen unter anderem die Bildung von NOS (Nitrogenmonoxidsynthetase), PDGF (platelet derived growth factor) und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein) (Schaper and Buschmann 1999). EGR-1 (early growth response gene) und CARP (cardiac ankyrin repeat protein) stellen weitere durch erhöhte

Schubspannung induzierte Transkriptionsfaktoren dar (Cai and Schaper 2008). Die vermehrte Bildung von MCP-1 sowie den Adhäsionsproteinen Intercellular adhesive molecule (ICAM-1) und Vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) führt zu einer erhöhten Rekrutierung und Invasion von Makrophagen und anderen Immunzellen (Scholz, Ito et al. 2000).

Inflammationsphase

Die in das Gefäß eingewanderten Monozyten werden inzwischen selbst aktiviert und wandeln sich in Makrophagen um. Diese Makrophagen sezernieren nunmehr ihrerseits Wachstumshormone wie FGF-2. Aber auch Zytokine wie TNF α werden vermehrt gebildet, um das für die Arteriogenese notwendige inflammatorische Milieu zu schaffen. TNF α kann so, indem es vermehrt Adhäsionsproteine auf dem Endothel induziert, einen positiven Feedback-Mechanismus auf die Rekrutierung von Monozyten ausüben (Arras, Ito et al. 1998).

Inzwischen konnte nachgewiesen werden, dass eine Infusion des angiogenetischen Wachstumsfaktors VEGF über 7 Tage eine signifikante Steigerung des Blutflusses auslöst (Pipp, Heil et al. 2003), obwohl VEGF während der Arteriogenese weder vermehrt exprimiert wird noch alleine eine Arteriogenese induzieren kann (Deindl, Buschmann et al. 2001).

Proliferationsphase

Unter physiologischen Bedingungen zeigen sowohl Endothelzellen als auch glatte Muskelzellen im adulten Gewebe sehr niedrige Teilungsraten. Ca. 1-3 Tage nach Okklusion kommt es zu einer starken Proliferationsaktivität von Endothelzellen, glatten Muskelzellen wie auch von Fibroblasten. (Wolf, Cai et al. 1998). Im Laufe dieses Prozesses ändern die glatten Muskelzellen nicht nur ihre Proliferationsrate, sondern auch ihren kontraktilen Phänotyp zu einem dedifferenzierten, synthetischen Phänotyp. Zeichen für diese Umwandlung sind unter anderem eine Reduktion an α -smooth muscle actin, während der Gehalt an Vimentin ansteigt (Herman 1993; Wolf, Cai et al. 1998).

Umbauphase (Remodelling)

Da Mitose und Proliferation allein noch nicht ausreichend sind, um die Bildung einer Arterie aus einer Arteriole zu erklären, werden weitere Mechanismen benötigt. Zu diesen Mechanismen zählt, dass von glatten Muskelzellen in der synthetischen Phase zwischen dem 3. und dem 14. Tag nach Okklusion auf der einen Seite vermehrt MMPs, allen voran MMP-9 und MMP-2 und auf der anderen Seite weniger TIMPS (tissue inhibitor of metalloproteinases) gebildet werden (Wolf, Cai et al. 1998; Cai, Vosschulte et al. 2000). MMPs sind Proteasen, welche die gefäßumgebende Matrix zersetzen. Hierbei ist vor allem

die Verdauung der Lamina elastica interna von großer Bedeutung, da nun die glatten Muskelzellen in der Lage sind, in die Intima zu migrieren, wo sie entweder proliferieren oder durch Apoptose absterben und durch Makrophagen phagozytiert werden (Wolf, Cai et al. 1998). Die Bildung von Kollagen, Elastin und einer neuen Lamina elastica interna steht zu diesem Zeitpunkt im Vordergrund, um den typischen Aufbau des Gefäßes wieder herzustellen (Schaper 1993; Scholz, Ito et al. 2000).

Reifungsphase

Die Reifungsphase beginnt zwischen dem 14. und dem 21. Tag nach Okklusion. Charakteristisch für diese Phase sind eine verminderte Proliferation, Migration und Proteolyse der glatten Muskelzellen sowie eine Rückbildung zum kontraktilen Phänotyp. Zudem ist sowohl die Monozytenandockung als auch die verstärkte Expressierung von Adhäsionsmolekülen beendet (Scholz, Ito et al. 2000). In einigen Kollateralen wächst die Neointima so prominent an, dass es zum Verschluss des Gefäßes und schließlich zu dessen Abbau kommt („pruning“). Diese Beobachtung wird dahingehend interpretiert, dass einige Gefäße einen höheren Anteil am Gesamtblutfluss besitzen und so vermehrt Scherkräften ausgesetzt sind, was wiederum dazu führt, dass sie offen bleiben, während diejenigen, die einen niedrigen Blutfluss tragen, nach Initialisierung nicht aufhören zu proliferieren und in der Folge okkludieren (Scholz, Cai et al. 2001). Dieser Mechanismus ist deshalb sinnvoll, weil einige wenige Arterien mit vergleichsweise großem Durchmesser nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz (siehe Abb.4) einen höheren Blutfluss gewährleisten können als viele kleine Arterien.

$$I = \frac{r^4 \pi \Delta p}{8 \eta L}$$

Abbildung 4: Hagen-Poiseuille Gesetz. Die Stromstärke ist proportional zur vierten Potenz des Gefäßradius. Abgewandelt gelten folgende Bezeichnungen: I= Blutfluss; r= Gefäßradius; p= Blutdruckgefälle; η= Viskositätskoeffizient; L= Gefäßlänge

4. Gefäßaktive Zytokine und Wachstumsfaktoren

Im gesunden Organismus findet ein ständiges Zusammenspiel verschiedenster Zytokine und Wachstumsfaktoren statt, die eine Möglichkeit der Kommunikation zwischen den Zellen und eine Reaktion auf extrazelluläre Reize darstellen. Zytokine wie auch Wachstumsfaktoren sind Proteine, die von verschiedenen Zellarten produziert und sezerniert werden. Die Konzentrationen liegen oftmals im femtomolaren Bereich. Entscheidende Faktoren für die Komplexität des Zusammenwirkens ist zum einen die Redundanz, d.h. verschiedene Zytokine sowie Wachstumsfaktoren verursachen die gleiche Wirkung, und zum anderen die Pleiotrophie, bei der der gleiche Faktor verschiedene Wirkungen in unterschiedlichen Geweben erzielen kann. Dabei können sie additiv,

synergistisch oder antagonistisch wirken. Diese verschiedenen Interaktionen lassen somit ein sehr komplexes, hochgradig reguliertes Netzwerk entstehen. Im Gegensatz zu Hormonen, die eine systemische Wirkung zeigen, ist die Wirkung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren meist lokal begrenzt und über die notwendigen Rezeptoren sehr spezifisch. Die Einteilung der Zytokine ist aufgrund der unvollständig geklärten Funktionen nicht einheitlich. Nach der klassischen Einteilung werden vier Gruppen unterschieden:

- Interleukine (IL)
- Interferone (INF)
- Chemokine
- Tumor Nekrose Faktoren (TNFs)

Die verschiedenen Gruppen scheinen so in unterschiedlichen Zellprozessen wie Differenzierung, Apoptose, Proliferation, aber auch Aktivierung von Proteinen und Zell-Zell Interaktion von grundlegender Bedeutung zu sein. Daher ist es nicht verwunderlich, dass eine Veränderung oder Dysregulation ihres Expressionsmusters gravierende Auswirkungen auf einzelne Organe bzw. einen ganzen Organismus hat. Ungeklärt bleiben in vielen Fällen jedoch die genauen Wege, wie es durch die Wirkung der Zytokine zu den beschriebenen Organveränderungen kommt. Nachfolgend werden einige Substanzen vorgestellt, die in Wachstumsfaktoren, inflammatorische und antiinflammatorische Zytokine unterteilt werden.

4.1. Fibroblast Growth Factor (FGF)

Die Familie der fibroblast growth factors umfasst derzeit eine wachsende Gruppe von derzeit mindestens 28 verschiedenen Formen. Sie üben unterschiedlichste Effekte wie Proliferation, Migration und Differenzierung auf Zellen mesodermalen, entodermalen und neuroektodermalen Ursprungs aus. Die biologischen Effekte von FGFs auf ihre Zielzellen werden über die Bindung an Tyrosinkinase-Rezeptoren vermittelt (Ornitz and Itoh 2001). Die Rolle der verschiedenen FGFs wurde schon in vielen verschiedenen Bereichen erforscht. Überexpression von FGF-1 erhöht im Myokard signifikant die Dichte und die Verzweigungen von Koronararterien sowie den Koronarfluss. Dies lässt die Vermutung zu, dass FGF-1 eine wichtige Rolle im Wachstum und in der Differenzierung von Koronararterien spielt (Fernandez, Buehler et al. 2000). Als weiteres Beispiel induziert FGF-4 Arteriogenese und Angiogenese im Kaninchenhinterbein-Ischämie-Modell (Rissanen, Markkanen et al. 2003). Weiterhin erhöht die exogene Zugabe von FGF-2 die Anzahl von arteriellen Kollateralen und verstärkt den kollateralen Blutfluss, was für die Potenz des Faktors in der Arteriogenese spricht (Baffour, Berman et al. 1992; Yang, Deschenes et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wird hauptsächlich der Wachstumsfaktor FGF-7 und in einem geringeren Maße auch FGF-2 untersucht.

4.1.1. FGF-2 (basic FGF)

FGF-2, auch als basic FGF bekannt, ist ein prinzipiell überall im Körper auftretender Wachstumsfaktor. Seine multiplen Fähigkeiten spiegeln sich in der Entwicklung des Embryos (Dvorak and Hampl 2005) und besonders des Nervensystems (Unsicker, Reichert-Preibsch et al. 1992) wie auch in der Wundheilung (Kurita, Tsuboi et al. 1992) und des Skelettmuskelwachstums (Templeton and Hauschka 1992) wider. Insbesondere die Potenz, Gefäßwachstum und Tumorwachstum zu induzieren, sind Bestandteil vieler Forschungsarbeiten (Powers, McLeskey et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass FGF-2 eine bedeutende Rolle bei der Proliferation und Migration sowohl von Endothelzellen wie auch von glatten Gefäßmuskelzellen einnimmt und so Arteriogenese wie auch Angiogenese stimuliert (Schaper and Scholz 2003). Allerdings ist die Wirkung auf das Kollateralwachstum nur in einem bestimmten Zeitfenster möglich, in dem die erhöhte Expression des hochaffinen Rezeptors FGFR-1 und nicht eine erhöhte FGF-2 Expression für das Wachstum verantwortlich gemacht wird (Deindl, Hofer et al. 2003). Im Gegenzug zeigten FGF-2 Knockout-Mäuse (Miller, Ortega et al. 2000) keine Veränderung der Arteriogenese.

FGF-2 besitzt im Gegensatz zu den meisten anderen FGF-Formen eine Art Doppelnatur. Zum einen wirkt es als klassisches extrazelluläres Protein zum anderen aber auch als intrazellulärer Faktor. Es werden 5 Isoformen (18kD, 22kD, 22,5kD, 24kD, 34kD) durch den Einsatz unterschiedlicher Translationsstartseiten gebildet (Florkiewicz and Sommer 1989). Dabei besitzen alle Isoformen (außer die 18kD Isoform) eine N-terminale nukleäre Lokalisations-Sequenz, jedoch keine klassische Signal-Peptid-Sequenz (Sorensen, Nilsen et al. 2006). Eine weitere seltene Eigenschaft unter den FGFs zeigt die Beobachtung, dass sich alle Isoformen außer der 18kDa Isoform hauptsächlich im Zytosol oder im Zellkern befinden und nicht sezerniert werden. Demnach wird diesen Isoformen eine intrakrine Wirkung zugesprochen (Sorensen, Nilsen et al. 2006). Die 18kDa hingegen wird trotz fehlendem Signalpeptid womöglich ER- bzw. Golgi-Apparat-unabhängig sezerniert. Außerhalb der Zelle kann es nun parakrin, aber auch autokrin seinen Rezeptor aktivieren und dadurch verschiedene Signaltransduktionswege einleiten. Eine zusätzliche Besonderheit ist die Fähigkeit, mittels Rezeptor endocytisiert zu werden und in den Zellkern zu translozieren, um dort mit Transkriptionsfaktoren und Kinasen die DNA Synthese zu beeinflussen (Sorensen, Nilsen et al. 2006).

4.1.2. FGF-7/KGF (Keratinocyte Growth Factor) und dessen Rezeptor FGFR2/IIIb

FGF-7, auch Keratinocyte Growth Factor genannt, ist ein Mitglied der Familie von Heparin bindenden FGF. FGF-7 wurde als erstes in Lungenfibroblasten von Rubin et al. identifiziert, wo es eine mitogene Wirkung auf Epithelien ausübt (Rubin, Osada et al. 1989). FGF-7 verkörpert ein Monomer, welches je nach Glykolisierungsgrad ein 26-28 kDa schweres Polypeptid darstellt. FGF-7 cDNA codiert ein 194 Aminosäuren langes Vorläuferprotein, welches um 31 Aminosäuren gekürzt wird, um schließlich ein ~19 kDa schweres Protein zu bilden. FGF-7 besitzt ein klassisches Signalpeptid für seine Sekretion und potentielle N-Glykosylierungsstellen. Ein Protein ähnlicher Größe (19 kDa/164 Aminosäuren) wird auch in Bakterien (E.Coli) gebildet, was zu der Schlussfolgerung geführt hat, dass die 26/28 kDa Form durch N-Glykosylierungen in Säugerzellen zu Stande kommt und dass eine Glykosylierung nicht zur Aktivität des Proteins benötigt wird (Finch PW 1989). Im Gegensatz zu anderen FGFs wie FGF-1 oder FGF-2 besitzt FGF-7 keine nukleäre Lokalisations-Sequenz und ist somit nicht im Zellkern der Zellen nachzuweisen.

FGF-7 verfügt über verschiedene Funktionen in unterschiedlichsten Organen, in denen er durch multiple Mechanismen die Integrität des Epithels unter anderem durch Stimulation der Proliferation, Migration, Differenzierung, DNA-Reparatur und Ausschaltung reaktiver Sauerstoffradikale gewährleistet (Finch and Rubin 2004). Dementsprechend wird FGF-7 von verschiedensten Zelltypen hauptsächlich mesenchymalen Ursprungs wie Fibroblasten, mikrovaskulären Endothelzellen (Smola, Thiekotter et al. 1993) und glatten Muskelzellen (Winkles, Alberts et al. 1997), aber auch von nicht mesenchymalen Zellen wie T-Lymphozyten (Jameson, Ugarte et al. 2002) gebildet. Die FGF-7 Expression in Fibroblasten wird von einigen Zytokinen beeinflusst, wengleich Interleukin 1 (IL-1) den potentesten Stimulator darstellt (Brauchle, Angermeyer et al. 1994; Chedid, Rubin et al. 1994).

Etliche Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass FGF-7 ausschließlich als parakriner Wachstumsmediator zwischen Mesenchym und Epithel fungiert. Hierzu zählen, dass FGF-7 Transkripte in mesenchymalen Geweben der Lunge, Ösophagus und Dermis detektiert worden sind, wohingegen der FGF-7 Rezeptor im benachbarten Gewebe auf Epithelzellen zu finden ist. Umgekehrt konnte keine FGF-7-Synthese in Epithelien bzw. kein FGF-7-Rezeptor auf mesenchymalen Zellen nachgewiesen werden (Rubin, Bottaro et al. 1995).

In der Haut konnte gezeigt werden, dass FGF-7-mRNA nach einer Hautverletzung in dermalen Fibroblasten stark hochreguliert wird und zu einer Proliferation von epidermalen Keratinozyten führt. Daraus wurde gefolgert, dass FGF-7 eine wichtige Rolle in der Reepithelialisierung der Haut spielt (Werner, Peters et al. 1992). FGF-7 Knockout-Mäuse zeigten hingegen keine Einschränkung in der Wundheilung. Diese Diskrepanz wurde mit dem Vorhandensein anderer Liganden des FGF-7 Rezeptors wie dem FGF-10 (KGF-2)

erklärt (Guo, Degenstein et al. 1996). Untermauert wird diese These durch FGF-7 Rezeptor negative transgene Mäuse, welche eine gestörte, respektive. verzögerte Wundheilung aufweisen (Werner, Smola et al. 1994). Ferner konnte FGF-7 in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nachgewiesen werden. In dem inflammatorischen Milieu, ähnlich der Wundheilung, wurde eine Hochregulierung des FGF-7 und die mit ihr einhergehende Proliferation bzw. Reparatur der intestinalen Epithelzellen beobachtet (Brauchle, Madlener et al. 1996).

In klinischen Studien konnte rFGF-7 (Palifermin) zur Prävention vor epithelialen Schäden im Gastrointestinaltrakt (GIT) durch Radiotherapie und Chemotherapie bereits erfolgreich getestet werden und ist für diese Indikation zugelassen (Farrell, Rex et al. 1999; Dorr, Noack et al. 2001). FGF-7 übt nicht nur im GIT, sondern auch in der Lunge eine epitheliale Schutzfunktion aus. Dort schützt FGF-7 die Lunge vor Sauerstofftoxizität (Ray, Devaux et al. 2003), Radiotherapie und Chemotherapie (Yi, Williams et al. 1996). Weitere experimentelle Ansätze zeigten, dass bei vorheriger FGF-7 Applikation nach einer Knochenmarkstransplantation in Mäusen Mortalität und Graft versus Host-Reaktionen reduziert waren (Panoskaltsis-Mortari, Lacey et al. 1998).

Im Gefäßsystem stellen FGF-7 und sein Rezeptor ein kontrovers diskutiertes Feld dar. Während glatte Muskelzellen als FGF-7 Produzenten allgemein akzeptiert werden, sind die Aussagen bezüglich des Vorkommens des FGF-7 Rezeptor selbst im Gefäß zweideutig. Dennoch gibt es Berichte, in denen eine direkte oder indirekte Wirkung FGF-7 auf vaskuläre Zellen angenommen wird. So zeigt Gillis et al., dass FGF-7 die Bildung neuer Gefäße in der Kornea induziert. Darüber hinaus stabilisiert FGF-7 die Endothelschicht gegenüber Wasserstoffperoxid und VEGF-induzierter Permeabilitätszunahme. Diese Ergebnisse wurden jedoch nur in mikrovaskulären Gefäßen und nicht in großen Gefäßen wie der Aorta beobachtet. Da der Autor jedoch keinen FGF-7 Rezeptor auf Endothelzellen nachweisen konnte, zieht er das Vorhandensein eines noch nicht entdeckten FGF-7 bindenden Rezeptors in Erwägung (Gillis, Savla et al. 1999). Gleichmaßen konnte in vaskulären glatten Muskelzellen kein FGF-7 Rezeptor nachgewiesen werden (Winkles, Alberts et al. 1997). Andere Gruppen wiederum konnten den FGF-7 Rezeptor auf glatten Muskelzellen sowohl in gesunden Gefäßen als auch in atherosklerotischen Plaques lokalisieren. Dort induzierte FGF-7 die Proliferation glatter Muskelzellen (Onda, Naito et al. 2003).

Die humane FGF-Rezeptor Familie beinhaltet vier Gene (Fgfr1 bis Fgfr4), von denen drei durch alternatives Spleißen (splicing) der prä-m-RNA mindestens zwei Isoformen des eigenen Rezeptors bilden. FGF-Rezeptoren gehören zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren, welche aus drei Immunoglobulinschleifen, einer Transmembran- sowie einer Tyrosinkinasedomäne bestehen und zur Aktivierung eine Dimerisierung ihrer Rezeptoren

benötigen (Eswarakumar, Lax et al. 2005). Der FGF-Rezeptor 2/IIIb, auch bekannt als KGFR (Keratinocyte Growth Factor Receptor), ist auf vielen verschiedenen Typen von Epithelzellen lokalisiert und wird vor allem von den vier bekannten Liganden FGF-1, FGF-3, FGF-7 und FGF-10 gebunden, die insbesondere von mesenchymalen Zellen exprimiert werden (Ornitz, Xu et al. 1996). Während andere FGFs auch an andere Rezeptoren binden, bindet FGF-7 ausschließlich an den Rezeptor 2/IIIb (Finch and Rubin 2004). Die Wirkung des FGF-7 an seinem Rezeptor wird durch Internalisierung beendet (Marchese, Mancini et al. 1998). Während Fgfr2 Knockout-Mäuse schon früh in der Embryogenese sterben, überleben Knockout-Mäuse für den FGF-Rezeptor 2/IIIb bis zur Geburt, da sie die Isoform 2/IIIc noch besitzen. Diese Knockout-Mäuse zeigen aber Dysgenesien von Nieren, Thymus, Speicheldrüsen, Pankreas und Haut sowie Agenesien von Lunge und Schilddrüse und sterben dementsprechend bei der Geburt. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass der FGF Rezeptor 2/IIIb eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Mesenchym und Epithel in der frühen Organogenese spielt (Peters, Werner et al. 1994; Celli, LaRochelle et al. 1998).

Proteoglykane (Glykosaminoglykane) wie Heparin, Heparansulfat und Chondroitinsulfat wirken bei den meisten FGFs als Cofaktoren, die die Liganden-Rezeptor-Interaktion stabilisieren, vor Degradation schützen und so letzten Endes die Aktivierung des Signaltransduktionsweges forcieren (LaRochelle, Sakaguchi et al. 1999). Die Wirkung der Proteoglykane auf FGF-7 hingegen scheint komplexer zu sein als bei anderen FGF-Mitgliedern. Während Heparin in niedrigen Dosen die Rezeptoraktivierung fördert, führen hohe Dosen zur Inhibition (LaRochelle, Sakaguchi et al. 1999). Gleichermaßen kann das Proteoglykan Glypican-1 die stimulatorischen Effekte von Heparin auf die Rezeptoraktivierung inhibieren (Berman, Ostrovsky et al. 1999), während Dermatansulfat die FGF-7 abhängige Proliferation von Keratinozyten potenter als Heparin und Heparansulfat stimuliert (Trowbridge, Rudisill et al. 2002).

4.2. Inflammatorische und antiinflammatorische Zytokine

Wie schon oben beschreiben, spielt die Bildung eines inflammatorischen Milieus im Prozess der Arteriogenese eine tragende Rolle. Makrophagen nehmen hierbei eine Schlüsselposition ein, weshalb ihre Funktion in diesem Kontext intensiv untersucht wurde. Sie sind wahrscheinlich die treibende Kraft in der Arteriogenese, indem sie unter anderem Proteasen, Wachstumsfaktoren und Zytokine in die Umgebung freisetzen. Einige dieser Zytokine mit deren Wechselwirkungen wurden in Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

4.1.3. Onkostatin M (OSM)

OSM ist ein pleiotropes Zytokin, welches zunächst anhand der Fähigkeit, bestimmte Tumorzelllinien zu inhibieren, identifiziert wurde. OSM ist ein Mitglied der IL-6 Familie, welcher auch IL-6, IL-11, Leukämia inhibitory factor (LIF), Ciliary neurotrophic factor (CNTF) und andere Cytokine angehören. Diese Familie bindet an einen Rezeptorkomplex, welcher aus der gp130 und einer rezeptorspezifischen Untereinheit besteht. In humanen Zellen kann OSM sowohl an den Typ 1 OSM-Rezeptor (gp130/LIFR) als auch an den Typ 2 OSM-Rezeptor (gp130/OSMRb) binden. Murines OSM bindet hingegen nur an den Typ 2 OSM-Rezeptor (Grant and Begley 1999). Die Bindung von OSM an seinen Rezeptor führt zur Aktivierung verschiedenster Signaltransduktionswege. Dazu gehören die Janus Kinase (JAK) bzw. des „signal transducer and activator of transcription“ (STAT), die „mitogen-activated protein“ (MAP)- und auch die Phosphoinositol-3 (PI-3)-Kinase.

OSM wird vor allem von aktivierten T-Lymphozyten und Makrophagen jedoch auch von Endothelzellen sowie Hepatozyten produziert. Trotz der funktionellen Ähnlichkeiten zu den anderen IL-6 Familienmitgliedern durch die Verwendung der gleichen gp130-Untereinheit besitzt OSM eigene spezifische Funktionen. Dazu zählt die Angiogeneseförderung durch Proliferation mikrovaskulärer Endothelzellen und ihre Ausrichtung in Form von Röhren wie auch eine erhöhte Adhäsion polymorpher Zellen an das Endothel. Darüber hinaus wird auch im Herzmuskel eine Gefäßneubildung durch eine VEGF-Hochregulierung gefördert. Des Weiteren nimmt OSM ambivalent Einfluss auf den Prozess der Atherosklerose, indem es zum einen die LDL-Aufnahme (low density lipoprotein) in Hepatozyten erhöht und die Bildung von neuem Cholesterin mindert, zum anderen aber ein starkes Mitogen für vaskuläre glatte Muskelzellen darstellt und somit die Bildung einer Neointima fördert.

Während OSM in einer Reihe von inflammatorischen Prozessen eine Rolle spielt, ist auch eine anti-inflammatorische Wirkung beschrieben. Es fördert demnach die Sekretion von TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases), einem bedeutenden Antagonist der Matrixmetalloproteinasen, in vaskulären glatten Muskelzellen. Darüber hinaus kann durch die Induktion von IL-6 die Bildung der „Akute Phase Proteine“ (APP), die am Ort der Inflammation unter anderem die Aktivität der Proteasen und Zytokine inhibieren, beeinflusst werden (Mire-Sluis 1998).

4.1.4. Interleukin-4 (IL-4)/ Interleukin 13 (IL-13)

IL-4 wie auch IL-13 gehören zur Hämatopoetinfamilie, die auch IL-2, IL-6, Erythropoetin und Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) einschließt. IL-4 und IL-13 werden hauptsächlich von T-Lymphozyten und Mastzellen sowie von eosinophilen und basophilen

Granulozyten produziert. IL-13 ist im Prinzip dem IL-4 in seiner Funktion sehr ähnlich, zeigt allerdings gegenüber IL-4 eine geringere Potenz.

Wenngleich IL-4 die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen anregt, inhibiert es doch das Makrophagenwachstum sowie die Sekretion von Makrophagenzytokinen wie IL-1. Weiterhin erhöht IL-4 die Bildung von IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1RA), Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) und Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF). In atherosklerotisch veränderten Gefäßen wird sogar trotz vermehrter MMP-1 Bildung eine regressive Wirkung des IL-4 auf den atherosklerotischen Plaque diskutiert.

Ebenso wirkt IL-13 auf Makrophagen antiinflammatorisch. Es inhibiert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie auch die Zytotoxizität der Makrophagen. Eine weitere antiinflammatorische Wirkung ist die Abschwächung der durch IL-1 und TNF α induzierte MCP-1-Produktion in intestinalen Epithelzellen sowohl durch IL-4 als auch durch IL-13. Eine zusätzliche wichtige Wirkung von IL-4 und IL-13, besonders im Zusammenhang mit der Arteriogenese, ist die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, die die Einwanderung von Monozyten ins Gefäß ermöglichen (Mire-Sluis 1998).

5. Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation war es, die Funktion des Wachstumsfaktors FGF-7 im Gefäßsystem aufzuklären. Hierzu zählen die Identifizierung, die Quelle, die Lokalisation sowie die Regulationsmechanismen und das Wirkprofil des FGF-7. Zusätzlich sollte der Einfluss des FGF-7 insbesondere auf das Kollateralwachstum bestimmt werden.

Zur Beantwortung der ersten Fragestellungen wurde ein in vitro Modell aus glatten Muskelzellen aus dem Schwein gewählt, welches für seine hohe Homologie zum Menschen allgemein bekannt ist. Einen Einfluss auf die Arteriogenese wurde durch Okklusion der Femoralarterie der Maus nach lokaler Applikation des FGF-7 anhand des Laser Doppler Imaging geprüft.

II. Materialien

1. Geräte und Software

Folgende in Tabelle 1 und 2 genannten Geräte und Programme wurden verwendet:

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät/ Material	Bezeichnung/Typ	Hersteller
Fluorometer	FLUOstar Galaxy	BMG (Leipzig, Deutschland)
Versa Doc	VersaDoc MP 5000 System	BioRad
Mikroskop	Zeiss Imager Z1	Zeiss
IPGphor-Gerät		Amersham
FACS-Gerät	LSR II	BD

Tabelle 2: Software

Programm/Funktion	Name/Hersteller
Western Blot Quantifizierung	Quantity One (Bio-Rad)
Proteinkonzentrationsbestimmung	FLUOstar Galaxy (Bio-Rad)
Mikroskopsoftware	AxioVision Release 4.5
FACS-Analyse	BD FACS Diva 3.0

2. Chemikalien

Die Standardchemikalien und Reagenzien stammen von folgenden Firmen: Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhof). Die Materialien für die Proteinelektrophoresen wie auch die verwendeten Acrylamidgele, Elektrophoresepuffer und reduzierenden Chemikalien sind von Invitrogen (Niederlande). Wachstumsmedien, Antibiotika und andere Bestandteile für die Zellkulturen sind bei Gibco BRL (Eggenstein), Sigma (Deisenhof) und Biowhittaker (Verviers, Belgien) eingekauft worden. Alle Reagenzien und Geräte für die 2D-Gelelektrophorese stammen von Amersham (Uppsala; Schweden). Dazu zählt das Dry Strip Cover Fluid, Immobiline Dry Strip ph 3-10 NL/18cm, IPG-Puffer 3-10 NL, Stripholder und das IPGphor-Gerät. Alle plastischen Produkte für die Zellkulturen wurden bei den Firmen Costar (Bodenheim), Greiner (Frickenhäusen), Vivasciences AG (Hannover) und Nalgene (Rochester, NY, USA) erworben.

Tabelle 3: Puffer, Lösungen und Gele

Puffer/Lösungen/Gele	Inhaltsstoffe
NuPAGE MES-running puffer (20x)	<ul style="list-style-type: none">• 1M MES• 1M Tris base,• 69.3mM SDS• 20.5mM EDTA

	<ul style="list-style-type: none"> steriles Wasser auf 500ml
NuPAGE Transferpuffer (20x)	<ul style="list-style-type: none"> 500mM Bicine 500mM Bis-Tris 20mM EDTA steriles Wasser auf 125ml
TBS (10x)	<ul style="list-style-type: none"> 10mM Tris ph 7.5 150mM NaCl
TBS-T	<ul style="list-style-type: none"> TBS (1x) + 0.5% Tween 20
Trypsin-Lösung (2x)	<ul style="list-style-type: none"> 1 Trypsin-EDTA(10x) gelöst in HBSS
Matrixdissolvens	<ul style="list-style-type: none"> Aceton/0,1% TFA (97:3)
5fach Sample Puffer (Lämli)	<ul style="list-style-type: none"> 1M Tris HCL pH 6.8 (3ml) 50% Glycerol (25ml) 10%SDS (10ml) H2O (7ml)
Inhibitoren	<ul style="list-style-type: none"> Benzamidin 250mg/ml Aprotinin 2mg/ml Leupeptin 2mg/ml PMSF (Phenylmethyl-Sulfonylfluorid) 0,2MNa₃VO₄ 1M NaF 1M
Extraktionspuffer	<ul style="list-style-type: none"> 100mM Tris HCL pH 8,0 12,7mMEDTA10% SDS
Reydrierungspuffer	<ul style="list-style-type: none"> Rehydrierungslösung B 0,2% DTT 0,5%IPG-Puffer (3-10NL)
Equilibrierungspuffer	<ul style="list-style-type: none"> 50mM Tris-HCL ph8.8 6M Urea 30%Glycerol 2% SDS
12% Trenngel	<ul style="list-style-type: none"> 150ml Acrylamid (40%) 150ml ddH2O 188ml 1M Tris ph8,8 7,53ml SDS(10%) 0,65ml Temed 6,5ml Ammoniumpersulfat(1,5%)
PBS (10x)	<ul style="list-style-type: none"> Auf 1Liter: 80,9g NaCl 2g KCl 14,4 g Na₂HPO₄ pH 7,4

3. Antikörper

Zur Detektion der Proteine wurden verschiedene Erst- und Zweitantikörper eingesetzt.

3.1. Erstantikörper

Die folgenden Erstantikörper wurden bei verschiedenen Herstellern erworben und zur Immunoblotdetektion verwendet.

Tabelle 4: Erstantikörper

Spezifität	Herkunft	Hersteller
P-CREB Ser133	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
FGF-7	polyklonal (Ziege)	R&D Systems
FGF-7	polyklonal (Kaninchen)	Abcam
P-Akt Ser473	polyklonal (Kaninchen)	Cell Signaling
FGF-2	polyklonal (Ziege)	R&D Systems
P-Tyrosin	monoklonal (Maus)	Upstate
P-Erk 1/ 2 Thr202/204	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
FGF Receptor 2	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
FGF Receptor 2	polyklonal (Kaninchen)	R&dSystems
Lamin A/C	polyclonal (Maus)	B&D
GAPDH	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
P-JNK/SAPK	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
P-JAK1 Tyr1022	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
P-STAT3 Tyr701	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
Erk1/2	polyclonal (Maus)	B&D
P-MNK 1 Thr197	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
P-MSK S376	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
P-p38 Thr180/Tyr182	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
P-p90 RSK Thr359/S363	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
P-p90 RSK S380	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
P-MAPKAP2 Thr334	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
P-HSP S27	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
P-eIF4E S209	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
P-eIF4G S1108	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling

P-gp130 S782	polyklonal (Maus)	B&D
RSK	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
eIF4E	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
Cyclophilin A	polyklonal (Kaninchen)	Upstate
Panaktin	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
MNK1	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
MAPKAP	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
JAK1	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
CREB	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
p38	polyklonal (Kaninchen)	CellSignaling
Ral A	polyclonal (Maus)	B&D
Akt	polyclonal (Maus)	B&D
STAT3	polyclonal (Maus)	B&D

3.2. Zweitantikörper

Die folgenden horseradish Peroxidase konjugierten Zweitantikörper wurden für die Detektion des Erstantikörpers verwendet:

Tabelle 5: Zweitantikörper

Spezifität	Herkunft	Hersteller
Anti-Maus HRP	Ziege	Pierce
Anti-Kaninchen HRP	Ziege	Pierce
Anti-Ziege HRP	Kaninchen	Sigma
Anti-Ratte HRP	Kaninchen	Amersham
Anti-Ziege Alexa 488	Huhn	Invitrogen
Phalloidin Alexa 633		Invitrogen

4. Inhibitoren und Stimulatoren

Die in Tabelle 6 angeführten Substanzen wurden zur Inhibition und Stimulation bestimmter Kinasen eingesetzt.

Tabelle 6: Inhibitoren und Stimulatoren

Bezeichnung	Hersteller
IκB Kinase Inhibitor	Calbiochem
H-89	Sigma

UO126	Cell Signaling
SB203580, 202190, 239063	Upstate
LY294002	Cell Signalling
2,5 Dideoxyadenosin	Alexis
Forskolin	Calbiochem
IBMX (3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin)	Calbiochem
RP-MB-cAMPS	Calbiochem
Tyrphostin AG 490	Upstate
SL0101	Toronto Research Chemical
SP600125	Calbiochem
BI-D 1870	Böhringer-Ingelheim
CGP57380	Tocris

5. Zytokine und Wachstumsfaktoren

Alle benutzten Zytokine und Wachstumsfaktoren mit Ausnahme von Palifermin (Amgen) und FGF-7 (R&D Systems) wurden bei Cell Concepts erworben.

6. Kommerzielle Kits

Alle Versuchsvorgänge unter Verwendung der genannten Produkte wurden gemäß dem individuellen Instruktionsprotokoll der einzelnen Firmen durchgeführt.

Tabelle 7: Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
Bio-Rad DC Protein assay	Biorad
Super Signal West Femto Chemiluminescence Substrat	Pierce
Quentix Western Blot Signal Enhancer	Pierce
Silver Stainig Kit für Proteine	Amersham
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Pierce
Deglykosylierungskit	NEB

III. Methodik

1. Methoden der Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden glatte Muskelzellen und Endothelzellen aus der Schweineaorta isoliert und für in vitro Experimente verwendet.

1.1. Isolation und Kultur glatter Muskelzellen vom Schwein

Die für die Versuche verwendeten glatten Muskelzellen wurden aus dem Aortengewebe des Schweins isoliert. Ein Teil der Aorta descendens nahe des Arcus aortae wurde herauspräpariert und in HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) gewaschen. Die Inkubation in 70% Ethanol für 30 Sekunden und das darauf folgende Waschen diente dazu, die Endothelzellen im Gewebe zu eliminieren. 1g der Media wurde in kleine Stücke geschnitten und für eine Stunde in einer Lösung bestehend aus HBSS, 0,005% Kollagenase und 0,025% Elastase vorverdaut. Für die Inkubation war ein kontinuierliches Schütteln bei 125 rpm für 1h bei 37°C erforderlich. In einem neuen Aliquot der gleichen Lösung wurde die Media für drei weitere Stunden verdaut. Das Verdaute wurde nun gefiltert, um es vom Restgewebe zu trennen und anschließend für 10 min bei 1200rpm zentrifugiert. Darauf folgend wurde das Zellpellet in Earles Medium 199, das 10% FCS (fetales Kälberserum), 100U/ml Penicillin, 100mg/ml Streptomycin und 0,5 U/ml Amphotericin B enthält, aufgenommen. Nach Platzierung des Pellets in eine Zellkulturschale wurde es für etwa zwei Wochen bei 37°C in 5% CO₂-95% O₂ Atmosphärenkonzentration bis zum Erreichen einer Konfluenz (knapp 15x10⁶ Zellen) inkubiert. Die so kultivierten Zellen wurden in einem Verhältnis 1:3 passagiert. Nach 3-4 Tagen wurde wiederum eine Konfluenz der Zellen erlangt, was für eine Verdopplungsrate von 36-48 Stunden sprach.

Zur Stimulation mit verschiedenen Zytokinen wurden die glatten Muskelzellen drei Tage ohne Serum kultiviert, um eine Synchronisation der Zellen zu erreichen. Verwendet wurden Kulturen, die vorher in der entsprechenden Anzahl auf Zellkulturschalen ausgesät wurden, um gleichmäßige Kulturen zu erhalten. Die Zellen wurden in den Passagen drei bis sechs weiterverwendet und waren zum Zeitpunkt der Stimulation subkonfluent (ca. 70% Konfluenz). Beim Einsatz der in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelösten Inhibitoren wurden den Kontrollzellen äquivalente DMSO Mengen zugesetzt. Eine einstündige Präinkubation der Zellen mit dem Inhibitor war zwecks Enzymblockade ausreichend.

1.2. Isolation und Kultur makrovaskulärer Endothelzellen vom Schwein

Die makrovaskulären Endothelzellen wurden aus Schweineaorten isoliert. Die sofort nach dem Tod des Tieres entnommenen Aorten wurden bis zur Verarbeitung auf Eis gelagert. Sie wurden von Fett und Bindegewebe befreit, aufgeschnitten und aufgespannt. Die Endothelzellen wurden dann mit einem Skalpell abgeschabt und mit 5ml 0,055 Kollagenase in einem 10ml Falconröhrchen gespült. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt. Die Röhrchen wurden dann 15 min auf 37°C inkubiert und 5 min bei 1500rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin in 10% FCS enthaltenem Medium resuspendiert und anschließend auf einer mit Fibronectin beschichteten Platte ausgesät. Da Endothelzellen sich sehr schnell anheften, konnte durch einen nach 4h erfolgten Mediumwechsel eine erneute Aufreinigung erreicht werden.

1.3. Passagieren von Zellen

Nach Erreichen einer Konfluenz wurden die Zellen von den Platten mit Hilfe von Trypsin gelöst. Sowohl die Endothelzellen als auch die glatten Muskelzellen wurden bei jedem Passagedurchgang auf drei Schalen gesplittet (Ratio 1:3). Vor der Aufteilung wurden die Zellen mit HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) gewaschen, um sie im Anschluss mit 2xTrypsin/EDTA zu überschichten. Nach einer Inkubation von ca. 7-10 min bei 37 Grad lösten sich die Zellen von der Zellkulturschale ab. Die Zellsuspension wurde bei 1500rpm für 5 min zentrifugiert. Der sich dabei absetzende Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem 10% FCS enthaltenem Medium resuspendiert, um sie dann auf die Schalen zu verteilen.

1.4. Charakterisierung von Zellen

Die verwendeten Primärkulturen von glatten Muskelzellen wurden mit Hilfe verschiedener Methoden auf Verunreinigungen mit andern Zelltypen überprüft. Das Betrachten der Zellen unter dem Lichtmikroskop ermöglichte es, einen ersten Eindruck der Morphologie der Zellen zu erhalten. Der Einsatz immunologischer Methoden wie der FACS-Analyse und der Immunofluoreszenz erlaubten schlussendlich eine sichere spezifische Identifikation glatter Muskelzellen (siehe IV, 2).

1.5. FACS-Analyse (Fluorescence-Activated Cell Sorting)

Nach Erreichen einer Konfluenz wurden die glatten Muskelzellen zunächst trypsinisiert, um sie von der Zellkulturschale zu lösen. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Zellen daraufhin in 10%FCS-haltiges HBSS aufgenommen. Eine Fixierung der Zellen wurde mit der 10-minütigen Zugabe von 1% Formaldehyd erreicht. Die Inkubation in Methanol für 30 Minuten auf Eis führte zu einer Permeabilisierung der Zellen. Nach zweimaligem Waschen und 10-minütigem Blocken mit 0,5%BSA-haltigem HBSS wurden die Zellen jeweils mit dem Erstantikörper „smooth muscle myosin heavy chain“ und „ α -smooth muscle actin“ für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der mit Fluorochrom versetzte Zweitantikörper wurde nach einmaligem Waschen mit 0,5%BSA-haltigem HBSS für weitere 30 Minuten hinzugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift konnten die Zellen in HBSS resuspendiert werden, um sie mittels der Durchflusszytometrie (BD LSR II) zu analysieren.

2. Methoden der Proteinchemie

In dieser Arbeit wurden die Proteinnachweismethoden Western Blot und 2D-Gelelektrophorese eingesetzt.

2.1. Präparation und Bestimmung von Proteinen

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Proteinextraktion unterschiedlicher Medien beschrieben.

2.1.1. Präparation von Zelllysaten glatter Muskelzellen und Endothelzellen

Zunächst wurden die Zellen dreimal mit HBSS gewaschen, um sie daraufhin mit dem Extraktionspuffer (EP) inklusive Proteaseinhibitoren zu lysieren. Für die Proteinbestimmung wurden 5 μ l abgenommen. Die Homogenisierung der Zellproben erfolgte mittels Ultraschall in EP-Puffer. Im Anschluss wurde den Proben Lämmli-puffer (LB) und DTT zugesetzt. Abschließend wurden die Proben, um die Proteine zu denaturieren, für 10 min bei 70°C gekocht und dann bei -80°C gelagert.

2.1.2. Präparation von Zellüberständen glatter Muskelzellen und Endothelzellen

48 Stunden nach Stimulation wurde den Zellüberständen beider Zellarten nach deren Entnahme aus der Zellkulturschale je 1ml Probe 1µg Aprotinin hinzugegeben. Daraufhin wurden sie bei 4°C mit 4000rpm in Vivaspins (Vivasciences) zentrifugiert, um die Proteine zu konzentrieren. Es erfolgte eine weitere Konzentrierung in der Zentrifuge für je 30 min bei 15000rpm in SpinX. Diese Verarbeitung machte eine Messung des Proteingehaltes der Zellüberstände möglich. Die Proben wurden anschließend nach gleichem Procedere wie unter Punkt 2.1.1 beschrieben behandelt. Auf diese Weise wurde auch glykosyliertes FGF-7 Konzentrat aus dem Überstand glatter Muskelzellen gewonnen. Um eine ausreichende Menge zu erhalten, waren 40-60 150mm-Platten notwendig.

2.1.3. Fraktionierung der Kompartimente

Die geernteten Zellen wurden zunächst wie unter Punkt 2.1.1 beschrieben in mit Inhibitoren versetztem HBSS aufgenommen und bei 500g für 3 min zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet im Kit mitgelieferten „Zytoplasmatischen-Extraktions-Reagenz“ (CER I) aufgenommen und dispergiert. Nach kurzem vortexen wurde die Probe für etwa 10 min auf Eis gelegt. Nach Zugabe des Reagenz CER II wurde die Probe gevortext und bei 4 Grad für 5 min zentrifugiert. Der Überstand stellte dabei die zytoplasmatische Fraktion dar. Als letztes wurde das „Nukleäre-Extraktions-Reagenz“ (NER) zum Pellet hinzu gegeben und für 40 min auf Eis inkubiert, wobei alle 10 min die Probe gevortext wurde. Eine Zentrifugation für weitere 10 min bei 4 Grad führte zur nukleären Fraktion. Eine Kontrolle der Trennungsqualität wurde mit den spezifischen Markern der einzelnen Kompartimente gewährleistet. Hier stellte sich GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als geeigneter spezifischer Marker für das zytosolische und Lamin A/C für das nukleäre Kompartiment dar.

2.1.4. Bestimmung von Proteinkonzentrationen glatter Muskelzellen und Endothelzellen

Eine Quantifizierung der Proteine ermöglichte ein gleichmäßiges Laden der Proteine im Gel und war Voraussetzung für den späteren Vergleich der Proben. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels DC Protein Assay der Firma Biorad basierte auf der Methode von Lowry. Proteine komplexieren im alkalischen Milieu mit Kupfer-II-Ionen (Reagenz A). Dieser Prozess, bekannt als Biuret Reaktion, führte zu einer Blaufärbung der

Lösung. Die gebildeten Komplexe reagierten anschließend mit einem Folin-Ciocaltheu-Phenol Reagenz (Reagenz B). Durch die zusätzliche Reaktion und den intensiveren Farbumschlag zeigte der Lowry-Assay im Gegensatz zum Biuret-Assay eine verbesserte Sensitivität. Die Farbintensität war hierbei zur Proteinmenge proportional. Zur Kalibrierung der Proteinmenge wurden bekannte Mengen an BSA (bovines Serumalbumin) eingesetzt. Die calorimetrische Bestimmung erfolgte nach 15 Minuten in 96well Mikrotiterplatten im Photometer bei 750nm (Fluorimeter FLUOstar Galaxy). Die Proben wurden je nach gewünschter Endkonzentration mit EP, LB und DTT verdünnt. Zum vereinfachten Pipettieren wurden die Proben mit Bromphenolblau gefärbt.

2.2. Western Blot Analyse

Der Western Blot dient dem spezifischen Nachweis einzelner Proteine, Protein-Isoformen oder post-translational modifizierten Proteinvarianten aus einem komplexen Gemisch. Grundlegend wurde dabei die Fähigkeit von Antikörpern genutzt, welche ihre Ziel-Epitope hochspezifisch und meist mit guter Affinität erkennen und binden können. Nach der anfänglichen Auftrennung der Probe (meist durch denaturierende Gelelektrophorese, SDS-PAGE s.u.) wurden die Proteine für eine leichte Zugänglichkeit auf eine polymere Oberfläche (z.B. Nitrozellulose oder Polyvinylidendifluorid PVDF) übertragen – dieser Vorgang wird „blotting“ genannt. Auf den Membranen erfolgte der Nachweis der Proteine durch spezifische Antikörper. Üblicherweise wurde der adsorbierte (Primär-) Antikörper über einen enzymgekoppelten Zweitantikörper und eine nachfolgende enzymatische Umsetzung fluorogener Substrate visualisiert.

2.2.1. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (Laemmli, 1970) erlaubte die Auftrennung eines komplexen Proteingemischs annähernd nach Größe der Polypeptide in einem elektrischen Feld. Grundlegend dafür war der Einsatz von Natrium-Dodecylsulfat (engl. SDS für Sodiumdodecylsulfate). Diese ionische Detergenz wirkte zum einen denaturierend auf die Proteine, zum anderen bindet ein SDS-Molekül ca. 2 Aminosäuren und sorgte so für eine einheitliche negative Ladungsdichte der Probenmoleküle (wobei die Eigenladung des Proteins vernachlässigt werden kann). Die Komplexe aus SDS und Proteinen konnten so im elektrischen Feld durch den Siebeffekt einer Polyacrylamid-Matrix (durch radikalische Polymerisation aus Acrylamid und geringen Mengen von Methylenbisacrylamid, BIS) aufgetrennt werden. Dabei ist die elektrophoretische Mobilität in etwa proportional dem Logarithmus der Masse der Probenmoleküle. Zur Reduktion möglicher Schwefelbrücken der Proteine wurden

zusätzlich stark reduzierende Agentien wie β -Mercaptoethanol oder Dithiotreitol (DTT) verwendet. Für diese Arbeit wurden 4-12% BisTris Gradienten Gele der Firma Invitrogen verwendet. Die in Kammern fixierten Gele wurden mit MES-Puffer (Invitrogen) überschichtet und einheitlich mit 10-15 μ g des vorbereiteten Proteingemisches geladen. 4 μ l vorgefärbte Protein-Größenmarker in den äußeren Wells dienten der späteren Orientierung. Die Kammer wurde gekühlt für 15 min bei 75 V, danach bei 175 V dem elektrischen Feld ausgesetzt. Mit Hilfe des zugesetzten Farbstoffs Bromphenolblau und des vorgefärbten Proteinmarkers (BenchMark und MultiMark der Firma Invitrogen) konnte das Fortschreiten der Elektrophorese kontrolliert werden. Nach etwa einer Stunde lagen die Proteine nach ihrer Größe getrennt im Gel vor und konnten weiter verarbeitet werden.

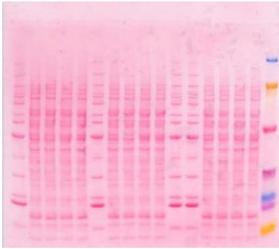
2.2.2. Proteintransfer

Für den Nachweis spezifischer Proteine bzw. der Epitope im Zuge des Western Blots wurden die Probenmoleküle im Anschluss an die SDS-PAGE auf eine Trägermatrix (Nitrozellulose- oder Polyvinylidendifluorid-Membran, PVDF) übertragen, wodurch diese im weiteren Verlaufe des Experimentes besser zugänglich und einfacher zu handhaben waren. Für den Transfer, dem so genannten „blotting“, wurde für diese Arbeit das Xcell II System der Firma Invitrogen verwendet. Das Gel, die Membran, Filterpapiere und Schwämme wurden zwischen zwei Plattenelektroden in einem geschlossenen System geschichtet (siehe Abb.5), mit Transferpuffer equilibriert und vertikal in die Blotkammer eingebaut, welche zur Kühlung und zum Schließen des Stromkreises mit Wasser befüllt wurde.

Oben  Unten	Anode(+)
	3 Schaumstoffpads in Transferpuffer eingelegt
	Filterpapier
	Transfermembran in Transferpuffer eingelegt
	SDS-polyacrylamid Gel
	Filterpapier
	2 Schaumstoffpads in Transferpuffer eingelegt
Kathode(-)	

Abbildung 5: Aufbau der „Blotting“-Kammer

Mit diesem System war nur ein relativ geringer Puffereinsatz notwendig, es zeigte eine hohe Sensitivität, die Transferzeit betrug zwei Stunden bei 30 V und es war keine



zusätzliche Kühlung notwendig. Die Transfereffizienz wurde anschließend durch die unspezifische Ponceau-Färbung mit dem Farbstoff Red Alert kontrolliert (siehe Abb.6)

Abbildung 6: Beispiel einer Ponceau-gefärbten Membran

2.2.3. Immunologische Detektion von Proteinen

Die verschiedenen Methoden spezifische Proteine zu visualisieren beruhen fast immer auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung. Eine direkte Detektion des Antikörpers ist beispielsweise möglich, wenn dieser durch Fluorophore markiert vorliegt. Aus Kostengründen weitaus häufiger findet jedoch ein indirekter Nachweis des Antikörpers statt, meist über einen zweiten Antikörper, welcher seinerseits an ein Enzym gekoppelt ist. Da diese Sekundärantikörper als Epitop meist den Fc-Terminus des Primärantikörpers erkennen (welcher Spezies-spezifisch ist), ist ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper ausreichend, um Antikörper aus einem speziellen Wirtsorganismus zu detektieren. Der Substratumsatz des gekoppelten Enzyms ermöglicht dabei zusätzlich eine höhere Sensitivität bei der Detektion. Anwendung findet hier die horseradish Peroxidase (HRP), welche künstliche Substrate umsetzt und so – in einem als Chemilumineszenz bezeichneten Prozess – Licht-Emission erzeugt (siehe Abb.6.1). Dieses Licht kann dann beispielsweise mittels sensibler Filme detektiert werden. Hier wurde ein System verwendet (VersaDoc), welches das emittierte Licht mittels spezieller CCD (charge coupled device) Kameras detektierte. Die digitalisierten CCD-Kameraaufnahmen erlaubten zudem eine densitometrische Quantifizierung der Signale.

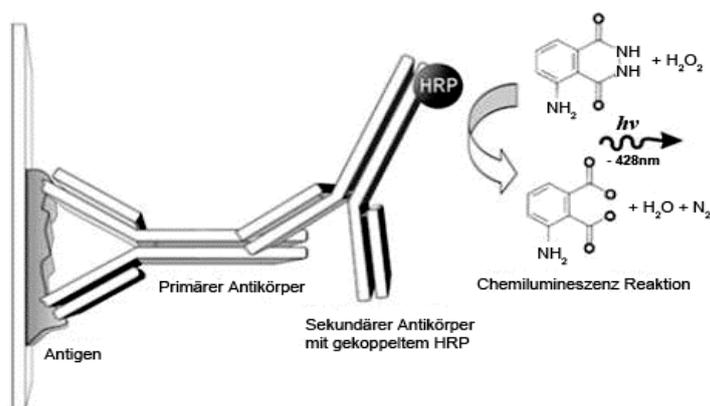


Abbildung 6.1: Prinzip der Detektion mittels HRP-gebundenen Sekundärantikörper

Die gesamte Durchführung ist nochmals in Tabelle 9 beschrieben.

Tabelle 9: Protokoll zum Nachweis spezifischer Proteine mittels Antikörper

	Arbeitsschritt	Reagenzien	Temp. Zeit
1	Wässern der Membran	ddH ₂ O	10 min bei RT
2	Verstärkung der Signale/ Festigung der Membran	Enhancer A	1 min bei RT
3	5 x Waschen	ddH ₂ O	Je 5 min bei RT
4	Verstärkung der Signale/ Festigung der Membran	Enhancer B	10 min bei RT
5	5 x Waschen	dd H ₂ O	Je 5 min bei RT
6	Blocken	5 % Milchpulver in TBST	1 h bei RT
7	5 x Waschen	TBST	Je 5 min bei RT
8	Inkubation des Primärantikörpers	Ak in 3 % Milchpulver/ TBST	12 h bei 4 °C
9	5 x Waschen	TBST	Je 5 min bei RT
10	Inkubation des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers	Ak in 3 % Milchpulver/ TBST	1 h bei RT
11	5 x Waschen	TBST	Je 5 min bei RT
12	Starten der Chemilumineszenz Reaktion	Femto RT	
13	Detektion im VersaDoc	MP 5000	

2.3. Quantifizierung und statistische Auswertung

Die Intensität der Banden wurde mit dem Software Programm Quantity One ermittelt. Das Protein Cyclophillin A wurde in den untersuchten Proben konstant in den Überstand sezerniert und da die eingesetzten Wachstumsfaktoren und Zytokine es nicht regulierten, diente es in den durchgeführten Experimenten als Ladekontrolle. Alternativ wurden Ponceau-gefärbte Membranen als Ladungskontrolle verwendet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von $n \geq 3$ Experimenten angegeben. Die Mittelwerte der Palifermin gespritzten Tiere wurden mit den Kontrollmäusen des entsprechenden Alters verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Students' t-Test, in welcher ein Wert von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurde. Eine Statistik wurde bei allen entscheidenden Aussagen angefertigt.

2.4. 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese trennt Proteine nach zwei Gesichtspunkten. Zum einen werden die Proteine nach ihren elektrischen Ladungseigenschaften durch einen pH Gradienten auf einem Strip und zum anderen nach ihren Molekülgrößen auf einem Gel getrennt.

2.4.1. Probenvorbereitung

Nach der oben beschriebenen Proteinbestimmung der Proben, wurden 90µg der Proteine mit 100µl Trichloressigsäure (TCA; 80%) vermischt, um eine TCA Endkonzentration von 20% zu erhalten. Die Proteine wurden dann für 1h auf Eis gelegt, um sie zu fällen. Die Proteine wurden dann bei 15000 rpm für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und 500µl Aceton hinzugegeben, um das TCA aus den Pellets zu lösen. Darauf folgte eine 5 minütige Zentrifugation. Nach drei Durchgängen wurden die Pellets nochmals für ca. 15 min, bevor die Vorbereitung zur isoelektrischen Fokussierung begann, zum trocknen gelegt.

2.4.2. Isoelektrische Fokussierung der 1. Dimension

400µl des fertigen Rehydrierungspuffers wurden auf die Pellets gegeben. Die Funktion des Puffers bestand darin, die Proteine zu lösen, zu denaturieren und Bindungen zu lösen. Der IPG- Puffer (Immobilized pH Gradient) sorgte für den pH-Gradienten bei der Auftrennung der Proteine. Die Proben wurden nun bei 1400rpm für eine Stunde geschüttelt. Für weitere 5 min wurden die Proben bei 15000rpm zentrifugiert, um die nicht gelösten Proteine abzuzentrifugieren. 400µl des Überstandes wurden auf einen sog. Stripholder gebracht, bevor der Gelstreifen (Immobiline Dry Strip ph 3-10 NL/18cm) selbst draufgelegt wurde. Zum Schluss wurden 800µl des Dry Strips Cover Fluid hinzugegeben, welcher das Austrocknen der Proben während der Elektrophorese verhindern sollte. Die Gelstreifen wurden nach folgendem Schema auf dem IPGphor laufen gelassen: 12h bei 30V, 1h bei 500V, 1h bei 1000V, 3h bei 8000V und weiter bei 8000V für ca. 5-6h bis insgesamt 70000Vh erreicht wurden.

2.4.3. Auftrennung der Proteine in der 2. Dimension

Die Gelstrips wurden zuerst für 15 min in eine Lösung aus 100mg DTT (Sigma) auf 10ml Equibilierungspuffer zur Denaturierung und Erhaltung des reduzierten Zustandes der Proteine gelegt und geschüttelt. Im nächsten Schritt wurden sie wiederum für 15 min in 250mg Iodacetamid (Sigma) auf 10ml Equibilierungspuffer getränkt, welches die Thiol-Gruppen der Proteine und des DTTs alkyliert und so eine Reoxidation verhinderte. Eine Reoxidation während der Elektrophorese hätte ein schlechteres Laufen der Proteine zur Folge. Die Gelstrips wurden nun auf das 2D-Gel (12% Trenngel) gebracht, auf welches Agarose mit Spuren von Bromphenolblau pipettiert wurde. Die Gele konnten nun in den Kammern befestigt werden, wo sie in SDS-PAGE running puffer nach folgendem Schema unter Kühlung liefen: 100V für 30min, 200V für 45 min und 400V für 3h.

2.5. Visualisierung und Evaluation der Ergebnisse

Die folgenden Punkte zeigen die notwendigen Schritte für die Färbung der Proteine.

2.5.1. Silberfärbung für Proteine

Folgende Angaben zur Silberfärbung (Tab.10) sind für ein Gel (12,5x26cm) mit einer Lösungsmenge von 250ml gegeben:

Tabelle 10: Arbeitsprotokoll zur Silberfärbung von Proteinen

	Arbeitsschritt	Reagenzien	Zeit
1	Fixation	<ul style="list-style-type: none">Ethanol (100ml)Essigsäure (25ml)H₂O auf 250ml	30 min
2	Sensitizing	<ul style="list-style-type: none">Ethanol (75ml)Sodiumthiosulfat (5%; 10ml)Natriumacetat (1 Packung)H₂O auf 250ml	30min
3	Waschen	<ul style="list-style-type: none">ddH₂O	3x5min
4	Silberreaktion	<ul style="list-style-type: none">Sibernitratlösung (2,5%; 25ml)H₂O auf 250ml	20min
5	Waschen	<ul style="list-style-type: none">H₂O	2x1min
6	Entwicklung	<ul style="list-style-type: none">Natriumcarbonat (1 Packung)Formaldehyd (37%; 0,1ml)H₂O auf 250ml	2-5min
7	Stop	<ul style="list-style-type: none">EDTA-Na (1 Packung)H₂O auf 250ml	10 min

2.5.2. Massenspektrometrische Identifizierung von 2D- elektrophoretisch getrennten Proteinen

Nach der Visualisierung der einzelnen Spots (Punkte) auf dem 2D-Gel, wurden zunächst die Gele mit dem Computerprogramm Image Master Labscan (Amersham) eingescannt und die interessanten Spots durch das Programm Proteom-Weaver (Definiens Imaging; München) ermittelt, um sie dann einzeln mit dem Skalpell herauszuschneiden und in ein Eppendorf tube (polymerfrei) zu legen. Da im 2D-Gel der FGF-7 stimulierten Zellen (siehe Abb.45) keine klar regulierten Proteinspots zu erkennen waren, wurde an dieser Stelle auf eine weitere Identifikation bestimmter Proteine verzichtet.

2.6. Multiplex System

Basis des Multiplex-Tests bilden kleinste Mikrokugeln aus Kunststoff, die mit spezifischen Antikörpern gegen die zu untersuchenden Proteine beschichtet sind. Jede der Mikrokugeln trägt dabei eine spezifische "spektrale Adresse", die durch das Verhältnis von zwei Fluoreszenzfarbstoffen charakterisiert ist, mit denen die Mikrokugeln dauerhaft gefärbt sind. Insgesamt können so bis zu 100 verschiedene Mikrokugel-Sets codiert werden. Jedes der Sets ist dabei mit einem unterschiedlichen Antikörper gegen jeweils eines der zu untersuchenden Proteine bestückt. Mit Hilfe der verschiedenen Mikrokugeln laufen im Test simultan bis zu 100 verschiedene quantitative und qualitative Analysen, die sich separat auswerten lassen. Wird eine Probe beispielsweise ein Zellextrakt nach Behandlung der Zellen mit einer potenziellen Wirksubstanz mit den Mikrokugeln inkubiert, werden die verschiedenen Proteine aus dem Zellextrakt an die entsprechenden Antikörper auf der Oberfläche der jeweiligen Mikrokugeln gebunden. Um die gebundene Menge zu messen, wird ein zweiter Antikörper gegen die jeweils untersuchten Proteine zugegeben, der mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Da die Menge dieses markierten Antikörpers proportional zur Menge des gebundenen Proteins ist, lässt sich die Konzentration des Eiweißes direkt anhand der Fluoreszenz ermitteln. Zur Messung von Menge und Art der gebundenen Proteine werden die Mikrokugeln zunächst automatisch in einer speziellen Kammer, dem Flüssig-Protein-Chip, mit einem Flüssigkeits-Strömungsverfahren separiert und nacheinander einzeln in eine spezielle Leseinheit des Systems transportiert. In der Leseinheit wird zunächst die jeweilige spektrale Codierung der Mikrokugeln nach Anregung mit einem Diodenlaser bestimmt. Dadurch erfolgt die Zuordnung des Messergebnisses zu einem spezifischen Antikörper. In einem zweiten Schritt wird die Menge des gebundenen Proteins über die Fluoreszenz des zweiten Antikörpers nach Anregung mit einem so genannten Reporter-Laser bestimmt. Die installierte Software des computergesteuerten Systems errechnet aus den gemessenen Fluoreszenzwerten die Gesamtkonzentrationen der entsprechenden Proteine.

Gemessen wurde in Seren von vorbehandelten und Kontroll-Mäusen. Hierfür wurden nach Stimulation die Mäuse dekapitiert und ihr Blut entnommen. Das Blut wurde daraufhin bei 1000rpm für 5 min zentrifugiert, um so die korpuskulären Blutbestandteile zu entfernen und nur noch das Serum zu erhalten.

3. Immunofluoreszenz

Die in dieser Arbeit beschriebenen immunhistologischen Untersuchungen dienen der genaueren Lokalisation relevanter Moleküle in der Zelle. Dazu wurden die Zellen in spezielle Kammern aufgenommen und je nach Versuchsaufbau behandelt. Zur Fixierung

der Zellen wurde Paraformaldehyd (PFA) verwendet, welches durch Quervernetzung von Aminogruppen die subzellulären Strukturen stabilisiert und somit der Strukturhaltung diene. Anschließend konnten die Proben mit Triton-X100 permeabilisiert werden. Dieses Detergenz steigert die Durchlässigkeit der Zellmembran und ermöglicht den Eintritt der Antikörper und die Färbung der Proteine in der Zelle. Nach der Permeabilisierung konnten mit BSA unspezifische Bindungen minimiert werden. Durch diese Absättigung freier Bindestellen wurde die Hintergrundfärbung reduziert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Abhängig von der Qualität des Antikörpers und der Probe erfolgte dieser Schritt entweder für drei Stunden bei Raumtemperatur oder für 12 Stunden bei 4 °C. Es folgte die Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der direkt an einem Fluorophor gebunden ist. Um glatte Muskelzellen zu identifizieren, wurden zusätzlich Fluorophor-markierte Substanzen eingesetzt, die Strukturproteine der glatten Muskelzellen binden, wie beispielsweise das Peptid Phalloidin, welches F-Aktin bindet und bei Anregung mit ultraviolettem Licht rot fluoresziert. Zur späteren Betrachtung und schnellen Orientierung auf der Probe unter dem Mikroskop erfolgte zusätzlich eine Zellkernfärbung mittels DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol). Dieser Farbstoff hat ein Absorptionsmaximum bei 359nm, das Emissionsmaximum liegt bei 461nm und lagert sich bevorzugt an der DNA an. DAPI leuchtet im Mikroskop blau. Nach den verschiedenen Färbe- und Waschschrinen (zusammengefasst in Tabelle 8) erfolgte die Visualisierung mittels des Fluoreszenzmikroskops. Beim Erstellen der Versuchsreihe wurde ein Objektträger als Negativkontrolle mit einbezogen. Dieser kam nicht mit dem Primärantikörper in Kontakt, sodass die unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers erfasst werden konnten. Die genauen Arbeitsschritte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 11: Protokoll der immunhistologischen Färbungen

1	Fixierung der Zellen 4 % PFA für 5 min bei Raumtemperatur
2	Waschen in PBS
3	Permeabilisierung mit Triton X100, 0,01% für 5 min
4	Waschen in PBS
5	Blocken mit 0,1 % BSA für 10 min
6	Waschen in PBS
7	Inkubation des Primärantikörpers bei 4 °C über Nacht
8	Waschen in PBS
9	Alle weiteren Schritte finden im Dunklen in einer feuchten Kammer statt
10	Inkubation des Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur für eine Stunde
11	Waschen in PBS
12	DAPI- Färbung bei Raumtemperatur für 15 min
13	Waschen in PBS
14	Phalloidin-Färbung bei Raumtemperatur für 15 min
15	Waschen in PBS
16	Eindeckeln in Mowiol und Betrachtung im Mikroskop

IV. Ergebnisse

1. FGF-7 Expression in wachsenden Kollateralarterien

In vorausgegangenen Studien wurde der Schwerpunkt am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung auf die Identifizierung differentiell exprimierter Gene während des Kollateralwachstums gelegt. Hierbei konnte nach arterieller Ligation mittels Northern Blots (nicht publizierte Daten, Rene Zimmermann) und Gene Arrays in den wachsenden Gefäßen der Kaninchen gegenüber den scheinoperierten (sham) Gefäßen unter anderem eine verstärkte Expression der mRNA für FGF-7 gezeigt werden. Mittels Western Blot Analyse wurde nun versucht, das korrespondierende Protein in den wachsenden Gefäßen nachzuweisen. Dafür wurden Kollateralgefäße im Bereich der Adduktoren 24 Stunden nach Ligatur der Femoralarterie bzw. nach Sham-Operation ohne Ligatur den Kaninchen entnommen (Proben wurden von Herrn Dr. Thomas Kubin zur Verfügung gestellt). Abbildung 7 zeigt Banden auf Höhe 26/28kDa korrespondierend mit FGF-7 sowohl in der ligierten wie auch in der Sham-operierten Gruppe. Die Expression von FGF-7 wurde in den Kollateralgefäßen in den ligierten Proben im Vergleich zur Sham-Gruppe nach einem Tag hochreguliert. Diese Ergebnisse deuten an, dass FGF-7 sowohl auf mRNA-(s.o.) als auch auf Proteinebene infolge einer Okklusion der Femoralarterie in den Kollateralgefäßen hochreguliert wird.

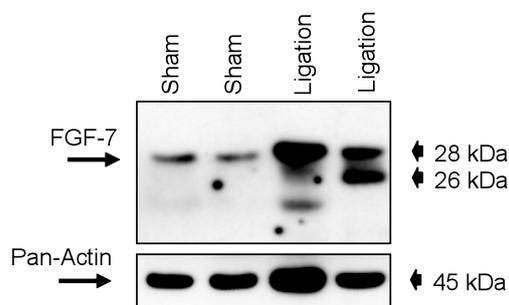


Abbildung 6: FGF-7 Expression nach Ligatur. Verstärkte Expression FGF-7 in wachsenden Kollateralen nach Ligatur der A.femoralis im Vergleich zu scheinoperierten (sham) Mäuse.

2. Charakterisierung glatter Muskelzellen

Da die Fragen nach der Regulation der FGF-7 Expression am Tiermodell nur schwer zu beantworten sind, wurden die Untersuchungen hauptsächlich an kultivierten vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC; vascular smooth muscle cells) durchgeführt. In Abb.8 wird ein typischer Phänotyp subkonfluenter glatter Muskelzellen in 10% FCS gezeigt. Die Zellen beginnen sich auszustrecken und nehmen eine spindelförmige Morphologie an. Die niedrige Anzahl heller Punkte spricht für das Vorhandensein nur weniger toter Zellen. Das Wachstumsverhalten und die Zellmorphologie bleiben im Laufe der Versuche bis zur

sechsten Passage vollkommen erhalten. Weitere Passagen (ab 10 und mehr) führen zur Abnahme der Qualität der Zellen, was am langsameren Wachstum der Zellen, der Bildung von Zellinseln und vermehrtem Zelltod erkennbar ist. Aus diesem Grund wurden ausschließlich Zellen zwischen der 3. und 6. Passage in den Experimenten verwendet.

Abbildung 8 zeigt im Lichtmikroskop dass die Morphologie der glatten Muskelzellen von verschiedenen Faktoren unterschiedlich beeinflusst werden kann. Während eine Stimulation mit IGF-1 (insulin-like growth factor) die Zellen größer und voluminöser erscheinen lässt, führt eine Onkostatin M Stimulation zu einem Zusammenziehen und einer Inselbildung der Zellen. Obwohl die Morphologie der Zellen für eine reine glatte Muskelzellkultur spricht, wurden mittels konfokaler Immunofluoreszenz und FACS-Analyse mögliche Kontaminationen durch andere Zellen ausgeschlossen und gleichzeitig das Zellkultursystem selbst nochmals charakterisiert. Die Charakterisierung basiert auf spezifisch von glatten Muskelzellen gebildeten Markern wie α -smooth muscle actin (α -SMA; grün) und smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC; gelb). Die folgenden Abbildungen veranschaulichen, dass fast alle Zellen positiv für die oben genannten Marker sind, sodass es sich um Zellkulturen mit einem hohen Reinheitsgrad handelt.

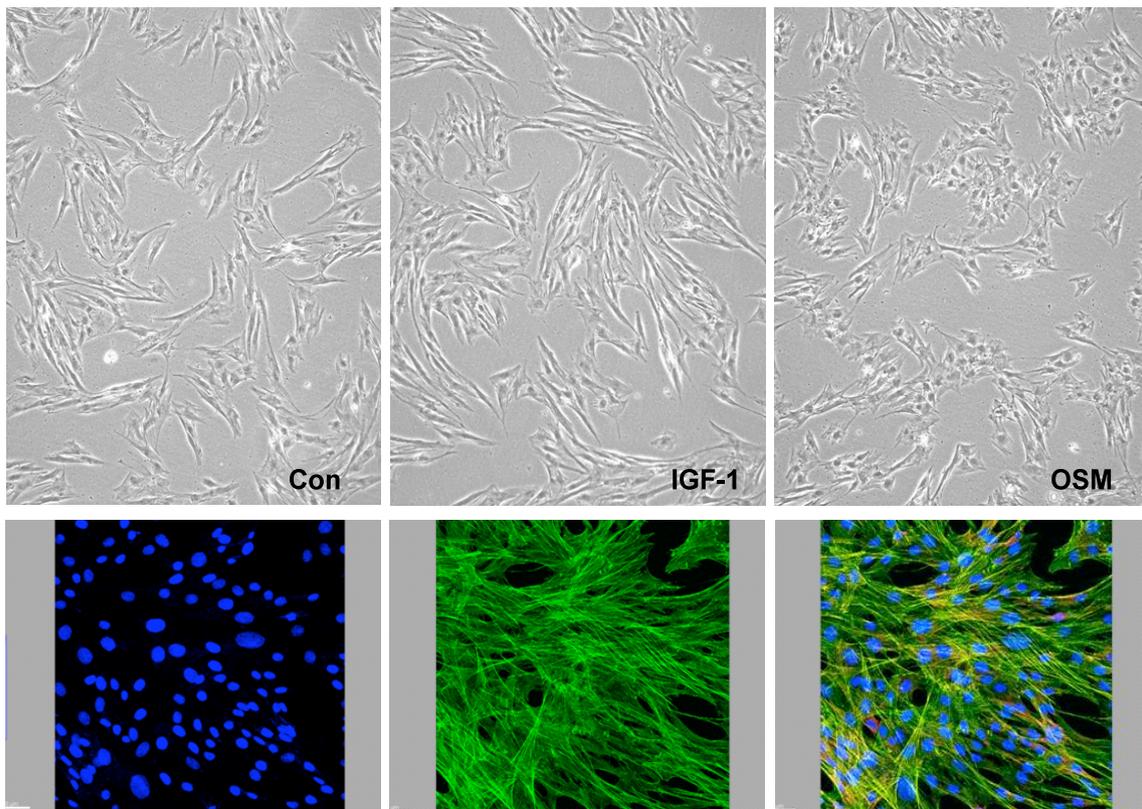


Abbildung 7: Vaskuläre glatte Muskelzellen. Oben: Veränderung der Morphologie glatter Muskelzellen durch Stimulation mit IGF-1 und OSM (Lichtmikroskop; 10fache Vergrößerung) Unten: Markierung der Zellen mit für glatte Muskelzellen spezifischen Markern (Immunofluoreszenzmikroskopie: blau=Dapi; grün= α -SMA; gelb=SM-MHC)

Als weitere Bestätigung der Reinheit der Kulturen wurde eine Durchflusszytometrie (FACS; fluorescence-activated cell sorter) durchgeführt (siehe Abb.9). Dazu wurden die glatten Muskelzellen mit den Antikörpern SM-MHC sowie α -SMA und zur Negativ-Kontrolle nur mit dem Zweitantikörper wie oben beschrieben behandelt. Im Vergleich zur Negativ-Kontrolle kommt es mit den spezifischen Markern zu einer Rechtsverschiebung im FACS-Profil, was für eine hohe Anzahl für diese Marker positive Zellen spricht.

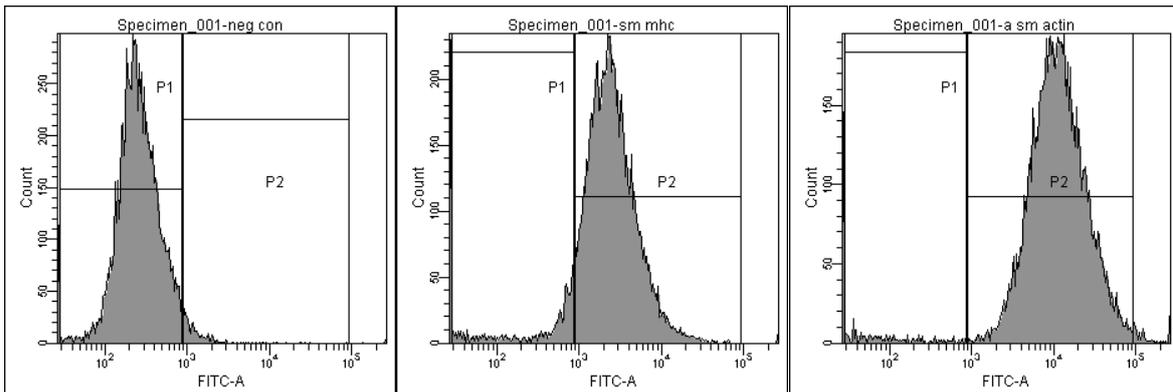


Abbildung 8: FACS Analyse glatter Muskelzellen. Das FACS-Profil zeigt im Vergleich zur Negativkontrolle eine Rechtsverschiebung für die glatten Muskelzellen spezifischen Marker α -SMA und SM-MHC.

3. 2-D gelelektrophoretische Analyse des sezernierten Proteoms glatter Muskelzellen und Endothelzellen

Da wachsende Kollateralarterien nicht nur aus glatten Muskelzellen, sondern auch aus Endothelzellen und Fibroblasten bestehen, wurden neben glatten Muskelzellen auch Endothelzellen aus der Aorta isoliert und charakterisiert. Auf die Isolierung von Fibroblasten wurde aufgrund der größeren Bedeutung von Endothelzellen und glatten Muskelzellen im Prozess der Arteriogenese verzichtet. Um die verschiedenen Funktionen unterschiedlicher Zellen im Gefäß wiederzugeben, wurde das sezernierte Proteom sowohl der glatten Muskelzellen als auch der Endothelzellen 2D gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 11 zeigt eine unterschiedliche Verteilung und Akzentuierung der Proteinpunkte, welche die spezifischen Aufgaben der unterschiedlichen Zellen im Gefäß wiedergeben.

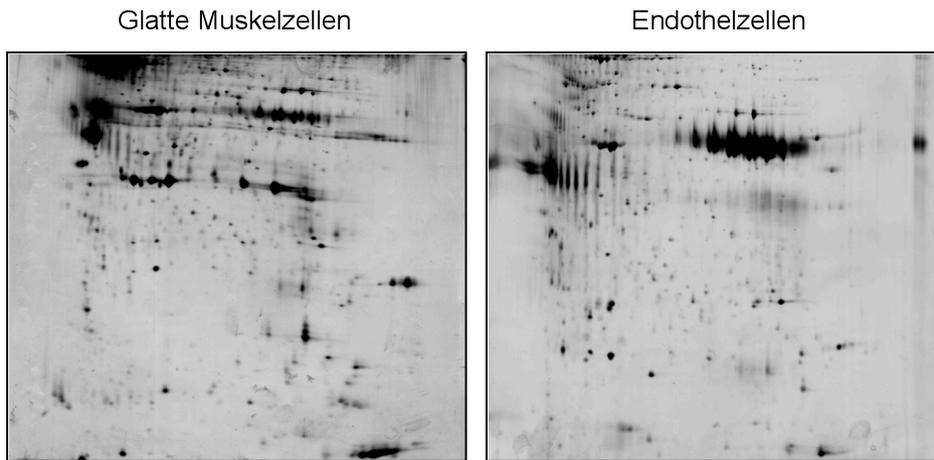


Abbildung 11: 2-D gelelektrophoretische Analyse. Charakteristisches sezerniertes Proteom nicht stimulierter glatter Muskel- und Endothelzellen.

4. Immunologische Detektion von FGF-7 im Überstand glatter Muskelzellen

Aus anderen Gewebearten ist FGF-7 ausschließlich als ein sezerniertes Protein bekannt, sodass zunächst der Nachweis von FGF-7 im Überstand glatter Muskelzellen vorgenommen wurde. Im Western Blot wird eine Doppelbande auf der Höhe von 26/28kDa und eine einzelne Bande bei 16kDa detektiert. Diese Werte stimmen mit den Literaturangaben überein, in denen die 26/28kDa Bande als glykolytierte Form des FGF-7 und die 16kDa Bande als degradierte Form definiert werden (Rubin, Bottaro et al. 1995). Zudem wurde aus E.Coli stammendes rekombinantes FGF-7 aufgetragen, welches eine Bande bei 19kDa zeigt, da es keine Glykosylierungen aufweist. Dem aufgetragenen Palifermin (rFGF-7) wurden, um eine erhöhte Stabilität gegenüber Temperatur- und Lichteinflüsse zu erhalten, 24 Aminosäurereste der insgesamt 164 Aminosäuren entfernt (Hsu, Osslund et al. 2006) und liegt dementsprechend ähnlich der degradierten FGF-7 Form bei 16kDa (siehe Abb.12).

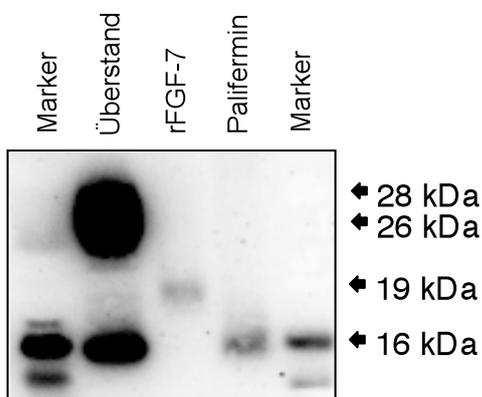


Abbildung.12: Detektion von FGF-7 mittels Western Blot. Darstellung des glykosylierten und rekombinanten FGF-7 sowie des Palifermins.

In der folgenden Abbildung wird die Membran zur Darstellung aller Banden nochmals in ihrer vollständigen Länge gezeigt, um mögliche Kreuzreaktionen des Antikörpers mit anderen Proteinen ausschließen zu können. Aus dem gleichen Grunde wurde zum Ausschluss unspezifischer Bindungen des R&D Antikörpers FGF-7 nochmals mittels eines weiteren Antikörpers der Firma Abcam detektiert. Hier wird ein dem R&D Antikörper vergleichbares Bandenmuster wiedergegeben (siehe Abb.13). Somit liegt FGF-7 im Überstand vaskulärer glatter Muskelzellen als glykosyliertes Protein vor.

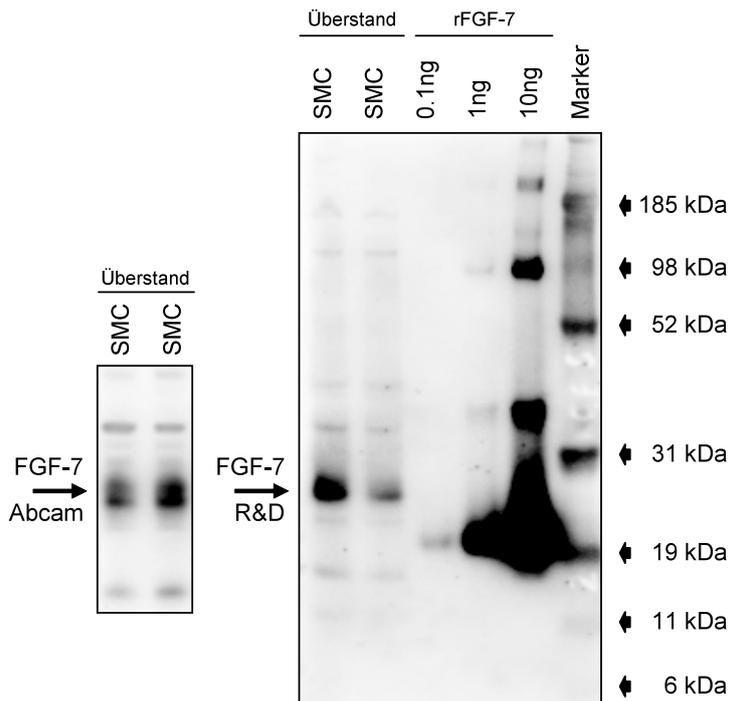


Abbildung 13: Darstellung FGF-7. Beide Antikörper (R&D, Abcam) zeigen ein identisches FGF-7 Muster. Beim Auftragen von 10ng rFGF-7 entstehen womöglich durch Polymerbildung rFGF-7 weitere Banden oberhalb von 19kDa.

5. Sezerniertes FGF-7 ist ein Glykoprotein

Für den Nachweis, dass die 26/28kDa Bande tatsächlich die, in Säugern durch Glykosylierung entstandenen, FGF-7-Formen darstellen, wurde das Enzym „Peptid:N-Glykosidase F“ (PNGase F) verwendet. Dieses Enzym entfernt die Zuckerseitenketten, die über das Stickstoffatom der Amidgruppe der Aminosäure Asparagin an das Protein gebunden sind. Nach Entfernen der Seitenketten ist eine Reduktion des Molekulargewichtes auf 19kD zu beobachten (siehe Abb.14). Diese Bandenhöhe entspricht genau dem nicht-glykosylierten, rekombinanten FGF-7. Neben der Reduktion des Molekulargewichtes bewirkt die Entfernung der Zuckerseitenketten auch das Ausbleiben der vorher beobachteten Doppelbanden. Erklärbar ist dieses durch die verschieden starken

Glykosylierungen des FGF-7 in der Zelle, welche auf diese Weise zwei unterschiedliche FGF-7 Größen hervorbringt.

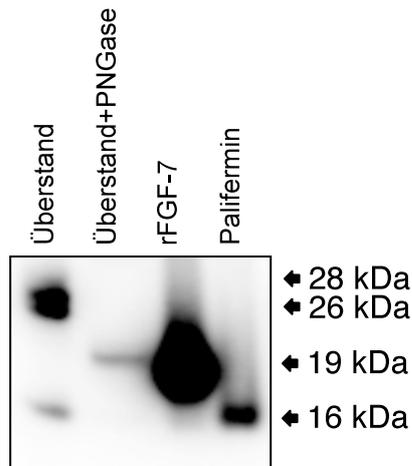


Abbildung 14: Einsatz von PNGase F. Nach Entfernung der Zuckerseitenketten durch die Glykosidase fällt das glykosylierte FGF-7 auf die Höhe des rekombinanten, nicht glykosylierten FGF-7.

6. Glatte Muskelzellen als Hauptquelle der FGF-7 Expression in vitro

Um weitere Zellarten im Gefäß zu ermitteln, die gegebenenfalls auch FGF-7 bilden, wurde der Überstand von Endothelzellen auf FGF-7 untersucht. In Abbildung 15 ist eine einzelne Bande erkennbar, die sich auf derselben Höhe der Doppelbande des von den glatten Muskelzellen gebildeten FGF-7 befindet. Die einzelne Bande ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass das von den makrovaskulären Endothelzellen gebildete FGF-7 im Gegensatz zu dem der glatten Muskelzellen nur eine Glykosylierungsstärke besitzt. Des Weiteren ist im Vergleich zu den glatten Muskelzellen eine viel schwächere Bande erfasst worden. Dies weist im Rahmen der in vitro Beobachtungen darauf hin, dass glatte Muskelzellen die Hauptproduzenten des FGF-7 im Gefäß sind.

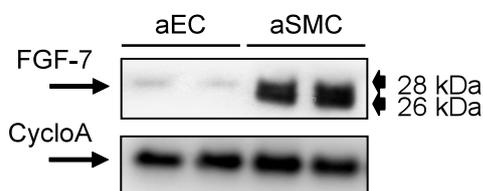


Abbildung 15: FGF-7 Detektion im Überstand. Das Signal der aortalen glatten Muskelzellen (aSMC) ist im Vergleich zu dem der Endothelzellen (aEC) intensiver und zeigt eine Doppelbande.

7. Welche Faktoren sind an der Regulation des FGF-7 beteiligt?

Zur Aufdeckung möglicher regulatorischer Faktoren wurden kultivierte glatte Muskelzellen mit verschiedenen Zytokinen stimuliert. Hier kamen zum einen für die

Arteriogenese notwendige inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (10ng/ml) und Onkostatin M (10ng/ml) sowie der arteriogene Wachstumsfaktor FGF-2 (10ng/ml) zum Einsatz, und zum anderen wurden auch antiinflammatorische Zytokine wie Interleukin-4 (10ng/ml) und Interleukin-13 (10ng/ml) berücksichtigt. Eine Konzentration von 10ng/ml entspricht der in der Literatur angegebenen gängigen Stimulationskonzentration, sodass diese auch für die hier durchgeführten Versuchsreihen verwendet wurde. 24 Stunden nach der ersten Stimulation wurde wiederholt stimuliert, um nach 48 Stunden den Überstand der Zellen zu ernten und im Western Blot aufzutragen. Die Absicht einer wiederholten Stimulation lag in der Förderung der Proteinexpression, die auf diese Weise einen weiteren Schub erhalten sollte. In Abb. 16 zeigte sich zunächst, dass die unbehandelten Zellen ein gewisses Basallevel an FGF-7 produzieren und ins Medium sezernierten. Während sowohl die inflammatorischen Zytokine als auch FGF-2 einen deutlichen Anstieg der FGF-7 Sekretion bedingen, lösten die antiinflammatorischen Zytokine eine Abnahme der Sekretion aus. Zusätzlich konnte eine Eigeninduktion von FGF-7 in Form eines autokrinen Mechanismus nach Stimulation mit rFGF-7 ausgeschlossen werden.

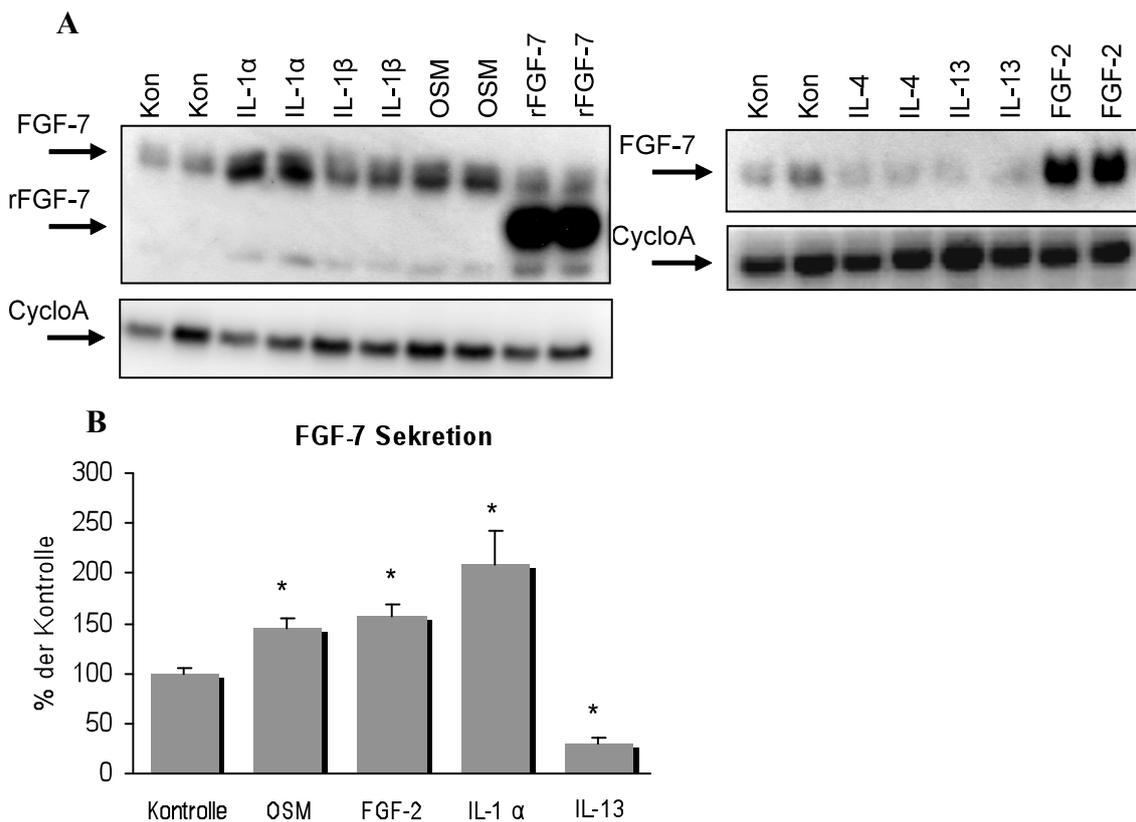


Abbildung 16: Stimulation glatter Muskelzellen mit verschiedenen Faktoren. A: Eine Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen (IL-1, OSM) sowie FGF-2 erhöht die FGF-7 Sekretion, während antiinflammatorische Zytokine (IL-13, IL-4) die Sekretion inhibieren. rFGF-7 führt zu keiner Autostimulation. B: Alle Ergebnisse weisen eine statistische Signifikanz zur Kontrolle auf (* $p < 0,05$, $n=4$).

Im Gegenzug wurde kontrolliert, ob eine ähnliche Regulation durch jene Faktoren an makrovaskulären Endothelzellen zu erzielen ist. Hierbei fällt auf, dass keinerlei Effekte im Sinne einer Ab- oder Zunahme der FGF-7 Sekretion festzustellen sind. Da die FGF-7 Expression in Endothelzellen von den in Abb.17 zu sehenden Zytokinen nicht beeinflusst wird, wurden weitere Untersuchungen bezüglich der FGF-7 Expression nur an glatten Muskelzellen durchgeführt.

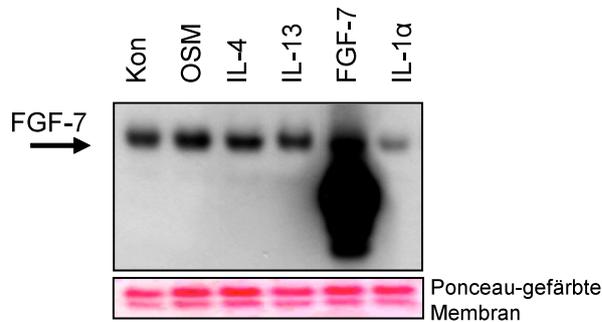


Abbildung 17: Stimulation von Endothelzellen mit verschiedenen Faktoren. Die FGF-7 Sekretion wird durch die hier verwendeten Faktoren nicht beeinflusst.

8. Aktivierung diverser Signaltransduktionswege in glatten Muskelzellen durch Onkostatin M (OSM)

Obwohl in Vorversuchen verschiedene Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren in der Lage waren, FGF-7 in glatten Muskelzellen mit unterschiedlicher Potenz zu induzieren, wurde im weiteren Verlauf der Versuchsreihen das Hauptaugenmerk auf Onkostatin M gelegt, um die Mechanismen, die der FGF-7 Expression zu Grunde liegen, näher zu untersuchen. Die Wahl fiel auf Onkostatin M, da zum einen wenig über die Wirkungen von Onkostatin M auf vaskuläre glatte Muskelzellen bekannt ist und da zum anderen Onkostatin M ein sezerniertes Zytokin darstellt, das vor allem von den für die Arteriogenese unentbehrlichen Makrophagen produziert wird.

So sollten im ersten Schritt möglichst viele durch OSM aktivierte intrazelluläre Signalwege in glatten Muskelzellen aufgezeigt werden (unter Punkt 8). Im nächsten Schritt sollte mittels spezifischer Inhibitoren eine Signalkaskade nach der anderen ausgeschaltet werden, um die Folgen auf die FGF-7 Sekretion zu ermitteln (unter Punkt 9). Auf diese Weise könnte letztlich der entscheidende Signalweg, der zu einer verstärkten FGF-7 Expression führt, identifiziert werden (siehe Abb.18).

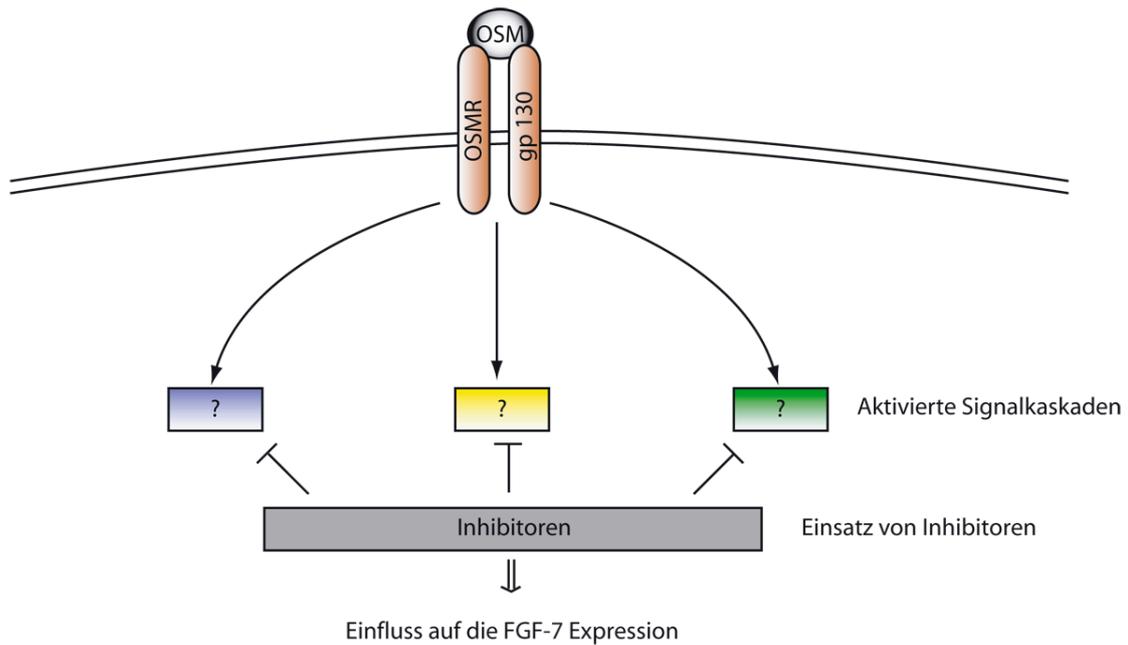


Abbildung 18: Strategie zur Identifizierung des FGF-7 induzierenden Signalweges. Zunächst sollten die von OSM aktivierten Signalkaskaden ermittelt werden, um dann mittels Inhibitoren deren Einfluss auf die FGF-7 Sekretion zu prüfen.

Für den Nachweis der OSM induzierenden Signaltransduktionswege wurden die Zellen mit Onkostatine M (10ng/ml) in einer Zeitreihe stimuliert. Zusätzlich wurden durch Einsatz bestimmter Inhibitoren Enzyme einzelner Signalketten geblockt. Dies sollte die Potenz der später unter Punkt 9 eingesetzten Inhibitoren belegen. Dabei kamen UO126 als Inhibitor der ERK-, SB202190 der der p38- und LY294002 der der Akt-Signalkaskade (alle 10 μ M) zum Einsatz. Eine Wirksamkeit der Inhibitoren bei einer Konzentration von 10 μ M wurde in Vorversuchen ermittelt.

8.1. Gp130 Rezeptoruntereinheit-Aktivierung durch Onkostatine M

Die Bildung des OSM Rezeptorkomplex ist einzigartig unter den Mitgliedern der IL-6 Familie. Es bindet, anders als die anderen Zytokine, zuerst die gp130 Untereinheit, um dann einen „high affinity“ Rezeptorkomplex durch Bildung eines Heterodimers zu formen. Die Rezeptordimerisierung führt zu einer Aktivierung der Janus Kinasen (JAK, Tyk), welche die Rezeptoruntereinheiten phosphorylieren und somit die Signalkette starten. Eine Besonderheit im Menschen ist die Fähigkeit zur Bildung eines Heterodimers mit der OSMR β - sowie der LIFR β -Untereinheit, während in der Maus OSM nur mit dem OSMR β einen Komplex bilden kann. Da diese unterschiedlichen Bindungseigenschaften in diesem Fall für die Aktivierung der einzelnen Signalwege keine entscheidende Rolle spielen, wurde nur die Aktivierung der gp130 Untereinheit nachgewiesen. Der Antikörper

detektiert eine Phosphorylierung der gp130 Untereinheit nach einer OSM Stimulation für 10 Minuten, die jedoch nach 2 Stunden wieder auf das Kontrollniveau fällt (siehe Abb.19).

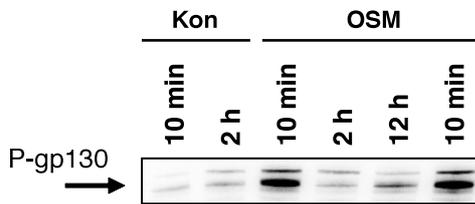


Abbildung 19: Rezeptor gp-130 Aktivierung. Die Stimulation der glatten Muskelzellen mit OSM führt zu einer Aktivierung seiner Rezeptoruntereinheit gp-130. Die Aktivierung lässt innerhalb von 2h nach.

8.2. Effekte des OSM auf die Aktivierung des JAK-STAT und des PI3K-AKT Signaltransduktionsweges

Der JAK-STAT Signaltransduktionsweg spielt eine entscheidende Rolle in homostatischen Prozessen wie Wachstum, Zellüberleben, Differenzierung, Hämatopoese und Immunantworten, indem es Signale in Form von Zytokinen aus dem extrazellulären Milieu in den Zellkern weiterleitet. Viele verschiedene Zytokine der Interleukin- oder Interferongruppe führen über den JAK-STAT Signalweg ihre Funktionen aus. Störungen der Signaltransduktion führen häufig zu immunologischen und anderen Krankheitsbildern (Chen, Daines et al. 2004).

Die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) nimmt in der Vermittlung bestimmter Funktionen wie Wachstum, Differenzierung, Chemotaxis und insbesondere im Zellüberleben eine zentrale Position ein (Vanhaesebroeck, Leever et al. 1997). Die oben genannte JAK ist eine unter vielen Möglichkeiten die PI3K zu aktivieren (Saxena, Sharma et al. 2007). Um eine Aktivierung dieses Signalweges nachzuweisen, wurde das „downstream“ Zielenzym der PI3-Kinase, die Akt/PKB analysiert. Abbildung 20 veranschaulicht, dass die Inhibitoren der AKT-, p38- und ERK-Signaltransduktionswege keine Veränderung der OSM-induzierten JAK1- und STAT3- Phosphorylierung bewirken, während die Aktivierung der Akt durch LY294002 gehemmt wird.

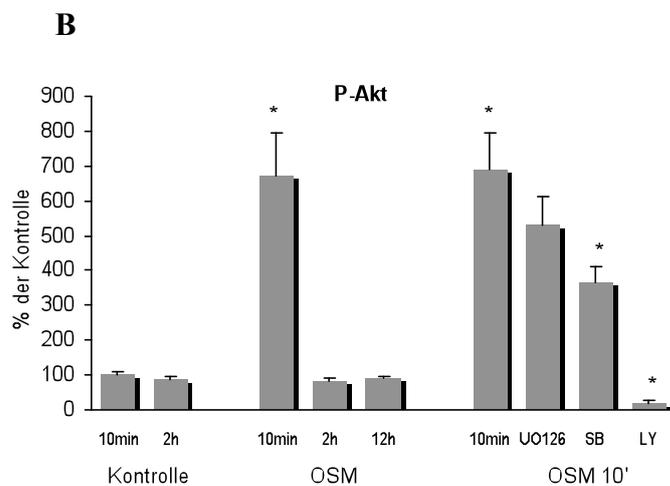
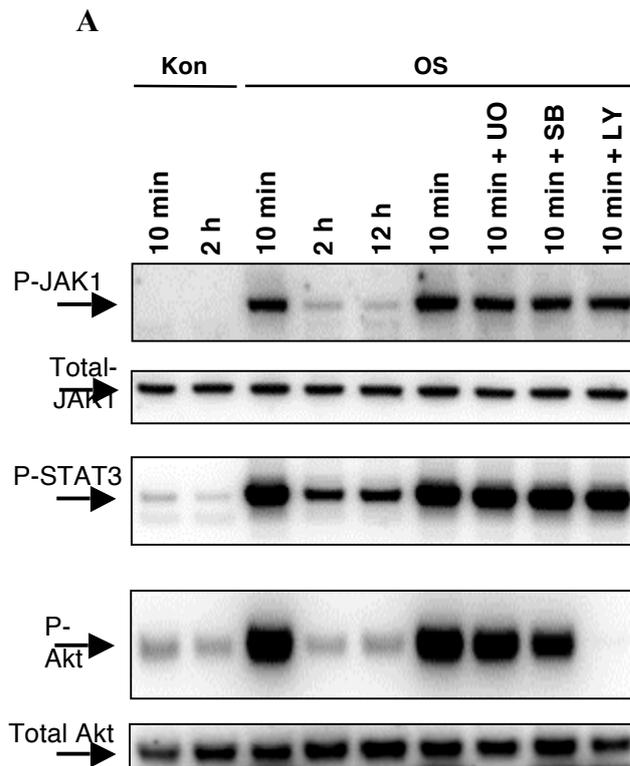


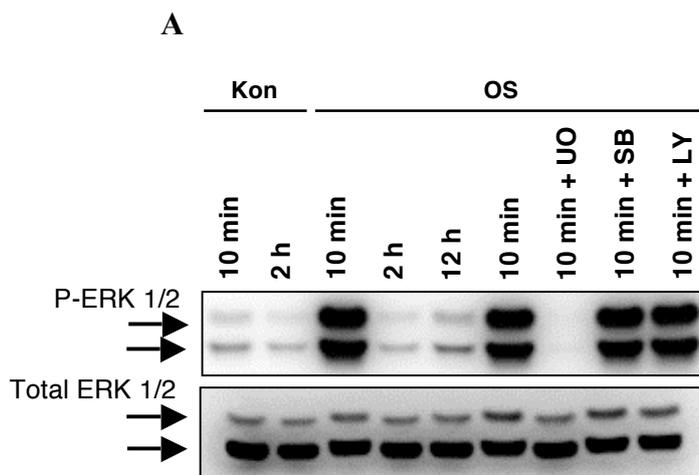
Abbildung 20: JAK-STAT und Akt Signalkaskade. A: Eine 10-minütige Stimulation mit OSM führt zur Phosphorylierung von JAK1, STAT3 sowie der Akt. Die eingesetzten Inhibitoren verursachen keine Veränderung der Aktivierung der JAK1 und des STAT3. LY verhindert die Phosphorylierung der Akt durch Hemmung der PI3-Kinase. B: Signifikante Aktivierung der Akt durch OSM und Inhibition der Akt durch LY. * $p < 0,05$, $n = 4$

8.3. Effekte des OSM auf die Aktivierung der MAP-Kinasen

Die Familie der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) umfasst eine Gruppe von Enzymen, die zelluläre Aktivitäten wie Mitose, Metabolismus, Apoptose und

Zellüberleben regulieren. Unter ihnen sind die MAPK ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase), p38 und JNK/SAPK (c-jun N-terminale-/stressaktivierte Protein-Kinase) die am intensivsten untersuchten Kinasen. Die ERK Signalkaskade wird in etlichen Zellarten als Antwort auf extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren oder Phorbol ester aktiviert. Dort beeinflusst sie das Wachstums-, Differenzierungs- und Migrationsverhalten einzelner Zellverbände (Roux and Blenis 2004). Die beiden Kinasen p38 und JNK/SAPK hingegen kontrollieren vor allem die zelluläre Reaktion auf verschiedene Zytokine und Zellstress. Eine starke Induktion folgt meist auf zellulären Stress durch Radiatio, Hyperosmolarität, Anisomycin, inflammatorische Zytokine und zu einem gewissen Grad auch durch Wachstumsfaktoren (Derijard, Hibi et al. 1994; Kyriakis, Banerjee et al. 1994; Raingeaud, Gupta et al. 1995).

Auf die Stimulation der Zellen mit OSM folgt eine rasche Phosphorylierung der ERK1/2, die nach zwei Stunden wie auch unter dem Einfluss von UO126, einem MEK Kinase Inhibitors, abnimmt bis komplett verschwindet (siehe Abb.21).



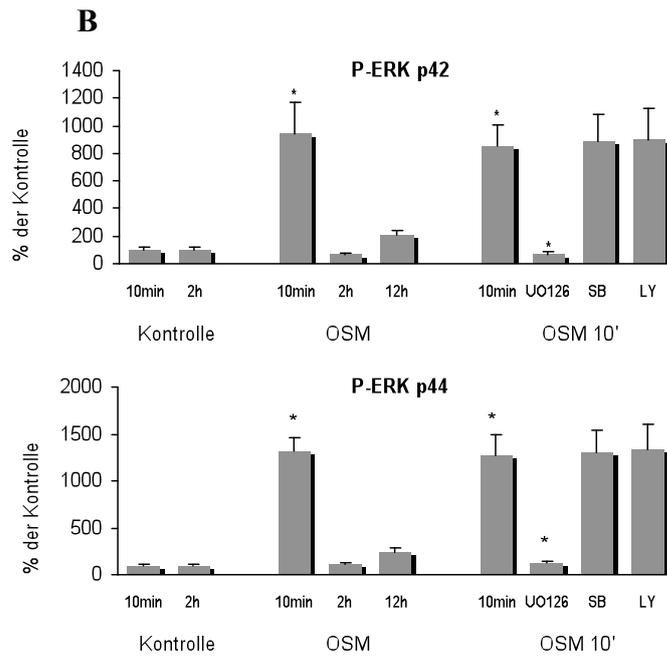


Abbildung 21: ERK1/2 Signalkaskade. A: Phosphorylierung der ERK p42 und p44 durch OSM. Während UO die Phosphorylierung verhindert, üben SB und LY keinen Einfluss aus. B: Signifikante Veränderung des Phosphorylierungsstatus der ERK p42/p44 durch OSM und UO (* $p < 0,05$, $n = 4$).

Auch die JNK/SAPK (Thr183/Tyr185) und die p38 MAP-Kinasen werden durch OSM aktiviert. Da der Inhibitor SB203508 nicht die Phosphorylierung, sondern die Aktivität der p38 hemmt, wurde zur Kontrolle der Potenz des Inhibitors das bekannte p38 Substrat hsp27 (Hitzeschockprotein) auf eine Inhibition der Phosphorylierung untersucht. Erwartungsgemäß ist eine Abnahme der hsp27 Phosphorylierung nach SB203508-Zugabe zu sehen (siehe Abb.22).

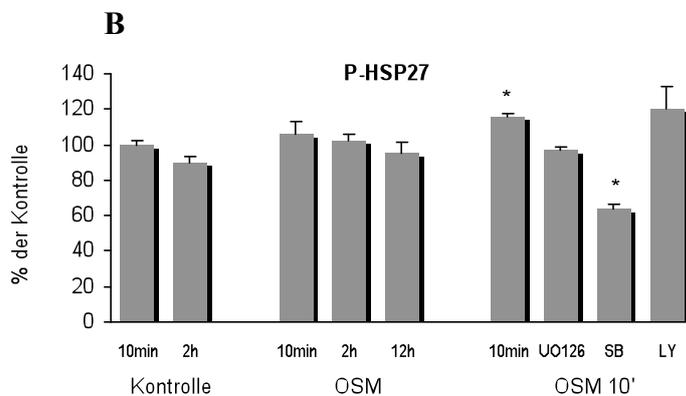
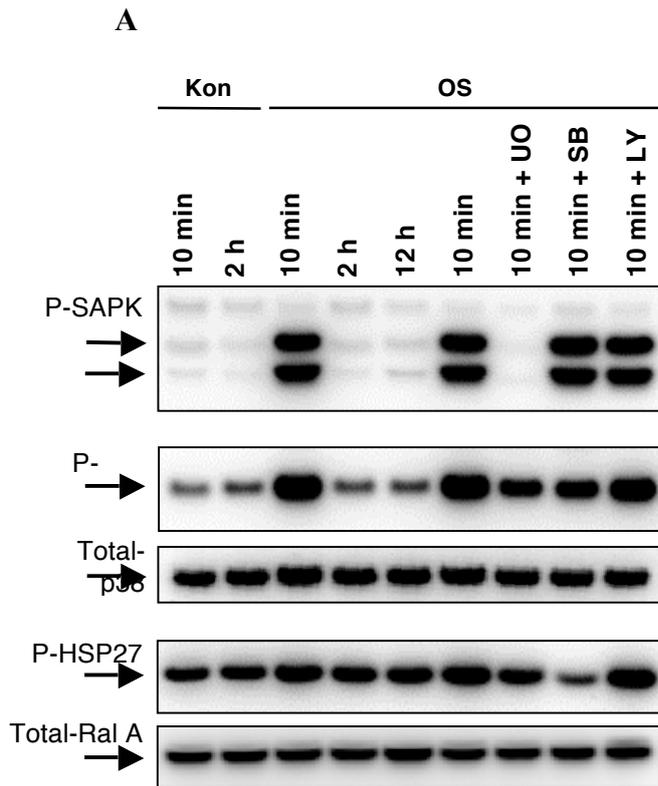


Abbildung 22: JNK/SAPK und p38 Signalkaskade. A: OSM führt zur Aktivierung der JNK/SAPK sowie der p38 MAPK nach 10 Minuten. UO inhibiert die Phosphorylierung der JNK/SAPK wie auch SB die Phosphorylierung des p38 Substrates hsp27 inhibiert. B: Statistische Auswertung des hsp27 Phosphorylierungsstatus (*p<0,01, n=4).

8.4. Aktivierung der weiter „downstream“ liegenden MAPK-aktivierte Protein Kinase

Zielproteine der oben genannten MAP-Kinasen sind die MK (MAPK-aktivierte Protein-Kinasen). Interessanterweise stellt die JNK/SAPK in der Gruppe der MAPK eine Ausnahme dar, da ihr bisher keine Aktivierung einer bekannten MK zugewiesen werden

konnte. Zur Gruppe der MK gehören die RSK (p90 ribosomal S6 kinase), MSK (mitogen- und stressaktivierte Proteinkinase), MNK (MAPK-interagierende Kinase), und die MK. Während die RSK spezifisch durch ERK aktiviert werden, werden die MK hauptsächlich durch die p38 MAPK phosphoryliert. Demgegenüber sind MSK und MNK Zielproteine beider MAPK. Je nach Kinase werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die für die Zellreaktion auf Stress und Reize wie Proliferation oder Zellüberleben benötigt werden. Neben der Transkription kann zudem die Translationsmaschinerie speziell durch MNK beeinflusst werden. (Roux and Blenis 2004). Die MK-MNK wird aufgrund ihrer für die FGF-7 Synthese besonderen Stellung in Punkt 8.6 gesondert betrachtet. Wie in Abbildung 22 und 23 zu sehen ist, werden durch OSM in glatten Muskelzellen alle MAPK aktiviert, sodass erwartungsgemäß auch zahlreiche MK wie die RSK, MSK und MK-2 weiter „downstream“ aktiviert wurden (siehe Abb.23).

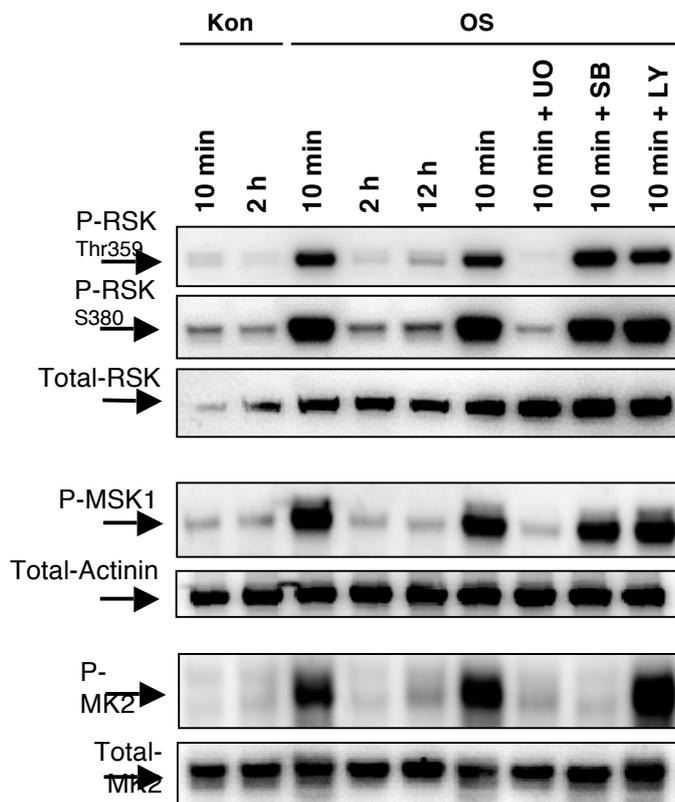


Abbildung 23: MAPK-aktivierte Kinasen (MK). OSM aktiviert die MK RSK, MSK sowie MK-2. UO inhibiert sowohl die Phosphorylierung der RSK (S380/Thr359) als auch die der MSK und MK-2. SB verhindert die Phosphorylierung der MK-2. LY übt keinen Einfluss auf die gezeigten Kinasen aus.

8.5. Effekte des OSM auf die Aktivierung der „MAPK-Interacting Kinase 1 und 2“ (MNK1/2)

Die MNK ist neben der MSK eine weitere „downstream“ vorkommende Kinase, die sowohl durch p38 als auch durch ERK1/2 aktiviert werden kann. Es werden zwei Isoformen unterschieden, die nicht nur in ihrer Größe, sondern auch in ihrer Funktion variieren. Mittlerweile sind verschiedene MAPK-Phosphorylierungsstellen der MNK1/2 nachgewiesen worden, wobei in der Fachliteratur die Phosphorylierungsstellen Thr197 und Thyr202 am häufigsten nachgewiesen werden. Das bekannteste Substrat der MNK1/2 ist der eukaryote Initiationsfaktor 4E (eIF4E), welcher in der Regulation der Biosynthese vieler Zytokine und anderer Proteine eine wichtige Funktion einnimmt (Roux and Blenis 2004).

In Abbildung 24 ist zum einen eine durchgängige Phosphorylierung in allen Proben zu sehen, während eine zusätzliche Bande erst nach OSM Stimulation zu sehen ist. Da der Antikörper zwar hauptsächlich P-MNK1 an Position Thr197/202, jedoch auch P-MNK2 bindet, wurde mittels eines Antikörpers, der MNK1 detektiert, die Höhe von MNK1 festgestellt. Hieraus lässt sich schließen, dass nach OSM Stimulation eine Phosphorylierung der MNK1 stattfindet, die durch UO126 aber nicht durch SB202190 oder LY294002 abgeschwächt wird. Dementsprechend stellt die darüber liegende Bande wohl MNK2 mit seiner basalen Aktivität dar, die durch OSM kaum beeinflusst wird. Zudem zeigt Abb.24 eine basale Aktivität des MNK1/2 Substrates eIF4E, welche durch OSM nicht verstärkt werden kann. Der Einsatz von UO126 bewirkt womöglich durch eine Hemmung der basalen MNK1/2 Aktivität eine leichte Abschwächung des basalen eIF4E Levels, während eine Inhibition der p38 MAPK zu keiner Veränderung führt. Lediglich eine Inhibition des Akt-Signalweges durch LY294002 senkt die Basalaktivität des eIF4Es deutlich.

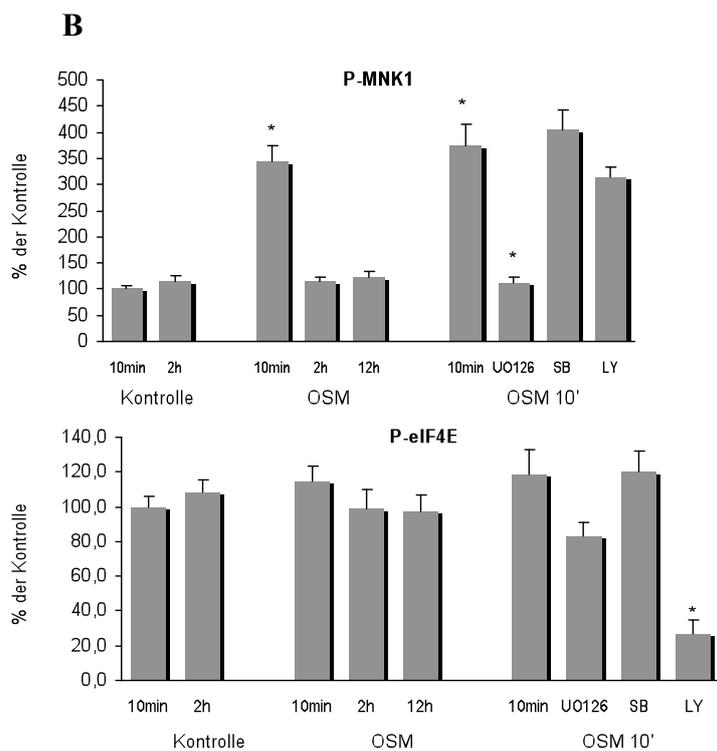
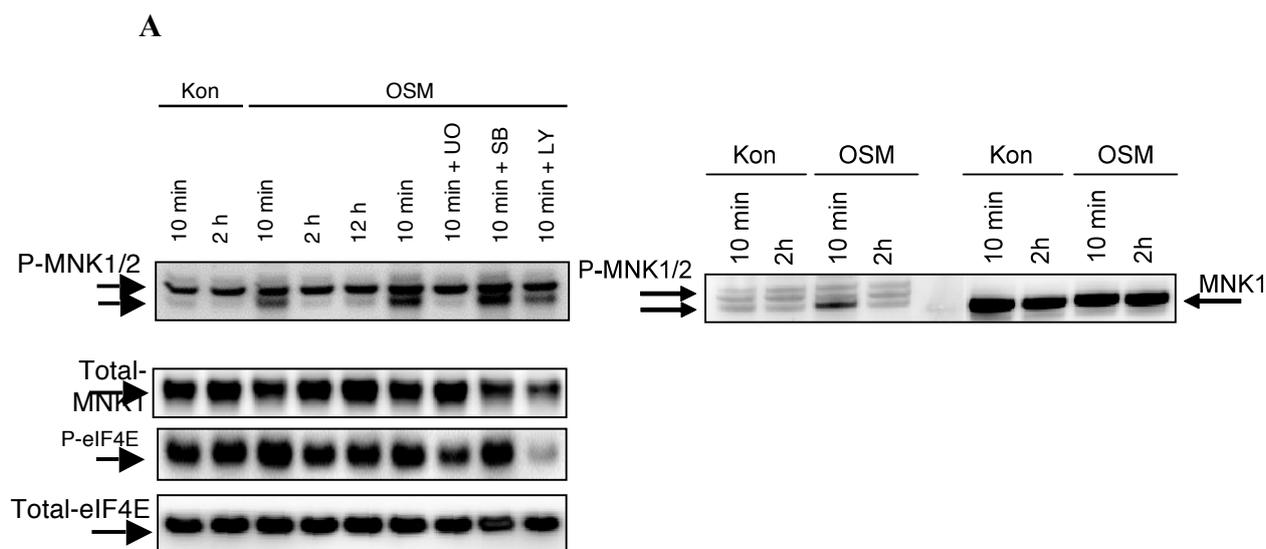


Abbildung 24: MNK1/2 und eIF4E. A: Eine OSM Stimulation führt zur Phosphorylierung der MNK-1, während die Basalaktivität der MNK-2 und die des eIF4E nicht beeinflusst wird. UO hemmt die Phosphorylierung der MNK-1, wohingegen es die Phosphorylierung des eIF4E abschwächt. LY hingegen verhindert eine Phosphorylierung des eIF4E. B: Die Aktivierung der MNK-1 durch OSM sowie die Inhibition durch UO sind statistisch signifikant. Gleichermäßen ist die Inhibition von eIF4E durch LY signifikant (* $p < 0,005$, $n = 4$).

8.6. Effekte des OSM auf die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB und ATF-1

CREB (cAMP-response element binding protein) ist ein 43kDa großer Transkriptionsfaktor, welchem eine wichtige Funktion in der Differenzierung bestimmter Zellarten wie Adipozyten, vaskulärer glatter Muskelzellen, Nervenzellen sowie Kardiomyozyten zugeschrieben wird. Die Prävention vor Apoptose in Adipozyten und Neuronen stellt eine zusätzliche interessante Eigenschaft dar (Reusch and Klemm 2003). Der klassische Weg, der zu einer CREB-Phosphorylierung führt, ist ein Anstieg der cAMP- (zyklisches Adenosin Monophosphat) Konzentration in der Zelle, die zu einer PKA- (Proteinkinase A) Aktivierung führt. Die PKA transloziert nun in den Zellkern und aktiviert CREB (Johannessen, Delghandi et al. 2004). Die Familie der ATF (Activating Transcription Factor) können ähnlich des CREB CRE (cAMP Response Element) Bindungsstellen der DNA binden und so die Expression verschiedener Proteine einleiten (Zhou and Finch 1999). Andere potentielle CREB Aktivatoren stellen ERK1/2 und p38 mit deren „downstream“ Kinasen RSK, MSK sowie MK-2 dar (Delghandi, Johannessen et al. 2005).

Das spezielle Interesse in dieser Arbeit an CREB und ATF-1 begründet sich zum einen aus der Tatsache, dass FGF-7 in Fibroblasten durch einen cAMP-abhängigen Prozess induziert wird (Zhou and Finch 1999) und zum anderen daraus, dass OSM die potentiellen CREB Aktivatoren RSK, MSK wie auch MK-2 aktiviert (siehe Abb.23). Abbildung 25 zeigt eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB und ATF-1, welcher durch eine Kreuzreaktion des Antikörpers gegen P-CREB ebenfalls gebunden wird. UO126, aber nicht SB202190 oder LY294002, können die Phosphorylierung abschwächen.

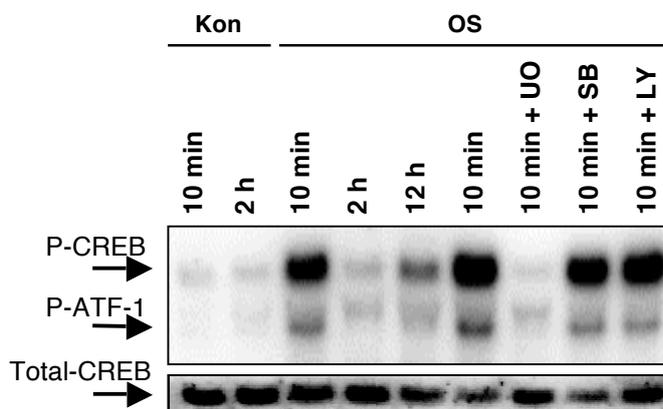


Abbildung 25: CREB Aktivierung durch OSM. OSM aktiviert sowohl CREB als auch ATF-1 nach 10 minütiger Stimulation. UO, aber nicht SB und LY, kann die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren verhindern.

9. Entschlüsselung des für die FGF-7 Sekretion entscheidenden Signaltransduktionsweges

Die Bildung eines inflammatorischen Milieus stellt in der Arteriogenese eine unabdingbare Grundvoraussetzung für das Wachstum von Kollateralen dar. Solch ein Milieu wird vor allem durch Makrophagen kreiert, indem sie ins Gefäß migrieren und inflammatorische Zytokine wie auch Wachstumsfaktoren an ihre Umgebung abgeben. Jene Faktoren binden hierbei an ihre Rezeptoren und aktivieren eine Vielzahl an intrazellulären Signalkaskaden, die unter anderem eine Migration und eine Proliferation der Gefäßzellen zur Folge haben. Unter Punkt 7 wird dargestellt, dass in glatten Muskelzellen besonders inflammatorische Zytokine wie auch Wachstumsfaktoren in der Lage sind, FGF-7 zu stimulieren. Da jene Substanzen allerdings auch andere für die Arteriogenese bedeutsame Proteine in glatten Muskelzellen induzieren, sollte das Verständnis über die Kontrollmechanismen der entsprechenden zellulären Signalkaskaden einen tieferen Einblick in die molekularen Abläufe der Arteriogenese liefern, um gegebenenfalls durch Manipulation der Signalkaskaden gezielt positiven Einfluss auf die Expression arteriogeneserelevanter Proteine und folglich auf das Gefäßwachstum nehmen zu können.

Um aus den diversen unter Punkt 8 durch OSM aktivierten Signalkaskaden die für die FGF-7 Synthese entscheidende zu ermitteln, wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt, die spezifisch einzelne Kinasen hemmen und dementsprechend komplette Signalwege blockieren (siehe Abb.26).

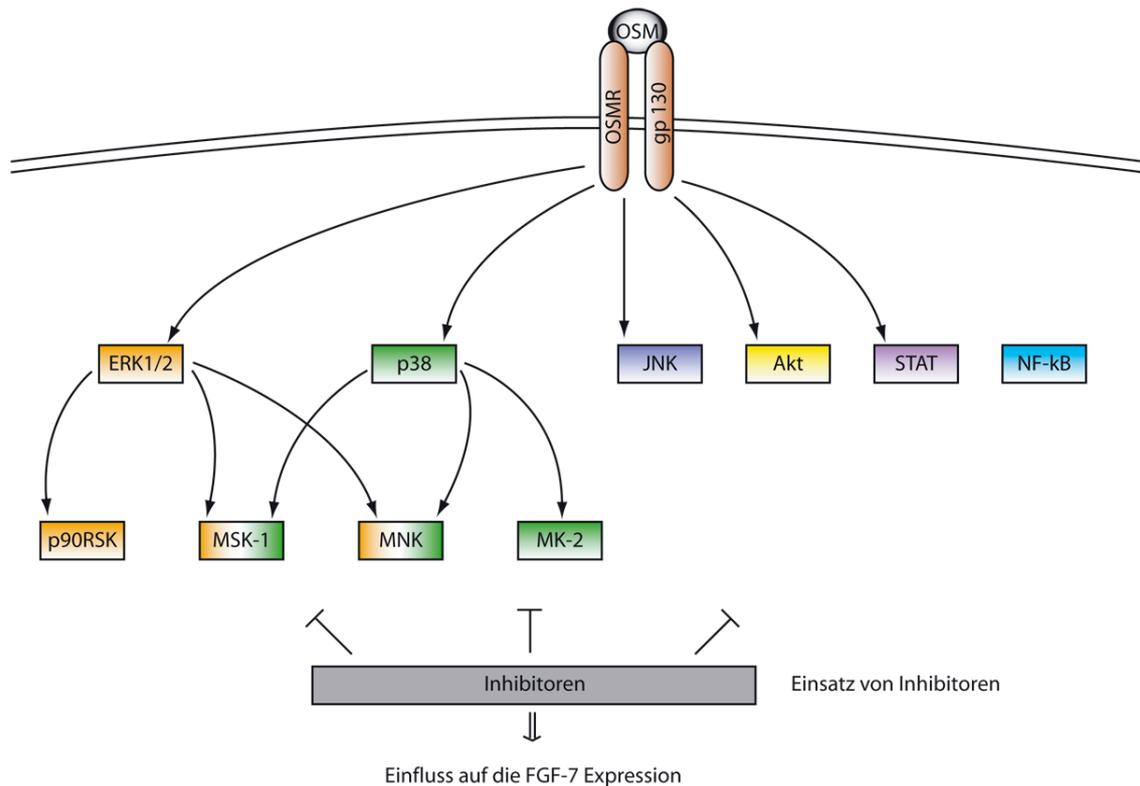


Abbildung 26: Fortführung der Strategie zur Identifizierung des FGF-7 induzierenden Signalweges. Die durch OSM aktivierten Kinasen werden mittels Inhibitoren gehemmt, um daraufhin eine Veränderung in der FGF-7 Sekretion zu ermitteln

Veränderungen der FGF-7 Konzentrationen im Überstand ließen schließlich einen Rückschluss auf die Bedeutung der jeweils untersuchten Signalkaskade in der FGF-7 Expression zu. Eine adäquate Dosierung der unterschiedlichen Inhibitoren wurde durch Vorversuche mit unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Inhibitoren bzw. mittels Literaturangaben ermittelt. Die Kontrollzellen wurden mit der äquivalenten Dosis Dimethylsulfoxide (DMSO), in der die Inhibitoren gelöst sind, behandelt.

9.1. JAK-STAT und Akt-Signaltransduktionsweg

Tyrphostin AG 490 ist ein potenter JAK2/JAK3 Tyrosinkinase Inhibitor, welcher durch die fehlende Phosphorylierung der Rezeptoren eine Translokation der STATs in den Zellkern verhindert. In Vorversuchen wurde eine Konzentration von 10µM für eine ausreichende Inhibition der JAK bestimmt.

Der Pilzmetabolit Wortmannin (WT) wie auch der synthetisch hergestellte Inhibitor LY294002 sind für eine Inhibition der PI3-Kinase, wenn auch mit unterschiedlicher Spezifität, bekannt (Yano, Nakanishi et al. 1993; Guo, Joiakim et al. 2000). Um die PI3-Kinase-Aktivität zu bestimmen, wurde der Phosphorylierungsstatus der Akt/PKB betrachtet.

Da die Akt/PKB eine wichtige Rolle im Prozess des Zellüberlebens einnimmt, musste eine adäquate Konzentration gefunden werden, die bei einer Inhibition für zwei Tage nicht zum Zelltod führt. Diese Konzentration betrug für Wortmannin 1µM und für LY294002 5µM.

Wie in Abb.27 zu sehen ist, bleibt trotz des Einsatzes der PI3-Kinase- wie auch der JAK-Inhibitoren die FGF-7 Sekretion im Vergleich zu den nur mit OSM stimulierten Zellen unverändert. (Ein zusätzlicher Inhibitor des PI3-Signalweges Rapamycin zeigt ebenfalls keine regulatorische Effekte. Daten nicht gezeigt)

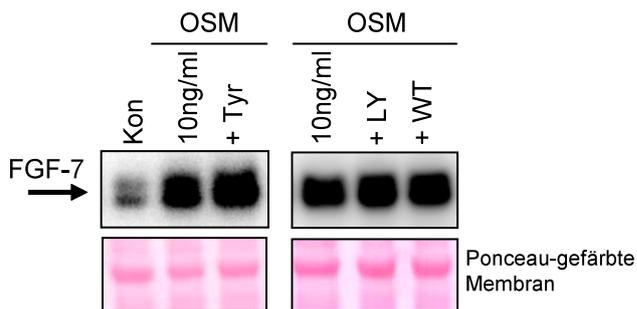


Abbildung 27: Einsatz der Inhibitoren Tyr, LY, WT. Die durch OSM verstärkte FGF-7 Sekretion lässt sich durch die Inhibitoren der Jak/STAT (Tyrphostin) und Akt (LY294003, Wortmannin) Signalkaskade nicht abschwächen.

9.2. JNK/SAPK und NF-κB („Nukleärer Faktor“-κB)

Signaltransduktionsweg

Wie in Abb.22 zu sehen, ist auch OSM ein potenter Induktor der JNK/SAPK. Eine klare Aktivierung des NF-κB Signaltransduktionsweges in vaskulären glatten Muskelzellen durch OSM konnte nicht hinreichend nachgewiesen werden. Dennoch wurde auch dieser Signalweg auf eine Beteiligung hin geprüft. Zur Inhibition wurde zum einen SP600125 als JNK(1,2,3)-Inhibitor in einer Konzentration von 3µM und zum anderen ein IκB Kinase Inhibitor, der die NF-κB Aktivierung verhindert, in einer Konzentration von 50µg/ml den Zellen hinzugegeben. In Abb.28 ist deutlich zu erkennen, dass beide Inhibitoren keinen Einfluss auf die FGF-7 Sekretion nehmen, sodass eine Beteiligung dieser beiden Signalkaskaden an der FGF-7 Induktion ebenfalls ausgeschlossen werden kann. (Vergleichbare Ergebnisse wurden unter IL-1 Stimulation beobachtet; Daten nicht gezeigt).

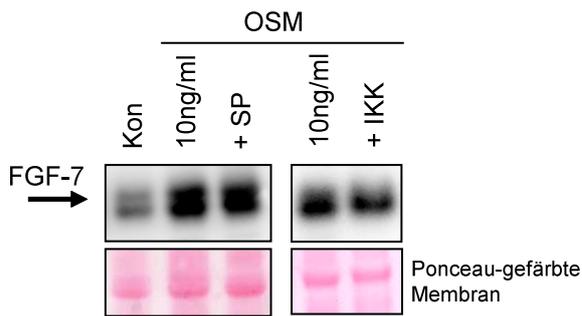


Abbildung 28: Einsatz der Inhibitoren SP, IKK. Die bekannte FGF-7 Induktion durch OSM kann mittels der Inhibitoren der JNK-(SP600125) und NF κ B-(IKK) Signalwege nicht beeinflusst werden.

9.3. ERK1/2 und p38 MAPK-Signaltransduktionsweg

Der Ras-Raf-MEK-ERK1/2 Signaltransduktionsweg wurde als eine der zentralen Signalkaskaden in der lebenden Zelle identifiziert. Aus diesem Grunde wurde auch dessen Einfluss auf die FGF-7 Expression untersucht. Zu diesem Zwecke wurde der in der Fachliteratur vielfach und umfangreich untersuchte ERK Inhibitor UO126 verwendet.

Abbildung 29 zeigt zunächst eine Zunahme der detektierten FGF-7 Bande nach Stimulation mit OSM. Nach Zugabe von UO126 (10 μ M) ist eine Abnahme der Intensität zu beobachten. Demnach kann angenommen werden, dass die ERK-MAPK eine entscheidende Signalkaskade in der Regulation des FGF-7 darstellt. Die Tatsache, dass trotz Inhibition der ERK1/2 die FGF-7 Expression nicht vollständig abgeschaltet werden kann, legt nahe, dass mindestens noch eine weitere Signalkaskade die FGF-7 Expression über bestimmte Schnittstellen in den verschiedenen Signalwegen einleiten kann.

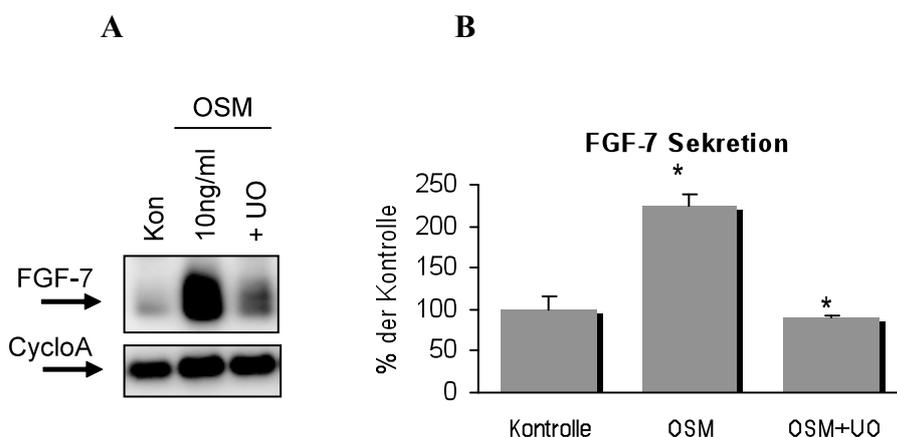


Abbildung 29: Einsatz des Inhibitors UO. A: Der ERK1/2 Inhibitor (UO) senkt die OSM induzierte FGF-7 Sekretion auf das Kontrollniveau. B: Die FGF-7 Induktion durch OSM und dessen Inhibition durch UO sind statistisch signifikant verändert ($p < 0,05$, $n = 4$).

Um eine Beteiligung der p38 MAPK an einer FGF-7 Expression auszuschließen bzw. nachzuweisen, wurden die Inhibitoren der SB Familie (SB 202190, 203580, 239063) eingesetzt. Diese unterscheiden sich einerseits in ihrer unterschiedlichen Fähigkeit die p38 MAPK zu hemmen und andererseits in ihrer Spezifität. Im Western Blot ist eine Abnahme der FGF-7 Konzentration deutlich in allen Proben zu sehen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß (Abb.30). Folglich ist die p38 MAPK neben der ERK MAPK die zweite entscheidende Signalkaskade in der FGF-7 Regulation.

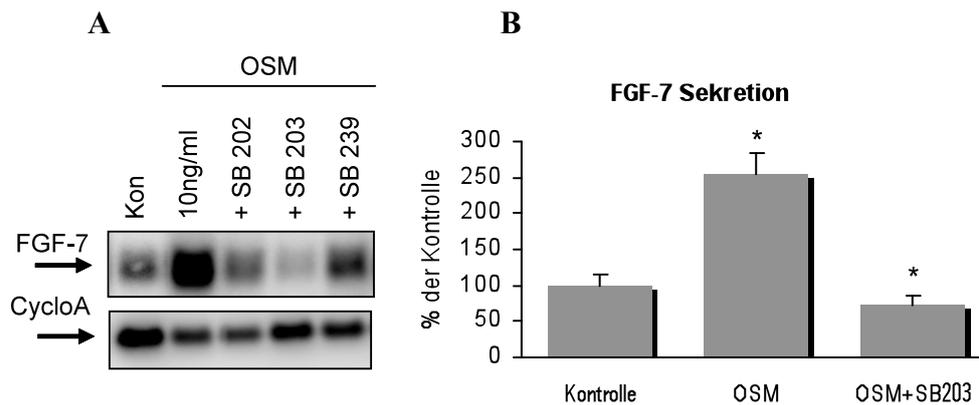


Abbildung 30: Einsatz der SB-Inhibitorengruppe. A: Die durch OSM vermehrte FGF-7 Expression wird durch die p38 Inhibitoren (SB-Gruppe) gesenkt. B: Die gezeigten Veränderungen der FGF-7 Expression durch OSM und SB202 sind statistisch signifikant ($p < 0,05$, $n=6$).

Dennoch konnte trotz einer gewissen Abnahme der FGF-7 Sekretion weder mit UO126 noch mit SB202190 alleine ein Abfallen unter den Kontrollwert erreicht werden. Die Schlussfolgerung aus dieser Beobachtung war, die Inhibitoren der beiden Signalkaskaden ERK und p38 zu kombinieren, um eine etwaige Synergie der Effekte erzielen zu können.

Abbildung 31 veranschaulicht die in etwa gleich starke Abnahme der FGF-7 Sekretion nach Zugabe der einzelnen Inhibitoren und spiegelt in der letzten Reihe den synergistischen Effekt der beiden Inhibitoren wieder. Hieraus kann abgeleitet werden, dass erst die Kombination aus UO126 und SB202190 den FGF-7 Spiegel im Überstand unter den Kontrollwert senken kann.

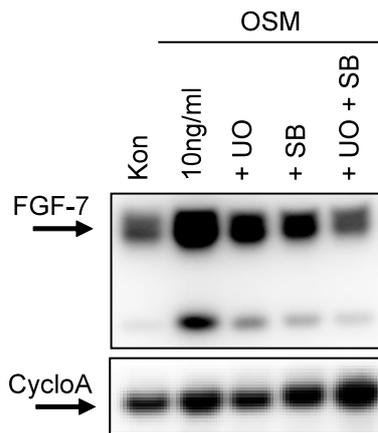


Abbildung 31 Kombiniertes Einsatz von UO und SB. Sowohl UO als auch SB schwächt die OSM induzierte FGF-7 Sekretion ab. Die Kombination aus UO und SB lässt die FGF-7 Konzentration unter die der Kontrolle fallen.

9.4. CREB Signaltransduktionsweg

Diverse Hinweise wie die cAMP-abhängige FGF-7 Induktion in Fibroblasten (Zhou and Finch 1999), die Aktivierung von CREB und ATF-1 durch OSM (Abb.25) sowie die Abnahme der FGF-7 Sekretion durch UO126 und SB202190 (Abb.31) legten die Vermutung nahe, dass CREB und/oder sehr wahrscheinlich ATF-1 in vaskulären glatten Muskelzellen den entscheidenden Transkriptionsfaktor zur FGF-7 Synthese darstellen. Zumal sowohl ERK1/2 (inhibiert durch UO126) über RSK und MSK als auch p38 (inhibiert durch SB202190) über MSK und MK-2 die Fähigkeit aufweisen, CREB zu aktivieren. Eine Phosphorylierung der „downstream“ Kinasen RSK, MSK sowie MK-2 durch OSM zeigt Abb.23.

Verschiedene Schaltstellen im CREB Signaltransduktionsweg ermöglichen es, eine Änderung des CREB Phosphorylierungsstatus zu erzielen. Hierzu zählt die Phosphodiesterase, die das cAMP in der Zelle abbaut, wie auch die Adenylatcyclase, die das cAMP Level in der Zelle erhöht. Forskolin ist solch ein Aktivator der Adenylatcyclase, während 2',3'-Dideoxyadenosin (DDA) einen kompetitiven Inhibitor der Adenylatcyclase darstellt. IBMX (3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin) wiederum erhöht den cAMP Spiegel in der Zelle über eine Hemmung der Phosphodiesterase. Zusätzlich wurde das intrazelluläre cAMP Level durch extern hinzugegebenes membrangängiges zyklisches AMP (5dBcAMP) beeinflusst. Durch den Einsatz des PKA Inhibitors H89 wurde nochmals eine Versuchssituation hergestellt, um den CREB Status auf einer anderen Stufe als durch die oben erwähnte Veränderung des cAMP-Spiegels zu beeinflussen. Abb.32 zeigt, dass sowohl Aktivatoren wie auch Inhibitoren des CREB Signaltransduktionsweges keine Änderung der FGF-7 Konzentration im Überstand hervorrufen. Deshalb kann auch CREB als nötiger Transkriptionsfaktor für die FGF-7 Expression ausgeschlossen werden.

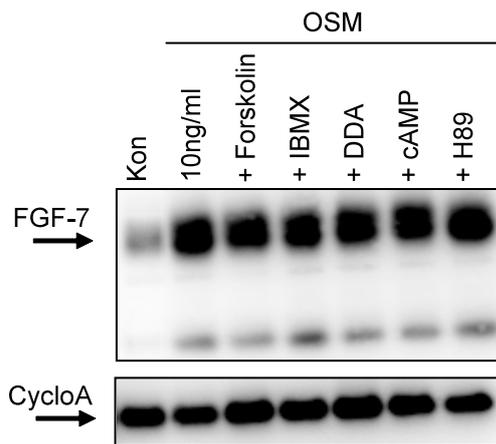


Abbildung 32: Einsatz von CREB Regulatoren. Die Beeinflussung des CREB Signalweges durch verschiedene Substanzen (Forskolin, IBMX, DDA, cAMP, H89) führt zu keiner Veränderung der FGF-7 Sekretion.

9.5. MAPK-aktivierte Proteinkinasen (MK)

Der Ausschluss einer Beteiligung der JNK/SAPK, Akt, STAT, NF- κ B und CREB Signalkaskaden und im Gegenzug der Einfluss der MAPK ERK und p38 an der FGF-7 Expression, führten dazu, den Fokus auf weiter „downstream“ liegende Kinasen der p38 und ERK Signalkaskaden zu legen. Insbesondere die Suche nach den Schnittstellen der beiden Signalkaskaden wurde als sinnvoll erachtet, da die FGF-7 Sekretion von beiden in etwa gleich stark beeinflusst wurde. Dessen ungeachtet wurden aber auch Kinasen wie die p90RSK betrachtet, die spezifisch nur von der MAPK ERK phosphoryliert werden. Zur Hemmung dieser Kinase kamen die p90RSK Inhibitoren SL0101 und BI-D 1870 zum Einsatz. In Abb.33 bleibt eine Veränderung der FGF-7 Sekretion in den OSM-stimulierten Zellen aus, sodass die RSK als FGF-7 Regulatorkinase ausgeschlossen werden konnte. Kinasen, die sowohl von p38 als auch von ERK1/2 aktiviert werden, stellen die Kinasen MSK und MNK dar. Der Inhibitor H89 wird zwar in der Literatur hauptsächlich zur PKA Inhibition verwendet, kann aber auch die MSK hemmen und diese sogar mit einer höheren Affinität als die PKA (Lochner and Moolman 2006). Die FGF-7 Sekretion konnte jedoch durch H89 nicht beeinflusst werden. Die MK MNK wird aufgrund ihrer Bedeutung für die FGF-7 Induktion unter 9.6 getrennt behandelt.

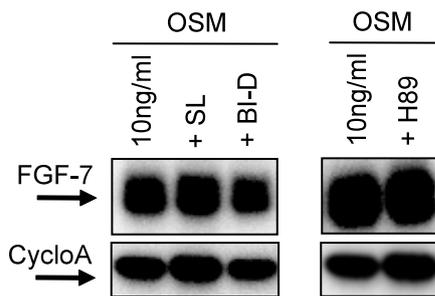


Abbildung 33: Einsatz der Inhibitoren BI-D, SL, H89. Eine Inhibition der MK RSK (BI-D, SL) sowie MSK (H89) führt zu keiner FGF-7 Expressionsveränderung.

9.6. MAPK-interacting Kinase 1 und 2 (MNK1/2)

Die „MAPK-interacting kinase 1 und 2“ (MNK1/2) stellt die andere bereits bekannte Schnittstelle der beiden Singalkaskaden p38 und ERK1/2 dar und könnte, nachdem eine Beteiligung der Kinase MSK ausgeschlossen wurde, somit die entscheidende „downstream“ Kinase repräsentieren. Der Inhibitor CGP57380 ermöglicht es MNK1 wie auch MNK2 zu inhibieren und dadurch deren Einfluss auf die FGF-7 Biosynthese zu testen. Zum Vergleich des Inhibitionsgrades wurden neben CGP57380 die Inhibitoren UO126 und SB202190 eingesetzt, von denen mittlerweile der Grad der Inhibition bekannt ist und dementsprechend ein jeweiliger additiver Effekt des CGP57380 besser zu beurteilen ist.

In Abbildung 34 ist zunächst die OSM induzierte FGF-7 Sekretion zu sehen. Durch die Zugabe von UO126 und SB202190 ist eine in etwa gleich starke Abnahme auf das Kontrollniveau zu beobachten. Der Einsatz von CGP57380 hingegen führt nicht nur zu einer Abnahme der FGF-7 Sekretion, sondern leitet vielmehr einen Abfall unter das Kontrollniveau ein. Damit kann angenommen werden, dass MNK die weiter „downstream“ gesuchte Schnittstelle der beiden MAPK ERK1/2 und p38 verkörpert. Die gleichen Effekte konnten unter FGF-2 Stimulation nachgewiesen werden.

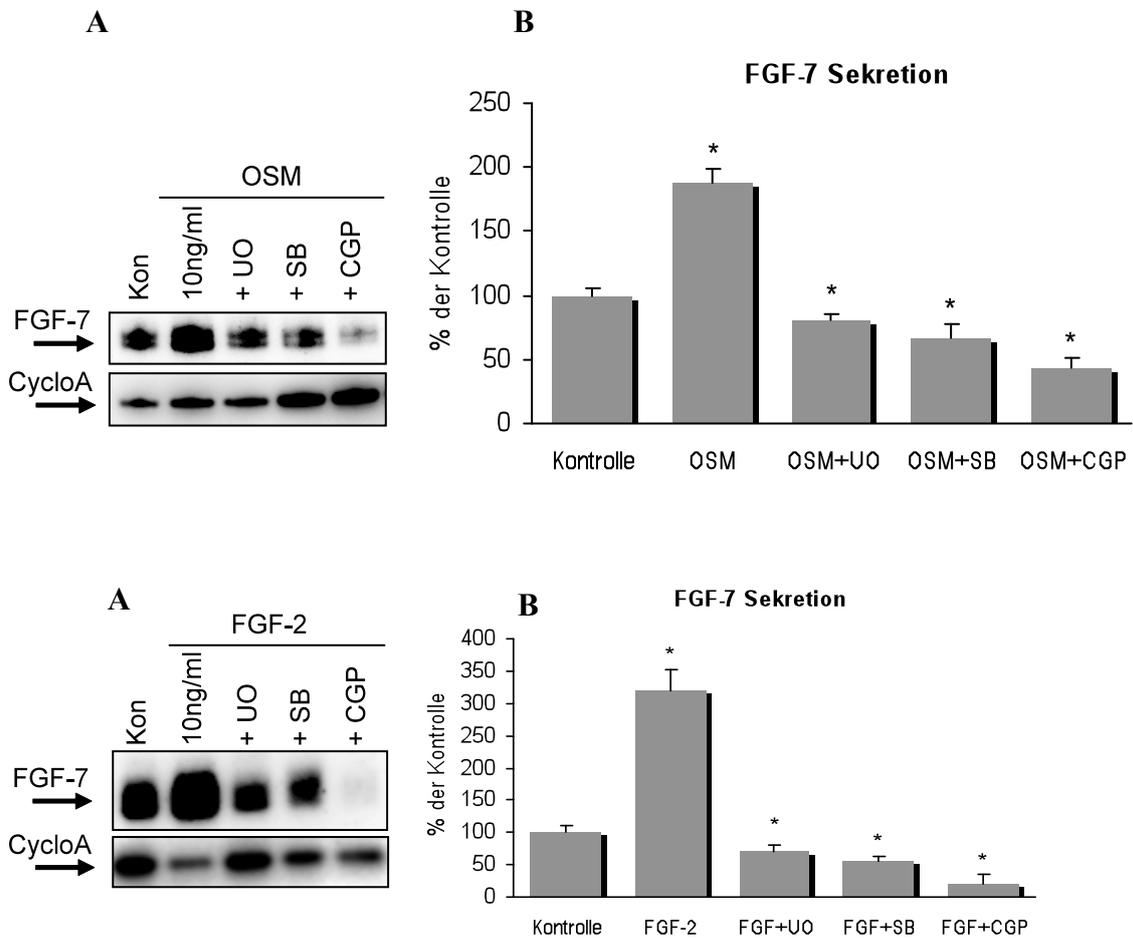


Abbildung 34: Einsatz des Inhibitors CGP. A: UO sowie SB gleichen die OSM (oben) als auch die FGF-2 (unten) stimulierte FGF-7 Sekretion dem Basalniveau an. Der MNK Inhibitor (CGP) hingegen verringert die Sekretion unter das Kontrollniveau. B: Die verstärkte Expression von FGF-7 durch OSM sowie FGF-2 sowie deren Inhibition durch UO, SB und CGP (oben und unten) weisen eine statistische Signifikanz auf ($p < 0,05$, $n=3$).

Da sowohl die Kombination aus UO126 und SB202190 wie auch CGP57380 zu einem Abfall der FGF-7 Sekretion unter das Basalniveau geführt hat, stellte sich die Frage, ob die Stärke der Inhibition vergleichbar ist. Ein entsprechender Abfall würde demzufolge auch MNK als entscheidende Schnittstelle der FGF-7 Expression nochmals bestätigen. Diese Bestätigung liefert der Western Blot (Abb.35), mit dem ein vergleichbarer Abfall gezeigt werden konnte.

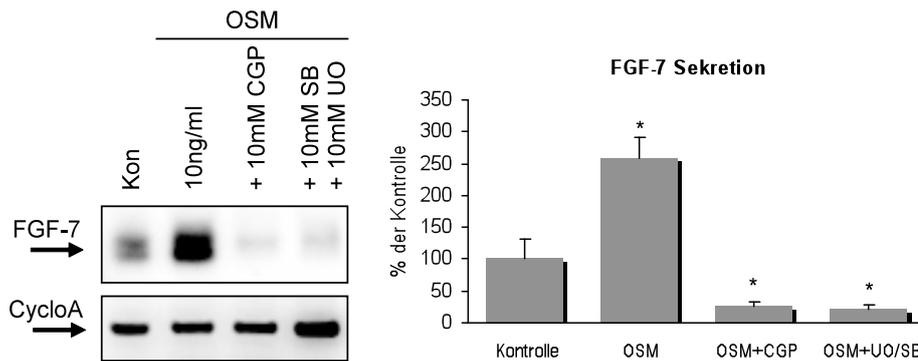


Abbildung 35: CGP vs. UO/SB. A: Die Inhibition der FGF-7 Expression durch CGP ist mit der durch UO und SB zu vergleichen. B: Die gezeigten Veränderungen der FGF-7 Expression weisen eine statistische Signifikanz auf ($p < 0,05$, $n=4$).

9.7. IL-13, ein physiologischer Inhibitor der OSM-induzierten FGF-7 Sekretion

Wie in Abbildung 16 zu sehen war, kann IL-13 allein die FGF-7 Sekretion herunterregulieren. Kann aber eine vorherige Gabe von IL-13 die FGF-7 Induktion durch OSM Stimulation sogar antagonisieren bzw. verhindern? Abbildung 36 weist auf, dass IL-13 die FGF-7 Sekretion in einer ähnlich potenten Art und Weise hemmt wie die Inhibitoren CGP57380 bzw. UO126 mit SB203580 zusammen.

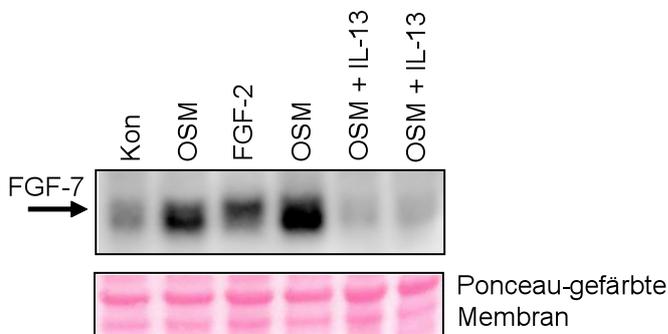


Abbildung 36: Einsatz von IL-13 als Inhibitor. Eine Präinkubation der glatten Muskelzellen mit IL-13 verhindert die OSM induzierte FGF-7 Expression.

10. Zelluläre Lokalisation des FGF-7

In der Fachliteratur wird FGF-7 als ein rein sezerniertes Protein beschrieben. Es wird im Zytoplasma mesenchymaler Zellen gebildet, mittels ihres sekretorischen Signalpeptides durch das endoplasmatische Retikulum geschleust und schließlich ins extrazelluläre Milieu abgegeben. Dort wirkt es ausschließlich parakrin auf benachbarte Zellen, die den FGF-

Rezeptor2/IIIb exprimieren. Diesen Rezeptor wiederum besitzen ausschließlich Zellen epithelialen Ursprunges, die ihrerseits aber kein FGF-7 produzieren.

Die Existenz des FGF-7 als sezerniertes Protein konnte mit dem Nachweis desselben im Überstand glatter Muskelzellen bewiesen werden. Dennoch wurde in bestimmten Versuchsreihen, in denen mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) experimentiert wurde, im Western Blot durch den Tod vieler Zellen eine neue, bis dahin nicht detektierte Bande registriert. Sie wurde als Freisetzen bestimmter Proteine durch den Verlust der Membranintegrität in den Überstand interpretiert. Um diese Diskrepanz aufzuklären, wurden verschiedene Techniken angewandt, die die Herkunft der neu entdeckten Bande aufklären sollten.

10.1. Nukleärer Nachweis von FGF-7

Für den nukleären Nachweis wurde der Fraktionierungskit von Pierce eingesetzt, der die Zellysate in eine zytosolische und in eine nukleäre Fraktion trennt. Die Zellen wurden vorher mit OSM oder IL-13 stimuliert bzw. unbehandelt gelassen, um anschließend FGF-7 im Western Blot nachzuweisen. Zusätzlich wurde die glykosylierte, die unglykosylierte FGF-7 Form und Palifermin aufgetragen. Die Abb. 37 zeigt in der zytosolischen Fraktion der Kontrolle und der IL-13-stimulierten Zellen eine auf Höhe des rekombinanten FGF-7 densitometrisch schwache Bande, wohingegen in den OSM stimulierten Zellen eine deutliche Bande zu erkennen ist. Genau auf der Höhe dieser Bande ist aber auch in der nukleären Fraktion eine Bande zu erfassen. Auf der anderen Seite ist in beiden Fraktionen die glykosylierte Form, die im Überstand nachgewiesen worden ist, kaum zu detektieren. Außerdem scheint es, dass das Vorhandensein von FGF-7 im Zellkern einer ähnlichen Regulation die der FGF-7 Sekretion unterliegt, da ein vermehrtes Vorkommen des FGF-7 im Zellkern nach OSM bzw. eine Abnahme nach IL-13 Stimulation zu beobachten ist.

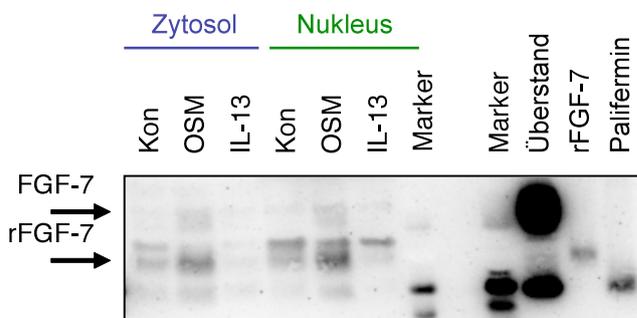


Abbildung 37: Fraktionierung nach Stimulation mit OSM und IL-13. Die Stimulation glatter Muskelzellen mit OSM erhöht die FGF-7 Expression (glykosyliert wie auch nicht glykosyliert) sowohl im Zytosol als auch im Zellkern, während sie durch IL-13 gehemmt wird. Die vorherrschende FGF-7 Bande in den gezeigten Fraktionen stellt die nicht glykosylierte Form (rFGF-7) dar.

Da für FGF-7 bisher keine nukleäre Lokalisations-Sequenz auffindig gemacht werden konnte, sollte der Befund durch eine weitere Methode bestätigt werden.

Aus diesem Grunde wurde mittels Immunofluoreszenz versucht, die nukleäre Lokalisation des FGF-7 zu bestätigen. In Abb. 38 emittiert der an das FGF-7 gebundene Antikörper Licht im grünen Wellenlängenbereich. Diese Emission kann mit DAPI (blau) komplett überlagert werden und untermauert hiermit die im Western Blot gezeigte nukleäre FGF-7 Lokalisation.

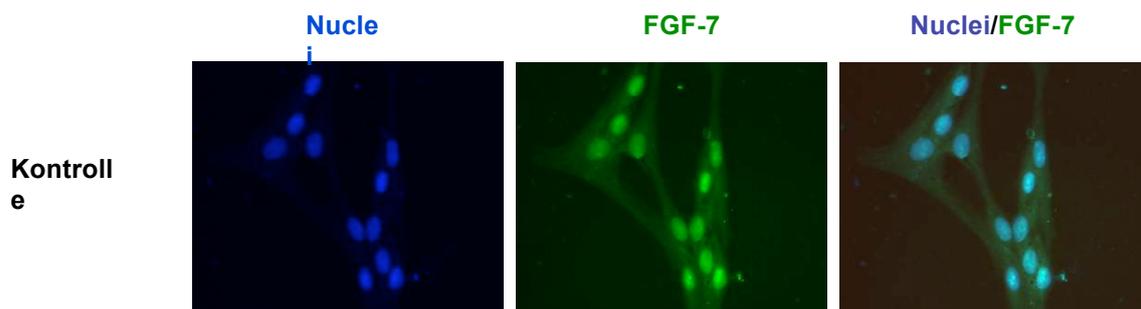


Abbildung 38: Nachweis FGF-7 mittels Immunofluoreszenz. Der Antikörper gegen FGF-7 zeigt eine homogene Verteilung von FGF-7 im Zytosol mit einer Akzentuierung im Zellkern (grün).

10.2. Nachweis einer intrazellulären FGF-7 Regulation mit Hilfe der Immunofluoreszenz

Nachdem eine Regulation der FGF-7 Sekretion im Überstand nachgewiesen werden konnte (Abb. 16) sollte mittels Immunofluoreszenz versucht werden, die in Abb. 37 im Western Blot gezeigte mögliche intrazelluläre Regulation zu bestätigen.

In Abb.39 kann ein schwaches FGF-7 Signal in den Kontrollzellen erkannt werden, das annähernd gleichmäßig verteilt ist. Die OSM-stimulierten Zellen zeigen eine vergleichsweise starke Signalintensität, während sich das Signal der IL-13-stimulierten Zellen schwächer im Verhältnis zu den OSM-stimulierten Zellen, allerdings gering stärker als in den Kontrollzellen, darstellt. Die Bilder lassen annehmen, dass FGF-7 durch die oben genannten Zytokine nicht nur einer sezernierten, sondern auch einer intrazellulären Regulation unterworfen ist.

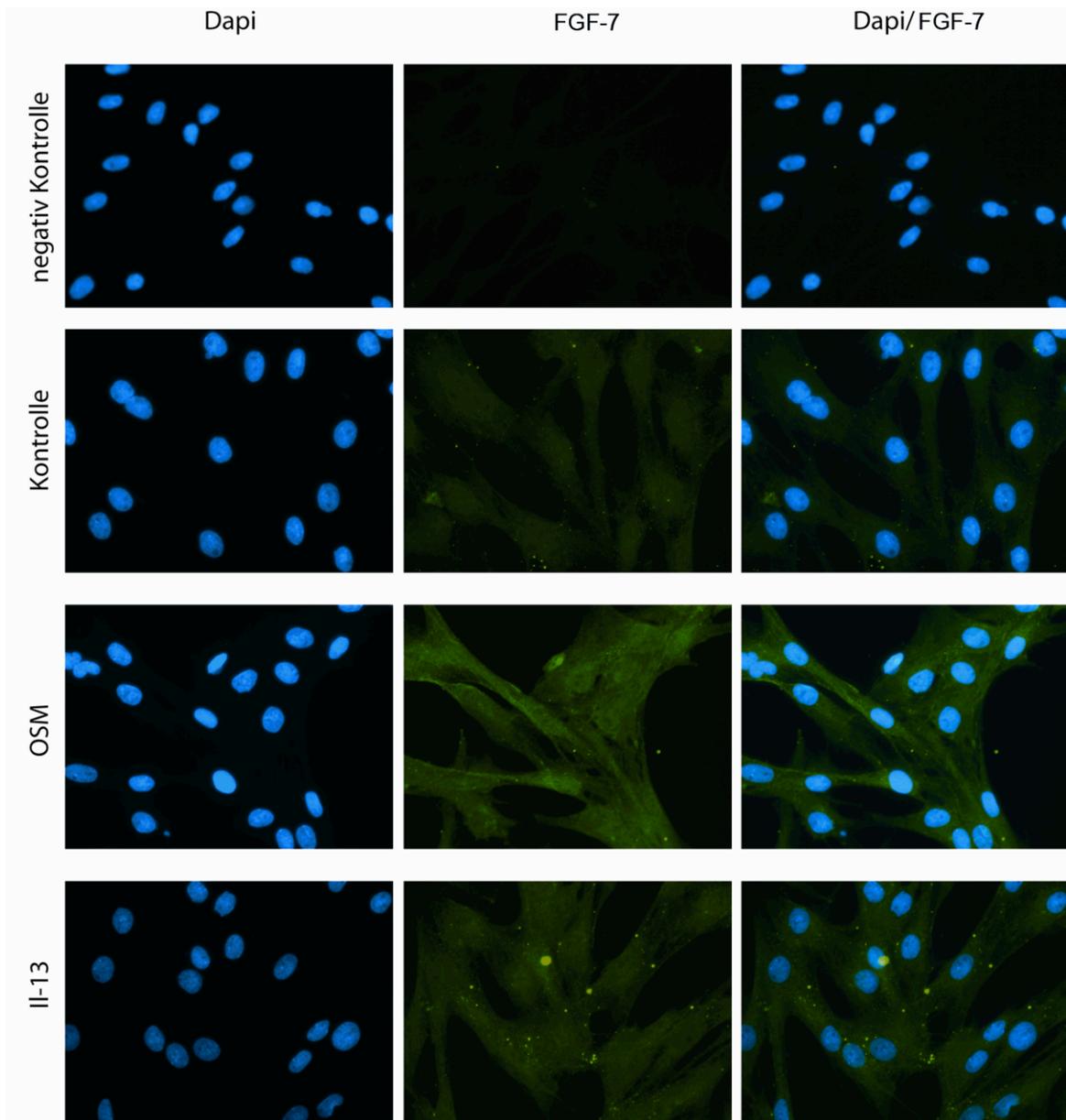


Abbildung 39: Nachweis einer intrazellulären FGF-7 Regulation mittels Immunofluoreszenz. Die OSM stimulierten Zellen zeigen im Vergleich zu den Kontrollzellen ein vermehrtes Vorkommen von FGF-7 in der Zelle (grün). Die IL-13 stimulierten Zellen besitzen hingegen weniger FGF-7 als die OSM behandelten aber mehr als die Kontrollzellen.

10.3. Nukleäre Translokation nach externer rFGF-7 Zugabe

Die Feststellung, dass FGF-7 im Nukleus glatter Muskelzellen nachzuweisen ist, zog die Überlegung nach sich, ob FGF-7 im Zytosol gebildet wird und daraufhin in den Zellkern wandert oder ob von den Zellen sezerniertes FGF-7 im Sinne eines autokrinen Mechanismus vorerst ins Zytosol aufgenommen wird, um dann in den Zellkern zu translozieren. Für diese Versuchsreihe wurden die glatten Muskelzellen zunächst 3 Tage serumfrei gehalten und anschließend rekombinantes FGF-7 (rFGF-7) in einer Konzentration von 10µg/ml zum Medium hinzugegeben. In einer Versuchsreihe wurde den

Zellen rFGF-7 für 10 Sekunden ins Medium gegeben, um dann das Medium zu verwerfen und die Zellen zu ernten. Der Gedanke, der mit dieser Versuchsreihe verfolgt wurde, bestand darin, dass durch das vor der Zellernte mangelhafte Auswaschen des Mediums, eventuell FGF-7 Reste in den Fraktionen zurückgeblieben sein könnten, die eventuell Signale erzeugen. Demnach sollten 10 Sekunden nicht für eine FGF-7 Aufnahme in den Zellkern ausreichen. In der letzten Versuchsreihe wurde rFGF-7 dem Medium für 10 Minuten zugesetzt. Die geernteten Zellen wurden daraufhin in ihre Kompartimente getrennt. Eine Kontrolle der Trennungsqualität wurde mit den spezifischen Markern der einzelnen Kompartimente gewährleistet.

Abb.40 veranschaulicht den Translokationsprozess, indem in der Kontrolle kein rFGF-7 und nach 10 Sekunden rFGF-7 Zugabe kaum rFGF-7 in der zytosolischen sowie in der nukleären Fraktion nachzuweisen ist. Nach 10 Minuten rFGF-7 Inkubation wurde FGF-7 anfangs in das Zytosol aufgenommen, um daraufhin weiter in den Zellkern zu translozieren. Diese Beobachtung belegt einen autokrinen Translokationsprozess des FGF-7 in den Zellkern.

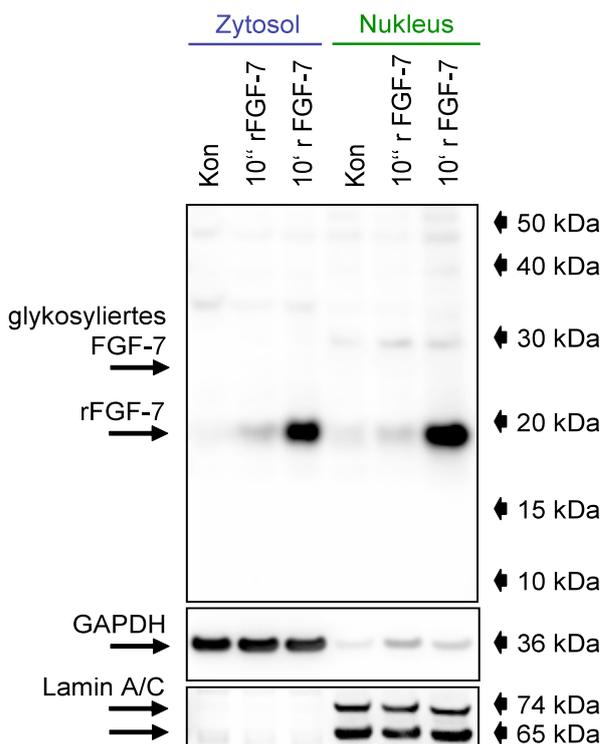


Abbildung 40: Nukleäre Translokation von rFGF-7. Während nach 10 Sekunden kaum hinzugegebenes rFGF-7 in die Zelle aufgenommen wurde, ist nach 10 Minuten rFGF-7 sowohl im Zytoplasma wie auch im Zellkern vorhanden. GAPDH und Lamin A/C zeigen die Reinheit der Kompartimentauftrennung.

Weiterhin sollte der gleiche Versuchsaufbau jedoch mit Zugabe von rTNF α (10 μ g/ml) weitere unspezifische Versuchsergebnisse ausschließen, die etwa in Abb.40 beobachtet

worden sein könnten. Abb.41 zeigt, dass rTNF α sogar nach 10 Minuten nicht in die Zelle aufgenommen wurde, während die in der Zelle selbst produzierten TNF α -Vorstufen in der zytosolischen aber nicht in der nukleären Fraktion nachzuweisen sind.

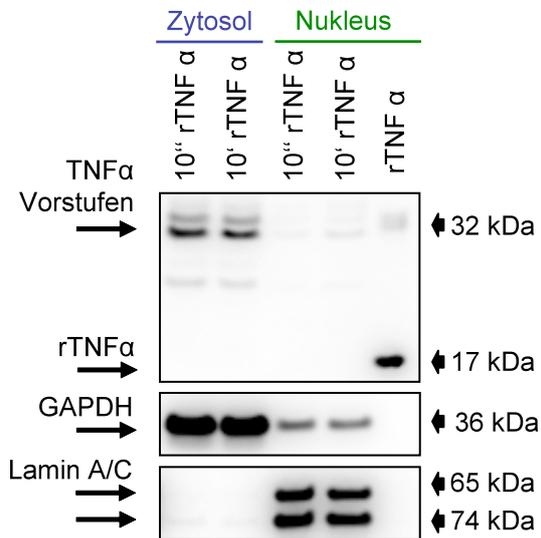


Abbildung 41: Fraktionierung von rTNF α behandelten glatten Muskelzellen. Sowohl nach 10 Sekunden als auch nach 10 Minuten wird rTNF α nicht in den Zellkompartimenten nachgewiesen. Nur die von den Zellen selbst gebildeten TNF α Vorstufen sind im Zytosol vorhanden. GAPDH und Lamin A/C zeigen die Reinheit der Kompartimentauftrennung.

Ähnlich der intrazellulären FGF-7 Regulation sollte die nukleäre Translokation zusätzlich mit Hilfe der Immunfluoreszenz bestätigt werden. Die Färbung (siehe Abb.42) stellt auch diesmal den Zellkern blau, die Aktinfilamente rot (Phalloidinfärbung) und FGF-7 grün dar. Es kann in der Immunfluoreszenz eine moderate Zunahme der Signalintensität mit Akzentuierung des Zellkerns nach 10 minütiger FGF-7 Zugabe in den glatten Muskelzellen gesehen werden, sodass auf diese Weise die obige Beobachtung nochmals bestätigt werden konnte.

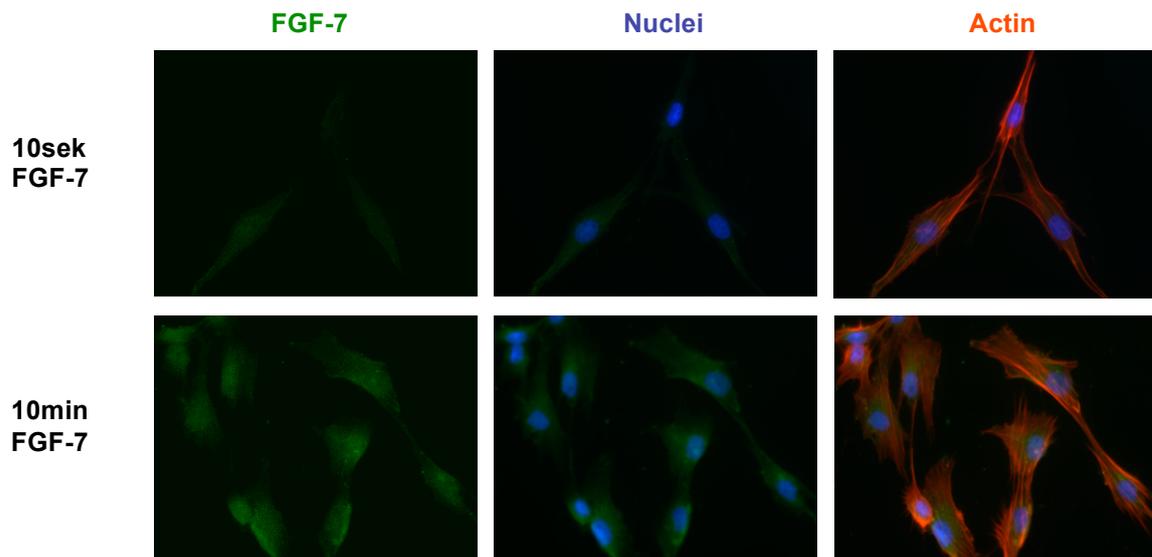


Abbildung 42: Nachweis der nukleären Translokation von FGF-7 mittels Immunofluoreszenz. Eine 10minütige Gabe von rFGF-7 führt zu einer Akzentuierung von rFGF-7 im Zellkern im Vergleich zu einer 10sekundigen Gabe.

10.4. Inhibition der FGF-7 Internalisierung

Internalisierungsprozesse stellen Aufnahmemechanismen dar, die Rezeptoren und deren Liganden von der Plasmamembran ins Zellinnere schleusen. Inzwischen sind eine Reihe von Mechanismen nachgewiesen, bei denen zwischen einer Clathrin-abhängigen und einer Clathrin-unabhängigen Endozytose, zu welcher die Caveolen-abhängige Endozytose gezählt wird, unterschieden wird. In der Clathrin-vermittelten Endozytose geht das Protein mit einer Reihe anderer Adaptermolekülen an der inneren Plasmamembran Verbindungen ein, die die Plasmamembran invaginieren und letztendlich die Vesikelbildung ermöglichen (Mousavi, Malerod et al. 2004). Caveolen sind dagegen cholesterin- und sphingolipid-haltige Invaginationen der Plasmamembran. Aber auch hier werden zur Vesikelbildung verschiedene Hilfsproteine benötigt, die den Prozess der Internalisierung modifizieren und so die Vesikelaufnahme in die Zelle ermöglichen (Nabi and Le 2003).

Ob der Internalisierungsprozess von einem der oben genannten Mechanismen abhängig ist, wurde durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren geprüft. Hierfür wurden die Zellen vor der 10 minütigen rFGF-7 Gabe für eine halbe Stunde mit dem Clathrin-Inhibitor Monodansylcadaverine (CV) in einer Konzentration von 0,3mM und dem Caveolen-Inhibitor Methyl-b-Cyclodextrin (CD) in einer Konzentration von 10mM präinkubiert. Es wurde der gleiche Versuchsaufbau verwendet, der in Abb.40 zu sehen ist. In Abbildung 43 schwächt der Einsatz des Clathrin-Inhibitors die Aufnahme des rFGF-7 in die Zelle stark

ab. Im Gegensatz dazu konnte der Caveolen-Inhibitor die FGF-7 Internalisierung nicht verhindern.

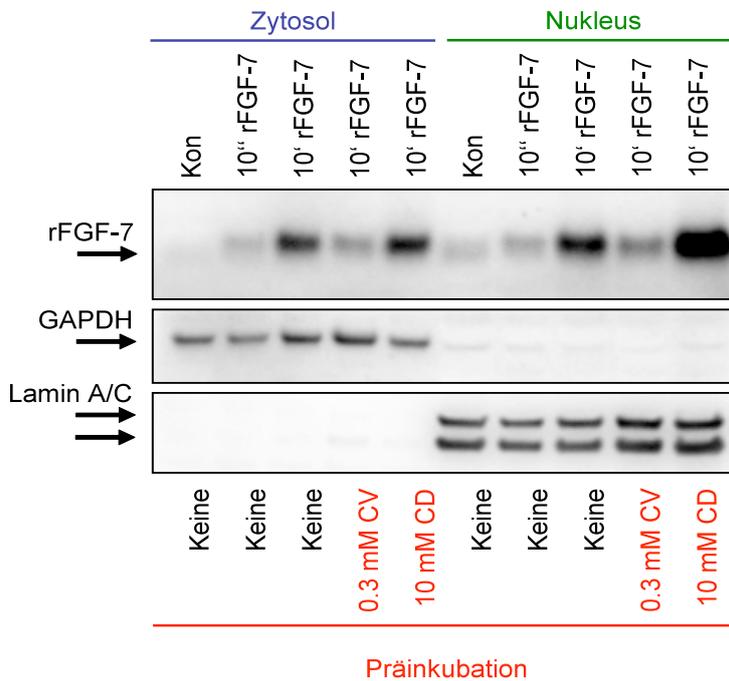


Abbildung 43: Inhibition der Internalisierung FGF-7. Die Internalisierung rFGF-7 in die Zelle nach 10 Minuten wird durch den Clathrin-Inhibitor (CV) aber nicht durch den Caveolen-Inhibitor (CD) gehemmt und somit auch die Translokalisierung in den Zellkern. GAPDH und Lamin A/C zeigen die Reinheit der Kompartimentauftrennung.

10.5. Mögliche Auswirkung der Glykosylierungen auf die Lokalisation des FGF-7

Die Glykosylierung von spezifischen Asparaginresten ist die wohl bedeutendste posttranslationelle Modifizierung von extrazellulären Proteinen in Eukaryonten, während sie in Prokaryonten vollständig fehlt.

Sezernierte Proteine wie FGF-7 werden hierbei an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums zunächst synthetisiert, über dessen Membran transloziert und dabei glykosyliert. Von dort gelangen sie auf dem so genannten sekretorischen Biosyntheseweg in das entsprechende zelluläre Zielkompartiment (ER, Golgi, Vakuole, Plasmamembran) oder sie werden nach außen in die extrazelluläre Matrix bzw. in das umgebende Medium abgegeben. Den Glykosylierungen werden verschiedenste Funktionen zugesprochen wie die Beteiligung an der Faltung von Proteinen, der Schutz vor Degradation durch Proteasen, an Zell-Zellerkennungsprozessen sowie an der Sekretion von Proteinen in den extrazellulären Raum (Alberts et al 2002).

Die in Abbildung 37 durchgeführte Fraktionierung der Zellen nach Stimulation mit OSM und IL-13 weist eine auffällige Verteilung des nicht-glykosylierten zum glykosylierten FGF-7 auf. Es kann zum einen die bereits beschriebene Regulation des FGF-7 (siehe Abb.16) durch die jeweiligen Zytokine sowohl für glykosyliertes als auch für nicht glykosyliertes FGF-7 in beiden Fraktion erkannt werden und zum anderen ist in der nukleären Fraktion mit Ausnahme der OSM-stimulierten Zellen kein glykosyliertes FGF-7 zu erfassen. Diese Restmengen an glykosyliertem FGF-7 in OSM-stimulierten Zellen lassen sich durch technische Limitationen erklären, da eine 100%ige Trennung der Kompartimente durch diese Methode nicht zu realisieren ist und womöglich glykosyliertes FGF-7 aus der zytosolischen in die nukleäre Fraktion gelangt ist. Nichtsdestotrotz muss diese Beobachtung durch einen neuen Versuchsansatz bestätigt werden.

Falls die Annahme, dass kein glykosyliertes FGF-7 im Zellkern vorhanden ist, stimmt, dürfte im Umkehrschluss die Zugabe von glykosyliertem FGF-7 zwar zu einer Internalisierung in die Zelle führen, eine Ansammlung der glykosylierten Form im Zellkern hingegen dürfte nicht stattfinden. Da die Internalisierung und die darauf folgende Deglykosylierung einen dynamischen Prozess darstellen, wurde versucht, mit der Gabe von glykosyliertem FGF-7 zu einem frühen (90 sek) und einem späteren (240 sek) Zeitpunkt die einzelnen Stadien festzuhalten.

Abbildung 44 zeigt nach 90 sek sowohl in der zytosolischen als auch in der nukleären Fraktion eine Bande auf ca. 20kDa nach Zugabe von glykosyliertem FGF-7, während auf der Höhe von 26/28kDa in der zytosolischen nicht aber in der nukleären Fraktion Banden zu sehen sind. Diese Banden verschwinden nach 240 sek vollständig aus der zytosolischen Fraktion und die 20kDa Bande tritt in beiden Fraktionen verstärkt hervor. Hieraus kann geschlossen werden, dass nach ca. 90 sek ein gewisser Anteil des glykosylierten FGF-7 aus dem Überstand in die Zelle aufgenommen wird. Im Zytoplasma wird daraufhin begonnen, das glykosylierte FGF-7 zu deglykosylieren. Dieser Prozess ist spätestens nach 240 sek abgeschlossen. Das nun deglykosylierte FGF-7 kann in den Zellkern translozieren und dort seine Funktionen ausüben.

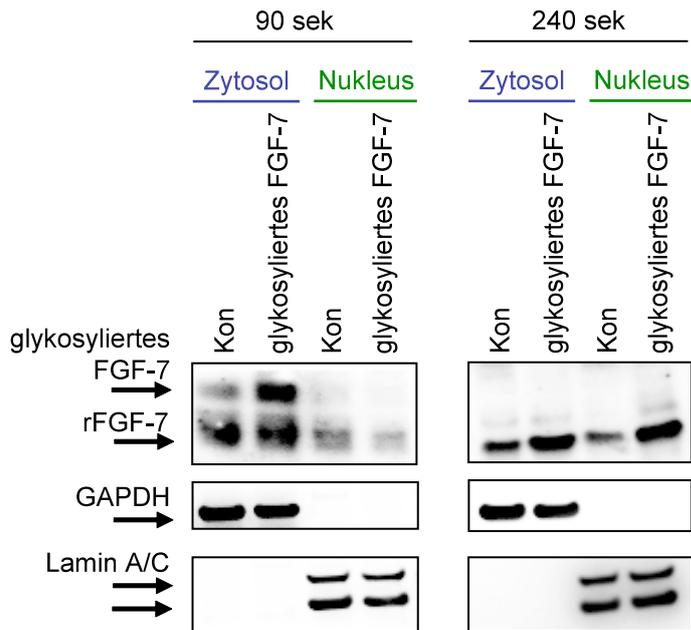


Abbildung 44: Zugabe von glykosyliertem FGF-7. 90 Sekunden nach der Gabe von glykosyliertem FGF-7, ist das glykosylierte FGF-7 im Zytosol aber nicht im Zellkern vorhanden. Nach 240 Sekunden ist das hinzugegebene glykosylierte FGF-7 vollständig deglykosyliert und ist nun auch im Zellkern vorhanden.

11. Effekte des FGF-7 auf das vaskuläre System

Nachdem grundlegende Aspekte wie Aufbau, Quelle, Lokalisation sowie Internalisierung des FGF-7 durch diverse Versuchsreihen herausgearbeitet wurden, sollten im nächsten Schritt mögliche Wirkmechanismen des FGF-7 ermittelt werden, die insbesondere Einfluss auf Mechanismen der Arteriogenese nehmen.

11.1. Nachweis des FGF-7 Rezeptors FGFR2/IIIb

Vor der Ausrichtung der Versuche, die mögliche Wirkungen des FGF-7 auf Zellen nachweisen sollten, wurde versucht, den spezifischen Rezeptor FGFR2/IIIb ausfindig zu machen, mit dessen Nachweis indirekt eine Wirkung nachgewiesen wäre. Der Nachweis des FGFR2/IIIb sowohl an glatten Muskelzellen als auch an Endothelzellen stellte sich allerdings als sehr kompliziert heraus und gelang mittels der erworbenen Antikörper nicht.

11.2. 2-D gelelektrophoretische Analyse der FGF-7 Wirkung auf das sekretierte Proteom glatter Muskelzellen und Endothelzellen

Da FGF-7 im Körper bevorzugt parakrin wirkt, wurden neben den glatten Muskelzellen auch die benachbarten Endothelzellen mit FGF-7 (10µg/ml) für zwei Tage stimuliert, deren Überstand entnommen und 2-D gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Überstände der FGF-7-stimulierten Zellen wiesen hierbei zu den Kontrollzellen keine klaren Unterschiede in

der Stärke oder in der Verteilung einzelner Proteinpunkte auf, sodass auf eine weitergehende Analyse bestimmter Proteine verzichtet worden ist (siehe Abb.45).

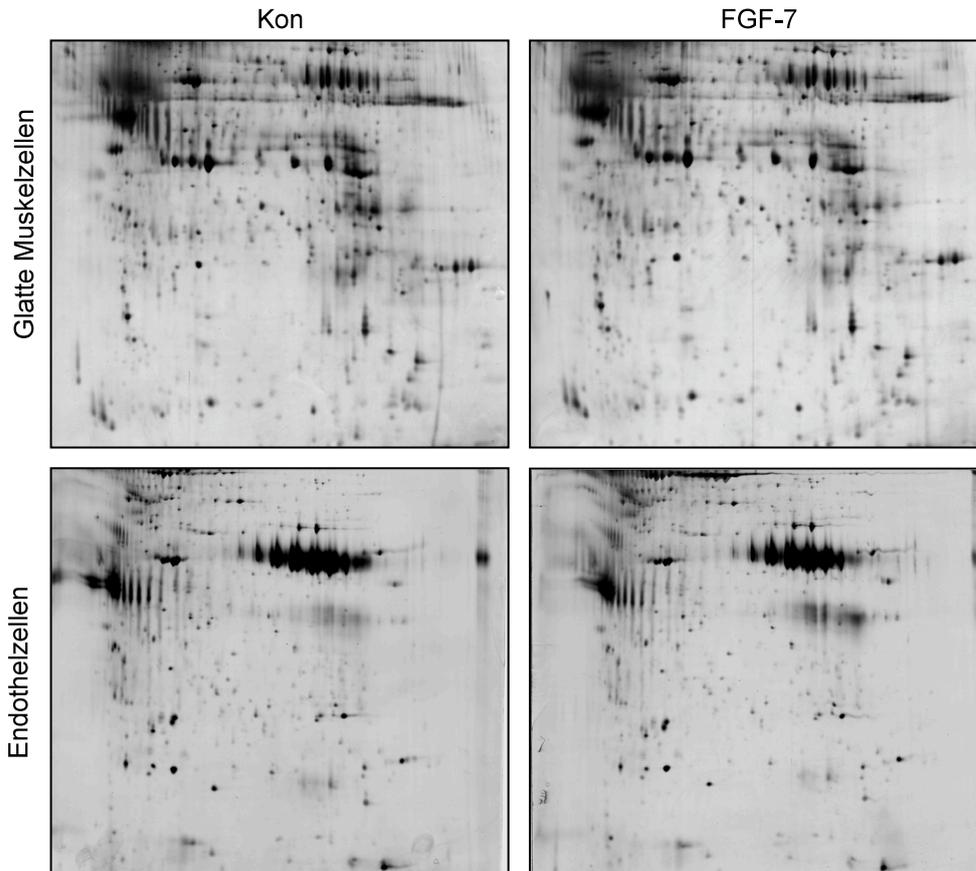


Abbildung 45: 2-D gelelektrophoretische Analyse FGF-7 stimulierter Zellen. Sowohl Endothelzellen als auch glatte Muskelzellen zeigen keine Veränderungen im sezernierten Proteom.

11.3. Effekte des FGF-7 auf arteriogenetische Prozesse

Im Laufe der Arteriogenese werden verschiedene Proteine je nach Zeitpunkt differentiell reguliert. Dazu zählen z.B. die Metalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren (TIMP) wie auch der Urokinase-Plaminogenaktivator (u-PA), die den Umbau der Gefäße ermöglichen. Eine Regulation dieser Proteine in Endothelzellen konnte durch FGF-7 nicht beobachtet werden. Andere Faktoren wie iNOS, eNOS oder IL-1 α/β wurden in Endothelzellen durch FGF-7 ebenfalls nicht beeinflusst. Ferner konnten keine migratorischen Veränderungen in Endothel- und glatten Muskelzellen nach FGF-7 Stimulation beobachtet werden.

Ob FGF-7 eventuell Einfluss auf das Zellüberleben nimmt, konnte durch verschiedene Versuchsreihen wie Stimulation der Endothel- und glatten Muskelzellen mit den apoptoseinduzierenden Faktoren Staurosporin, FasLigand und TNF α ausgeschlossen

werden. Ebenso konnte keine bessere Resistenz gegenüber H₂O₂ erzeugten oxidativen Stress in Endothel- und glatten Muskelzellen festgestellt werden.

Eine Aktivierung einzelner Signaltransduktionswege wie STAT, ERK1/2, p38, JNK und Akt durch FGF-7 Stimulation in Endothel- und glatten Muskelzellen fiel negativ aus. Selbst der Einsatz von Proteoglykanen wie Heparin und Heparansulfat, denen eine wichtige Rolle in der Rezeptoraktivierung als „low-affinity“-Rezeptor zugewiesen wird, konnte keine Veränderungen bewirken.

11.4. FGF-7 induziert eine FGF-2 Sekretion in aortalen Endothelzellen

Die in der Literatur beschriebene fast ausschließlich parakrine Wirkung des FGF-7 im Körper führte dazu, die den glatten Muskelzellen benachbarten Endothelzellen mit FGF-7 (10ng/ml) zu stimulieren und daraus folgende Veränderungen im sezernierten Proteinprofil nachzuweisen. Da dem Wachstumsfaktor FGF-2 eine für die Arteriogenese wichtige Rolle zugesprochen wird, wurde gezielt nach einer möglichen Regulation durch FGF-7 geschaut. Hierbei konnte die Basalsekretion von FGF-2 in Endothelzellen, wie in Abb.46 veranschaulicht, durch eine Stimulation mit FGF-7 gesteigert werden.

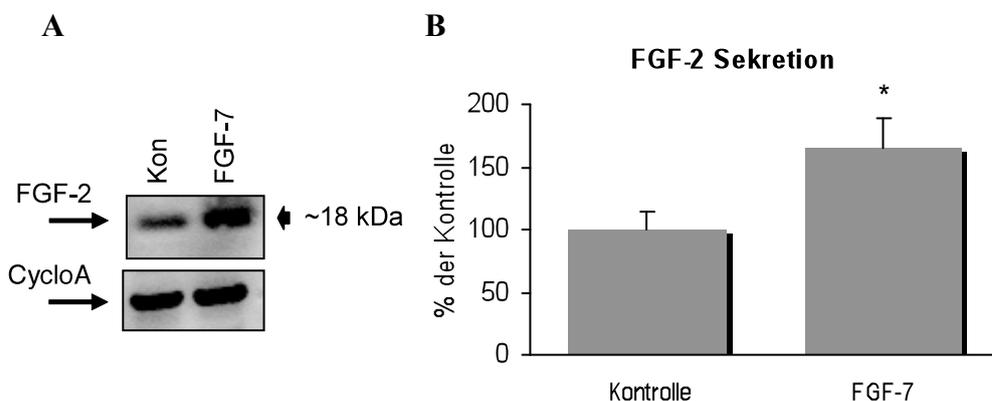


Abbildung 46: FGF-7 stimulierte Endothelzellen. A: Die FGF-7 Stimulation bewirkt eine vermehrte Sekretion FGF-2 durch Endothelzellen in den Überstand. B: Die induzierte FGF-2 Sekretion ist statistisch signifikant (* $p < 0,05$, $n=3$).

11.5. FGF-7 Wirkung *in vivo*

Die bis hierher durchgeführten Versuchsreihen wurden ausschließlich *in vitro* vorgenommen. Vor allem zur Klärung der Regulationsmechanismen, die die FGF-7 Expression beeinflussen, erwies sich die *in vitro* Konstellation als sehr vorteilhaft. Dennoch sollte auch versucht werden, *in vivo* Effekte des FGF-7 nachzuweisen.

11.5.1. Nachweis vermehrter gefäßaktiver Substanzen im Serum

Zu diesem Zweck wurde Balb-c Mäusen Palifermin (rFGF-7) intraperitoneal 14 Tage lang in einer Konzentration von 25µg pro Tag verabreicht. Die Substanz wurde freundlicherweise von der Firma Amgen zur Verfügung gestellt. Palifermin wurde hierbei in einer 5% FCS Lösung aufgenommen, während den Kontroll-Mäusen nur eine 5% FCS Lösung gespritzt wurde. Die Auswahl einer 5% FCS Lösung beruhte auf der Überlegung, einerseits einen besseren Schutz einer Proteolyse des Palifermins zu erzielen und andererseits eine in etwa gleich hohe Menge an Proteinen dem Körper zuzuführen. Dadurch sollten etwaige Immunreaktionen auf fremde Proteine in beiden Gruppen vergleichbar stark ausgelöst werden. Mit Hilfe des so genannten Multiplex-Systems von Biorad konnte das Serum nun auf verschiedene, durch FGF-7 regulierte Faktoren getestet werden.

Hierbei wurde im Serum nach der Injektion von Palifermin die Konzentration der Wachstumsfaktor VEGF A auf das Vierfache und die des PDGF BB auf das Doppelte hochreguliert (siehe Abb.47).

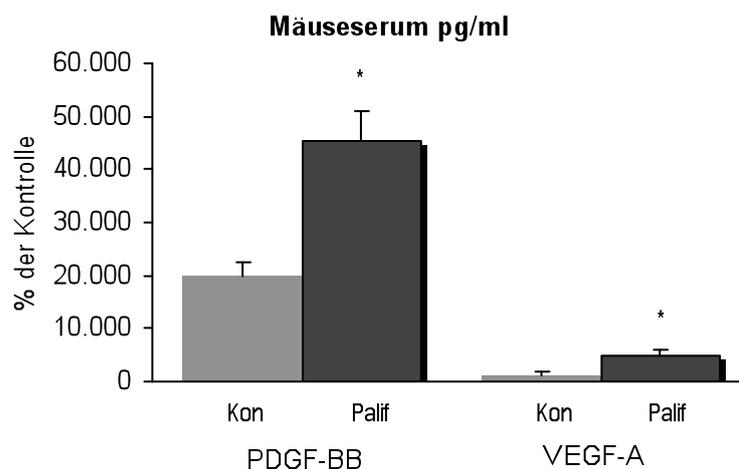


Abbildung 47: Behandlung von Balb-c Mäusen mit Palifermin. Die Injektion von 25µg pro Maus ließ die Konzentration von VEGF-A auf das Vierfache und die des PDGF-BB auf das Zweifache im Serum ansteigen. *p<0,05, n=9.

11.5.2. Inhibition des Kollateralwachstums nach Palifermin Injektion

Um eine eventuelle Wirkung des FGF-7 auf das Kollateralwachstum zu ermitteln, wurde Balb-c Mäusen (5 Stück) Palifermin intraperitoneal drei Tage vor und vier Tage nach Ligation in einer Konzentration von 50µg pro Tag verabreicht. Den Kontrolltieren (5 Stück) wurde eine 5% FCS Lösung gespritzt. Die Ligationen der Femoralarterien wurden hierbei durch Sylvia Schimanski durchgeführt (Ligationsmodell unter anderem in Scholz, Ziegelhoeffer et al. 2002 nachzulesen). Mit Hilfe des LDI (Laser Doppler Imager) konnte

nun die Durchblutung der Mäusepfoten visualisiert werden (siehe Abb.48). Vor der Okklusion war zwischen der Durchblutung der rechten und der linken Pfote kein Unterschied festzustellen. Nach der Okklusion der linken Femoralarterie war die Durchblutung in der linken Pfote im Vergleich zur rechten und im Vergleich zu vor dem Eingriff deutlich reduziert. In der okkludierten Pfote der gespritzten Mäuse erholte sich zwar die Durchblutung nach ein bis drei Wochen, erreichte aber nicht die Werte der Kontrollmäuse (siehe Abb.49).

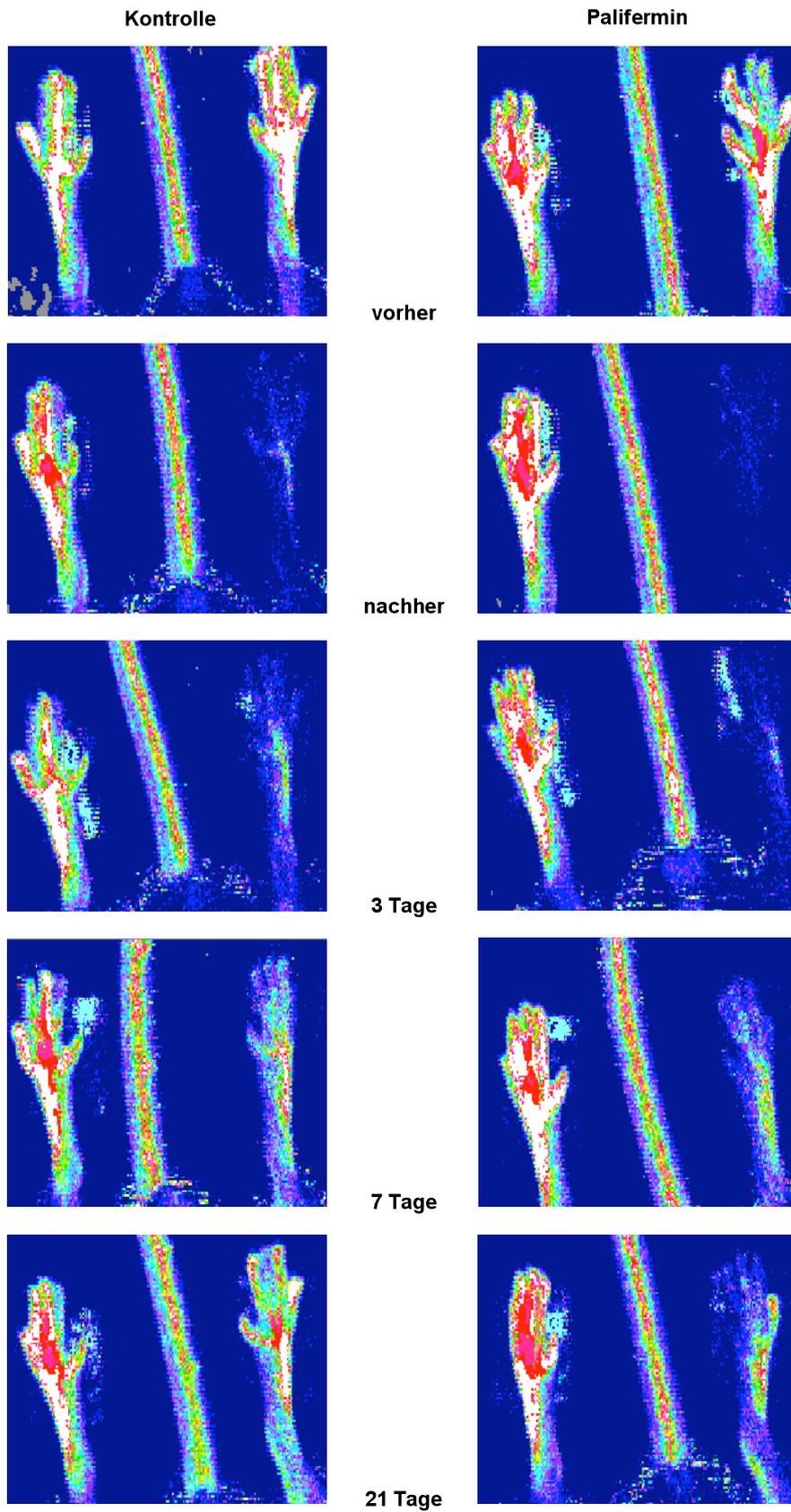


Abbildung 48: Laser-Doppler-Imaging ligierter Mäuse. Injektion von FCS (links) und von Palifermin (rechts). Zeitverlauf der Okklusion: vorher, nachher, 3, 7 und 21 Tage (von oben nach unten). Die Farbkodierung spiegelt die Anzahl der Dopplersignale wieder: dunkelblau (keine), hellblau (wenige), rot (viele), weiß (sehr viele) Signale

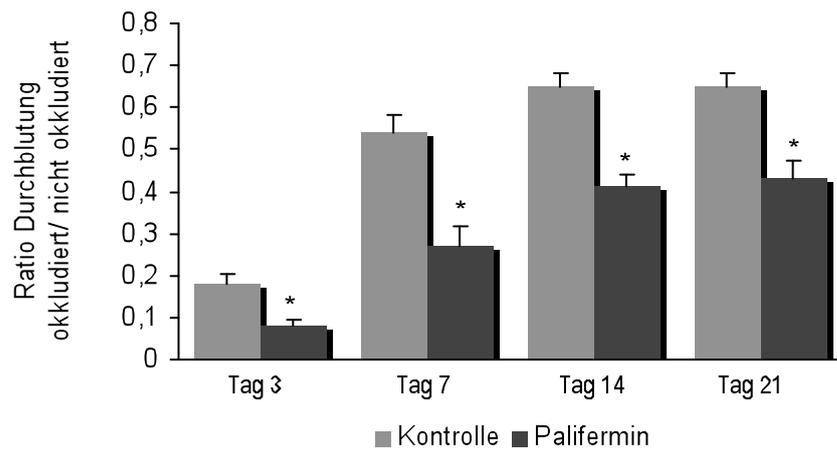


Abbildung 49: Statistische Auswertung der Abb.48. Vergleich des Links (okkludiert)/ Rechts (nicht okkludiert) Verhältnisses der Pfortendurchblutung zwischen FCS (5%) und Palifermin (rFGF-7) gespritzter Mäuse (* $p < 0,05$, $n=5$).

V. Diskussion

1. Vaskuläre glatte Muskelzellen des Schweins als Modell zur Untersuchung molekularer Mechanismen des Kollateralwachstums

Der Prozess des Gefäßwachstums wurde an verschiedenen Tier-Modellen untersucht. Hierbei standen bisher vor allem Studien an der Maus im Vordergrund. Die Problematik der in vivo Situation stellen die kleinen Dimensionen der Gefäße und die damit in Verbindung stehenden nur insuffizienten Mengen an Proteinen dar. Um dieses Problem zu beheben und dennoch einen tieferen Einblick in die molekularen Mechanismen des Kollateralwachstums zu erhalten, wurde ein Zellkultursystem etabliert. Die Isolation glatter Muskelzellen aus der Maus entwickelte sich dabei zu einer überaus schwierigen Aufgabe. Die sehr geringen Zellzahlen aus den Aortaisolationen einzelner Mäuse erforderten eine hohe Anzahl an Mäusen, um eine ausreichende Proteinmenge zu erhalten. Der größte Nachteil an dem Verfahren war jedoch die Kontamination der Zellkulturplatten mit anderen Zellarten wie Endothelzellen und Fibroblasten, die aufgrund ihrer höheren Zellteilungsrate die glatten Muskelzellen nach einigen Passagen verdrängten. Diese Problematik sollte mit der Verwendung glatter Muskelzellen aus dem Schwein umgangen werden. Eine Schweineaorta lieferte eine ausreichende Menge glatter Muskelzellen aus einem Tier, sodass die Zellen verschiedener Isolationen nicht gesammelt werden mussten. Dieser Vorgang war hingegen bei Mäuseisolationen notwendig, da Aorten vieler Tiere in einer Probe verwendet wurden. Außerdem unterliegen die aus dem Schwein isolierten Zellen aufgrund der geringeren Anzahl der notwendigen Passagen im Vergleich zu den Zellen aus der Ratte oder der Maus seltener der Hayflick-Limitierung (limitierte Kapazität der Zellteilung; (Shay and Wright 2000)) Es ist demnach fragwürdig, ob konstante Wachstumsraten und vergleichbare Morphologien zwischen den Subkulturen der Mäusezellen zu erzielen sind. Weiterhin ist das Schwein in einigen Aspekten besser mit dem humanen kardiovaskulären System vergleichbar. Dazu zählt beispielsweise der Puls, welcher beim Schwein 60-90 Schläge/min beträgt, wohingegen sich die Pulsfrequenz der Maus mit 300-800 Schlägen/min von der des Menschen klar unterscheidet. Ein weiterer Schritt mit dem in vitro System dem humanen in vivo System näher zu kommen, an welchem biologische Prozesse wie Atherosklerose, Restenosierung oder Kollateralwachstum studiert werden könnten, wäre die Kultivierung von humanen glatten Muskelzellen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist allerdings der Erwerb von Zellen aus gesunden Spendern nicht möglich und der Einsatz von Zellen aus erkrankten Patienten stellt aufgrund von pathologischen Veränderungen der Gefäße und Medikamentenbehandlungen keine akzeptable Alternative dar.

2. FGF-7 im vaskulären System

Obwohl FGF-7 in vielen Bereichen wie der Haut, Lunge und anderen epithelialen Organen gut untersucht ist, ist dessen Rolle im vaskulären System kaum erforscht und daher zuweilen unklar bis widersprüchlich. Während FGF-7 Transkripte in vaskulären glatten Muskelzellen aus gesunden als auch atherosklerotisch veränderten Gefäßen nachgewiesen werden konnten (Winkles, Alberts et al. 1997), wurde in Aortenendothelzellen keine Expression von FGF-7 gefunden (Rubin, Bottaro et al. 1995; Winkles, Alberts et al. 1997). In mikrovaskulären Endothelzellen hingegen konnte eine FGF-7 Synthese beobachtet werden (Smola, Thiekotter et al. 1993). Bezüglich des Wirkprofils des FGF-7 im Gefäß existieren in der Fachliteratur zum Teil gegensätzliche Berichte. Während in Fibroblasten und in venösen Endothelzellen keine mitogene Aktivität des FGF-7 registriert werden konnte (Rubin, Bottaro et al. 1995), konnte FGF-7 eine Neovaskularisation der Kornea durch Migration und Proliferation mikrovaskulärer Endothelzellen induzieren, obwohl der spezifische FGF-7 Rezeptor FGFR2/IIIb nicht nachgewiesen wurde (Gillis, Savla et al. 1999). Ebenso wurde in vaskulären glatten Muskelzellen keine mRNA des FGF-7 Rezeptors vorgefunden, sodass die Autoren eine Wirkung von FGF-7 auf glatte Muskelzellen ausschlossen (Winkles, Alberts et al. 1997). Dennoch stellen sowohl Winkles et al. als auch Gillis et al. einen noch nicht entdeckten Rezeptor für FGF-7 bzw. einen intrazellulären Wirkmechanismus des FGF-7 zur Diskussion. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Beobachtungen konnten in vaskulären glatten Muskelzellen der Ratte und des Menschen sowohl aus gesunden als auch aus atherosklerotisch veränderten Aorten FGF-7 und FGFR2/IIIb mRNA nachgewiesen werden. Hier stimulierte FGF-7 die Proliferation glatter Muskelzellen und die mit ihr einhergehende Progression der Neointima.

Aufgrund der soeben beschriebenen unterschiedlichen Beobachtungen war ein Teil der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien darauf ausgerichtet, diese Diskrepanzen zu klären. Hierfür wurden aus der Aorta glatte Muskelzellen und Endothelzellen isoliert und auf FGF-7 untersucht. Da FGF-7 ein sekretorisches Protein darstellt, wurde im Überstand der Monokulturen versucht, FGF-7 zu detektieren. Es konnte gezeigt werden, dass beide Zelltypen FGF-7 in den Überstand sezernieren, jedoch in unterschiedlichen Mustern. Das von den glatten Muskelzellen sezernierte FGF-7 zeigte die klassischen Doppelbanden, wohingegen das von den Endothelzellen sezernierte FGF-7 eine einzelne Bande auf Höhe der Doppelbande im Western Blot aufzeigte. Diese Bande war allerdings viel schwächer als die der glatten Muskelzellen ausgeprägt (siehe Abb.15). Die einzelne Bande könnte womöglich durch eine einfache Glykosylierung des FGF-7 zu Stande gekommen sein, während in glatten Muskelzellen unterschiedlich starke Glykosylierungen die Doppelbanden verursachen (Rubin, Bottaro et al. 1995). Der

entscheidende Unterschied lag jedoch, neben den höher sezernierten FGF-7 Mengen in glatten Muskelzellen, in der Fähigkeit anderer Zytokine, die Sekretion des FGF-7 zu beeinflussen. Das führte zu dem Schluss, glatte Muskelzellen als Schaltzentrale der FGF-7 Expression im Gefäß zu deklarieren.

Im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktoren der FGF Familie, die unterschiedliche FGF-Rezeptoren binden können, bindet FGF-7 ausschließlich den FGFR2/IIIb (Finch and Rubin 2004). Deshalb wurde in vaskulären Zellen versucht, den spezifischen FGF-7 Rezeptor ausfindig zu machen, mit dessen Nachweis indirekt eine Wirkung und gleichzeitig die Effektorzelle des FGF-7 im Gefäß nachgewiesen wäre. Der Nachweis des FGFR2/IIIb sowohl an glatten Muskelzellen als auch an Endothelzellen stellte sich allerdings als sehr kompliziert heraus. Die Problematik, dass für die FGFR2/IIIb Detektion kein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen den entsprechenden Rezeptor erwerblich ist, wird durch Wei et al mit der Nennung zweier Gründe zutreffend wiedergegeben. Zum einen unterscheiden sich die FGFR-Isoformen IIIb und IIIc nur in 46 Aminosäuren der dritten Immunoglobulin-Domäne. Zum anderen besitzt das Mäuse-FGFR2/IIIb eine sehr hohe Homologie zu der des Menschen (>98%), sodass nur eine einzelne Aminosäure der IIIb-spezifischen dritten Immunoglobulin-Domäne sich von der des Menschen unterscheidet (Wei, Zhan et al. 2006). Deshalb stand zunächst der Nachweis des FGF-Rezeptor 2 im Vordergrund. Der von Santa Cruz Biotech erstandene Antikörper ist gegen den FGFR2 aus der Ratte gerichtet. Ein Signal im Western Blot zu detektieren, war weder mit Zellen aus dem Schwein noch mit Gewebeproben der Maus möglich. Der Versuch, den Rezeptor anhand eines Antikörpers gegen den humanen FGFR2 zu detektieren, schlug ebenfalls trotz des Einsatzes zweier unterschiedlicher Antikörper (R&D Systems; Cell Signaling) fehl. Vermutlich sind die Antikörper nicht in der Lage, das spezifische Epitop des Schweinerezeptors zu erkennen, obwohl die Sequenz-Homologie zwischen dem Menschen und dem Schwein für die meisten Proteine sehr hoch ist. Mittels „SIM Alignment for protein sequences“ wurde für den FGFR2/IIIb eine Homologie von 96,6% berechnet. Auch der zur Verfügung gestellte und von ihnen bereits positiv getestete Antikörper der Gruppe Onda (Onda, Naito et al. 2003) zeigte zwar Signale, eine Positivkontrolle durch einen Phospho-Tyrosin Antikörper nach FGF-7 Stimulation misslang jedoch. Erschwerend kam hinzu, dass die Protein-Größenangaben (kDa) des Rezeptors in der Fachliteratur zwischen 105 (Cho, Ishiwata et al. 2007), 110 (Ishiwata, Naito et al. 2002), 120 (Wei, Zhan et al. 2006), 130 (Pan, Devaux et al. 2004), 140 (Belleudi, Leone et al. 2007) und 160 kDa (Onda, Naito et al. 2003) variierten.

Nichtsdestotrotz belegt die Clathrin-vermittelte Internalisierung und die Translokation des FGF-7 in den Zellkern, dass es einen Rezeptor für FGF-7 an der Membran und

gleichzeitig eine Wirkung an glatten Muskelzellen geben muss, auch wenn die Wirkung gegebenenfalls über einen noch nicht entdeckten Rezeptor vermittelt wird.

3. MNK und nicht cAMP ist entscheidend für die FGF-7 Expression in vaskulären glatten Muskelzellen

FGF-7 wird hauptsächlich in Zellen mesenchymalen Ursprungs produziert (Finch PW 1989). Hierzu zählen Zellen der Dermis, des Gefäßes, des Gastrointestinaltraktes, der Lunge sowie weiterer Organe (Rubin, Bottaro et al. 1995). In den jeweiligen Organen sind verschiedene Zytokine in der Lage, FGF-7 unterschiedlich potent zu stimulieren oder auch zu inhibieren. Besonders inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 sowie TNF α aber auch Wachstumsfaktoren wie „platelet derived growth factor“ (PDGF) und „epidermal growth factor“ (EGF) induzieren FGF-7 in humanen Fibroblasten, während „Transforming growth factor β “ (TGF- β) sowie antiinflammatorische Glukokortikoide wie Dexamethason die FGF-7 Synthese hemmen. Ferner konnte demonstriert werden, dass die FGF-7 Expression unabhängig einer de novo Proteinsynthese abläuft und somit der Familie der „primary response genes“ angehört (Werner, Peters et al. 1992). Als intrazellulärer Mechanismus, der das extrazelluläre Signal in eine FGF-7 Expression umwandelt, wurde sowohl von Brauchle et al als auch von Zhou et al ein cAMP abhängiger Prozess nachgewiesen. Während Zhou et al die Transkriptionsfaktoren ATF-1 und ATF-2, welche cAMP-vermittelt aktiviert werden, als Teil des FGF-7 Promotorkomplexes identifizieren konnten (Zhou and Finch 1999), beschreiben Brauchle et al eine Proteinkinase C Aktivierung als einen zusätzlichen Signaltransduktionsweg, der zur FGF-7 Expression führt (Brauchle, Angermeyer et al. 1994).

Da die oben beschriebenen Experimente an Fibroblasten der Maus durchgeführt wurden, sollten die Beobachtungen in vaskulären glatten Muskelzellen des Schweins nochmals bestätigt werden, um daraufhin die genauen molekularen Mechanismen aufzuklären, die der FGF-7 Induktion durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren unterliegen. Hierfür wurden glatte Muskelzellen mit verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimuliert und auf eine Änderung der FGF-7 Sekretion hin geprüft. Dabei konnte ein vergleichbares Reaktionsmuster, wie das oben geschilderte, beobachtet werden. Insbesondere inflammatorische Zytokine wie OSM und IL-1 sowie der Wachstumsfaktor FGF-2 steigerten die FGF-7 Sekretion, wohingegen die antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13 den gegenteiligen Effekt ausübten. Obwohl IL-1 bei der Induktion der FGF-7 Expression am potentesten war, wurde für die Identifizierung der intrazellulären Regulationsmechanismen des FGF-7 OSM eingesetzt. Dies beruhte auf der Überlegung, dass die Wirkungen des IL-1 sowohl auf glatte Muskelzellen als auch im Zusammenhang

mit FGF-7 tiefergehend untersucht sind, während der Einsatz von OSM neue Einblicke auf dessen kaum erforschte Wirkung in glatten Muskelzellen erbringen sollte.

Zu diesem Zwecke wurden zunächst die Signaltransduktionswege, die durch OSM in glatten Muskelzellen aktiviert werden können, nachgewiesen. Dazu zählen die drei MAP-Kinasen ERK1/2, p38 und JNK sowie die Akt und STAT Signalkaskaden. Der Einsatz einzelner spezifischer Inhibitoren ermöglichte es, die Signalkaskaden an definierten Stellen zu blocken. Auf diese Weise konnte eine Beteiligung der Signalwege Akt, STAT, JNK sowie NF- κ B an der FGF-7 Synthese ausgeschlossen werden. Die Inhibitoren der beiden MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 verursachten hingegen eine in etwa vergleichbare Abnahme, jedoch keine komplette Inhibition der FGF-7 Sekretion. Erst die Kombination beider Inhibitoren erzielte annähernd eine vollständige Einstellung der FGF-7 Sekretion, sodass der Fokus auf weiter „downstream“ liegende Schnittstellen der beiden Signalwege gelegt wurde. Zu jenen Schnittstellen gehören die Kinasen MSK und MNK sowie der Transkriptionsfaktor CREB. Etliche Anhaltspunkte wie die cAMP-abhängige FGF-7 Induktion in Fibroblasten (Brauchle, Angermeyer et al. 1994; Zhou and Finch 1999), die Aktivierung von CREB und ATF-1 durch OSM (siehe Abb.25) sowie die Potenz der CREB-Phosphorylierung durch ERK1/2 und p38 (Delghandi, Johannessen et al. 2005), legten die Vermutung nahe, dass CREB und/oder sehr wahrscheinlich ATF-1 in vaskulären glatten Muskelzellen die entscheidenden Transkriptionsfaktoren zur FGF-7 Synthese darstellen. Überraschenderweise konnten jedoch verschiedene Substanzen, die das cAMP Level der Zelle sowie die Proteinkinase A Aktivität beeinflussen, keine Änderung der FGF-7 Expression bewirken (siehe Abb.32), sodass in glatten Muskelzellen der cAMP Signaltransduktionsweg für die FGF-7 Induktion ausgeschlossen wird. Eine Prüfung der oben genannten Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) an der FGF-7 Synthese wurde nicht durchgeführt, da die Autoren die Beteiligung der PKC auf eine Stimulation mit dem PKC Aktivator Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) zurückführen. PMA ist indes auch ein ERK1/2 Aktivator, sodass die in der Veröffentlichung gezeigte FGF-7 Induktion wohl auf eine ERK1/2 und nicht auf eine PKC Aktivierung zurückzuführen ist. Einen Einfluss der in der Signaltransduktion nachfolgenden Kinasen MSK und RSK auf die FGF-7 Expression konnte durch die Verwendung der unter Punkt IV, 9.5 genannten Inhibitoren ebenfalls ausgeschlossen werden. Erst das Blockieren der ERK1/2 und p38 Schnittstelle MNK bewirkte eine weitgehende Eliminierung des FGF-7 im Überstand, die mit der kombinierten Blockierung aus p38 und ERK1/2 zu vergleichen ist (siehe Abb.35). Somit stellt sich MNK als das gesuchte Schlüsselenzym in der FGF-7 Synthese heraus, welches zur vollen Aktivität sowohl von der p38 als auch von der ERK1/2 MAPK phosphoryliert werden muss. In Abb.49 sind die durch OSM aktivierten Signaltransduktionswege und insbesondere die für die FGF-7 Expression ausschlaggebenden Kinasen nochmals dargestellt.

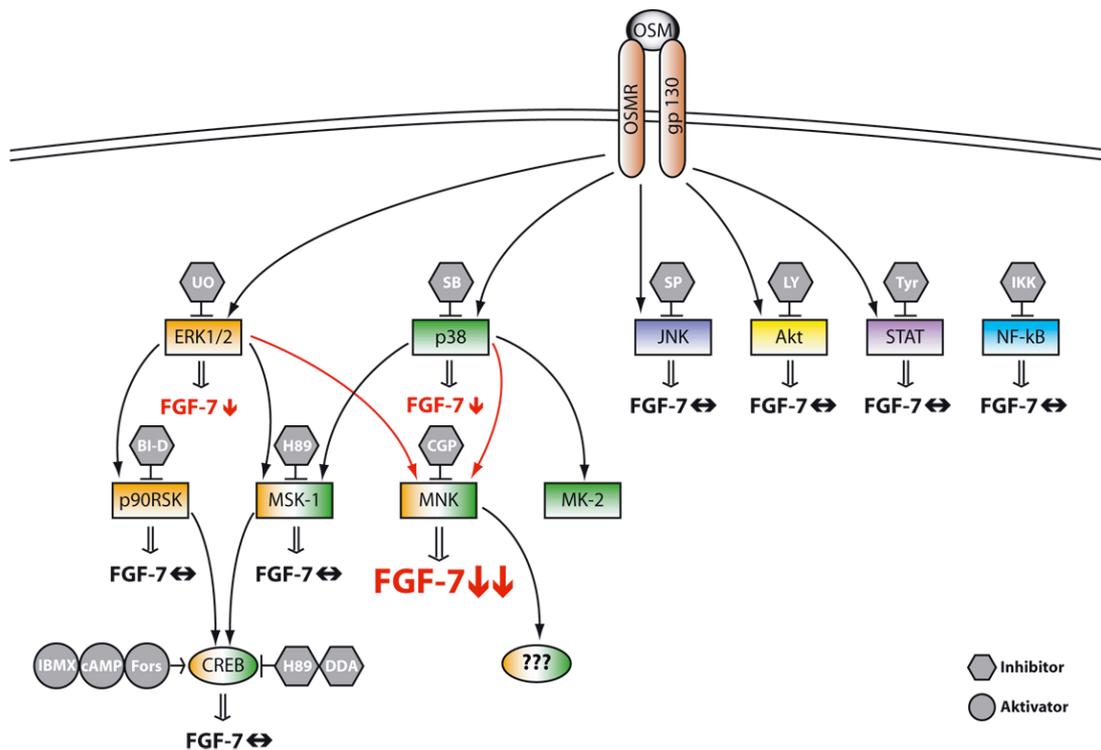


Abbildung 50: Zusammenfassung FGF-7 induzierender Signaltransduktionswege. Aus allen ermittelten Signalkaskaden, die durch OSM aktiviert werden, verändert nur eine Inhibition der MAPK ERK1/2 (UO) und p38 (SB) die FGF-7 Expression. Die Hemmung der Schnittstelle MNK (CGP) dieser beiden Kinasen führt letztlich zur kompletten Einstellung der FGF-7 Produktion in der Zelle. Andere Kinasen (RSK, MSK, MK-2) sowie CREB spielen keine Rolle in der FGF-7 Regulation.

Folglich ist die FGF-7 Expression, wie im Fall der meisten anderen „primary response genes“, durch unterschiedliche intrazelluläre Signalwege vermittelt und könnte somit die Fähigkeit der FGF-7 Induktion durch multiple Zytokine und Wachstumsfaktoren erklären, die sich in der Fähigkeit der Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden unterscheiden. Gleichermäßen bestimmt die Zellart selber die molekularen Mechanismen, die letztlich zur FGF-7 Expression führen.

4. MNK, eine arteriogenese-relevante Kinase?

Diverse Studien der Arteriogeneseforschung legten ihren Fokus auf die Identifizierung einzelner Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie Chemokine, die das Potential besitzen, positiv Einfluss auf das Kollateralwachstum nehmen zu können (Schaper and Scholz 2003). Intrazelluläre Signaltransduktionswege hingegen, die zu einer Expression der für die Arteriogenese notwendigen Faktoren führen, wurden bislang kaum erforscht (Cai and Schaper 2008). Aus diesem Grunde habe ich versucht, am Beispiel des während der

Arteriogenese hochregulierten FGF-7, die für dessen Induktion notwendigen molekularen Mechanismen nachzuvollziehen. Hierbei stellte sich die Kinase MNK für die FGF-7 Expression als Schlüsselenzym heraus (siehe Abb.49).

Die „MAPK signal integrating kinase“ (MNK) beinhaltet eine Gruppe aus vier Proteinen, die durch alternatives splicen entstehen. Dazu zählen MNK1 wie auch MNK2 mit seinen beiden Isoformen (MNK1a/b und MNK2a/b). MNK integrieren, wie ihr Name es schon andeutet, Signale der weiter „upstream“ liegenden MAPK p38 und ERK1/2. Obwohl sowohl MNK1 als auch MNK2 durch p38 und ERK1/2 phosphoryliert werden können, gibt es funktionelle Unterschiede. Während in nicht stimulierten Zellen MNK2 eine hohe basale Aktivität aufweist, zeigt MNK1 im Vergleich eine niedrigere Aktivität, wohingegen für stress- und mitogen- induzierte Signale vor allem MNK1 empfänglich ist. Dementsprechend beeinflussen Inhibitoren der MAPK p38 und ERK1/2 überwiegend den Phosphorylierungsstatus der MNK1, wohingegen die Inhibitoren kaum Einfluss auf die MNK2 nehmen (O'Loghlen, Gonzalez et al. 2007). Als Ausdruck der MNK Aktivierung werden zumeist die beiden Phosphorylierungsstellen Threonin 197 und 202 nachgewiesen, obwohl weitere Phosphorylierungsstellen der MNK bekannt sind. Scheper et al konnten acht potentielle Phosphorylierungsstellen der MNK2 nachweisen (Scheper, Morrice et al. 2001). Auch für die MNK1 der Maus sind zusätzliche Phosphorylierungsstellen (Tyrosin22, Serin 27) bekannt (Orton, Ling et al. 2004). Dennoch ist aktuell nur ein Antikörper gegen Phospho-(Thr 197,Thr 202) MNK kommerziell erhältlich.

Das am Besten untersuchte und für lange Zeit einzig bekannte MNK Substrat ist der eukaryote Initiationsfaktor 4E (eIF4E), welcher durch beide Kinasen phosphoryliert werden kann. EIF4E kann nach dem derzeitigen Wissensstand nur durch MNK phosphoryliert werden und nimmt eine bedeutende Rolle in der Translation der mRNA ein, indem es andere Translationsfaktoren sowie die 40S Ribosomenuntereinheit an die mRNA rekrutiert. Die physiologische Funktion einer Phosphorylierung von eIF4E im Zusammenhang mit der Regulation der Proteinbiosynthese ist jedoch unklar. Während einige Veröffentlichungen eine erhöhte Translationsaktivität nach eIF4E-Phosphorylierung zeigen, gibt es ebenfalls Berichte, die den gegenteiligen Effekt beobachten. Andere Substrate der MNK, welche die Translation bestimmter mRNAs kontrollieren, stellen „heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) und „polypyrimidine tractbinding protein associated splicing factor“ (PSF) dar. Es konnte in diesem Fall gezeigt werden, dass eine MNK Aktivierung über hnRNP A1 eine vermehrte TNF α Expression zur Folge hat (Buxade, Parra-Palau et al. 2008).

Das reichliche Vorkommen von MNK1/2 in der Milz, lässt annehmen, dass MNK eine Funktion in der Immunantwort ausübt, indem es Leukozyten eine Antikörper- sowie Zytokinproduktion ermöglicht. Dementsprechend konnte eine MNK1-abhängige

Produktion des Chemokins RANTES (Nikolcheva, Pyronnet et al. 2002) wie auch eine MNK-abhängige Produktion der Zytokine IL1 β , IL-8, IL-6 sowie TNF α in Keratinozyten (Kjellerup, Kragballe et al. 2008) beobachtet werden. Eine weitere Rolle spielt MNK scheinbar für das Zellüberleben, da MNK-Doppelknockout-Fibroblasten auf Apoptosereize wie Serumentzug sensibler reagieren als Wildtypzellen (Chrestensen, Eschenroeder et al. 2007). Nichtsdestotrotz zeigen Doppel-Knockout-Mäuse für MNK1 und MNK2 trotz fehlender eIF4E-Phosphorylierung keine Einschränkung des Zellwachstums und in der Entwicklung der Mäuse (Ueda, Watanabe-Fukunaga et al. 2004). Diese Daten demonstrieren, dass die endgültige physiologische Funktion dieser Kinasen noch geklärt werden muss.

Wie unter Punkt 3 beschrieben, nimmt MNK auch in vaskulären glatten Muskelzellen eine Funktion in der Proteinbiosynthese ein, indem es die Expression von FGF-7 stimuliert. In Abb.24 wird der Phosphorylierungsstatus der beiden MNK-Isoformen wiedergegeben. Dort ist der in der Literatur beschriebene typische Zustand der Kinasen zu erkennen. Während sowohl in nicht stimulierten als auch in OSM-stimulierten Zellen eine konstante Basalaktivität der MNK2 zu sehen ist, wird die MNK1 erst durch eine OSM-Stimulation an Position Thr197 und Thr202 phosphoryliert. Der Einsatz spezifischer Inhibitoren konnte keine Änderung der Basalaktivität der MNK2 bewirken, wohingegen der ERK1/2 Inhibitor eine Phosphorylierung der MNK1 verhindern konnte. Erstaunlicherweise wurde die Phosphorylierung der MNK1 durch den p38 Inhibitor (SB202190) nicht gehemmt, obwohl eine Abnahme der FGF-7 Sekretion sowie nach SB202190 als auch CGP57380 (MNK-Inhibitor) Behandlung zu messen war. Diese Beobachtung kann nur mit dem Vorhandensein anderer MNK1-Phosphorylierungsstellen erklärt werden, die durch p38 phosphoryliert werden. Wie oben beschrieben ist die Existenz anderer Phosphorylierungsstellen der MNK neben den Thr197- und Thr202 Stellen gezeigt worden. Ein experimenteller Beweis war angesichts der nicht vorhandenen Antikörper gegen andere Phosphorylierungsstellen der MNK nicht möglich und bleibt demnach durch alternative Methoden noch zu erbringen. Möglicherweise liefert die Analyse des MNK Substrates eIF4E einen ersten Hinweis auf eine andere Phosphorylierungsstelle der MNK, denn die Basalaktivität des eIF4E, die wohl auf eine Basalaktivität der MNK2 zurückzuführen ist, lässt sich durch OSM nicht steigern. Eine leichte Reduktion der Aktivität durch den ERK1/2 Inhibitor spiegelt wahrscheinlich die Inhibition der Basalaktivität anderer MNK Isoformen wider. Der PI3-Kinase Inhibitor hingegen verursacht eine vollständige Hemmung der Basalaktivität. Diese Tatsache lässt sich durch die notwendige Phosphorylierung des eIF4E-Bindungsproteins (eIF4E-BP) durch den Akt-Signaltransduktionsweg erklären, der eine Phosphorylierung des eIF4E erst ermöglicht (Hay and Sonenberg 2004). Da eine Phosphorylierung der MNK an Thr 197/202 durch ERK1/2 sowie p38 zumeist eine verstärkte Phosphorylierung des eIF4E zur Folge hat,

könnte demzufolge eine zusätzliche, neben der an Position Thr197 und Thr202 durchgeführte Phosphorylierung der MNK die Substratspezifität dieser Kinase ändern (siehe Abb.50)

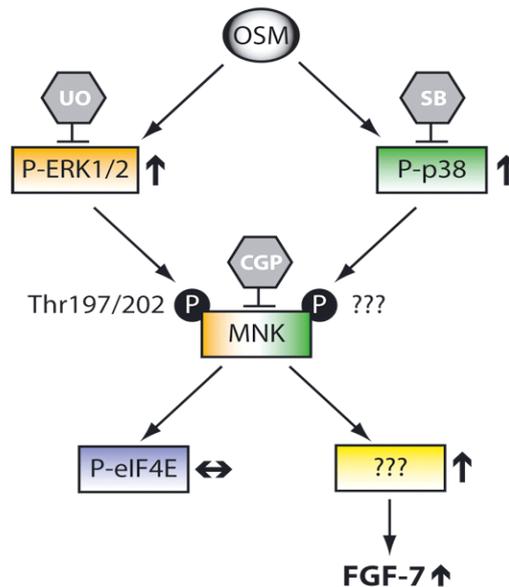


Abbildung 51: „Upstream“ und „Downstream“ der MNK. OSM kann über die Aktivierung der MAPK p38 und ERK1/2 die MNK in glatten Muskelzellen phosphorylieren. Während ERK die MNK an Position Thr197/202 phosphoryliert, kann p38 wohl die MNK an einer zusätzlichen Position phosphorylieren. Die OSM Stimulation führt zu keiner vermehrten Phosphorylierung des MNK Substrates eIF4E, jedoch mittels MNK Aktivierung zu einer verstärkten Expression FGF-7.

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse auf eine wesentliche Rolle der MNK im Prozess der Arteriogenese hin, indem die Kinasen zum einen durch arteriogenesrelevante Faktoren induziert werden können und ihrerseits neben FGF-7 die Synthese von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderer für die Arteriogenese notwendigen Proteine modifizieren können.

5. Parakriner, autokriner und/oder intrakriner FGF-7 Wirkmechanismus

Alle bisherigen Veröffentlichungen stellen FGF-7 als ein rein sezerniertes Protein dar und messen ihm eine entscheidende Funktion als parakrinen Mediator mesenchymal-epithelialer Kommunikation bei, indem FGF-7 von Zellen mesenchymalen Ursprungs gebildet wird und parakrin auf die FGFR2/IIIb exprimierenden epithelialen Zellen wirkt (Rubin, Bottaro et al. 1995). Ausnahmen stellen hierbei nicht-physiologische bzw. pathologische Situationen wie karzinomatöse Veränderungen dar, in denen FGF-7 und sein Rezeptor in den Zellen koexprimiert werden und demzufolge FGF-7 autokrin wirken kann (Cho, Ishiwata et al. 2007).

Der Nachweis des FGF-7 im Überstand glatter Muskelzellen zeigt, dass FGF-7 auch im vaskulären System ein sezerniertes Protein darstellt. Ob FGF-7 gleichermaßen auch parakrin wirkt, sollte durch Stimulation benachbarter Endothelzellen mit FGF-7 geprüft werden. Obwohl keine Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege ermittelt werden konnte, wurde eine verstärkte Sekretion des Wachstumsfaktors FGF-2 durch Endothelzellen gemessen (siehe Abb.46). Angesichts dieser Beobachtung ist eine parakrine Wirkung des FGF-7 belegt. Interessanterweise gehört FGF-2 selbst zu den Faktoren, die FGF-7 in glatten Muskelzellen induzieren können (siehe Abb.34). Insofern könnte FGF-7 insbesondere mit der sezernierten 18kDa FGF-2 Isoform einen positiven „Feedback-Loop“ bilden, indem FGF-2 durch eine Induktion von FGF-7 in glatten Muskelzellen seiner eigenen Sekretion einen weiteren Schub gibt. Demzufolge könnte FGF-2 mit Hilfe von FGF-7 die für die Arteriogenese unabdingbare Proliferation und Migration vaskulärer Zellen intensivieren.

Trotz des Negierens eines autokrinen Wirkmechanismus unter physiologischen Bedingungen, wurden glatte Muskelzellen mit FGF-7 stimuliert. Wenngleich keine Aktivierung der p38, ERK, JNK sowie anderer Signaltransduktionswege nachgewiesen werden konnte, demonstriert Abb.40, die mit der Internalisierung des FGF-7 in das Zytosol sowie der darauf folgenden Translokation in den Zellkern einhergehende Wirkung FGF-7. Der Prozess der Internalisierung konnte zudem anhand von Inhibitoren, die eine Clathrin- aber keine Caveolin-abhängige Internalisierung des FGF-7 aufzeigten, konkretisiert werden. Insofern stellt die Beobachtung eines autokrinen Wirkmechanismus – indem FGF-7, nachdem es sezerniert wurde, wieder in die Zelle aufgenommen wird – ein Novum in der Charakterisierung des FGF-7 dar. Weiterhin konnte mit der Translokation des FGF-7 in den Zellkern eine zusätzliche neue Charaktereigenschaft identifiziert werden. Beide Beobachtungen stehen im völligen Widerspruch zu denen in der Fachliteratur beschriebenen FGF-7 Eigenschaften. Bisher konnte weder für FGF-7 eine nukleäre Lokalisations-Sequenz ausfindig gemacht werden, noch wurde FGF-7 im Zellkern nachgewiesen, obwohl „in silico“ Analysen eine nukleäre FGF-7 Lokalisation mit einer Wahrscheinlichkeit von 65,2% gegenüber einer zytoplasmatischen von 13% vorhersagen (Quelle: PSORT II). Wahrscheinlich stellt das intrazellulär hergestellte nicht glykosylierte FGF-7 zudem eine weitere Quelle des nukleären FGF-7 im Sinne eines intrakrinen Mechanismus dar. Zur Aufklärung intranukleärer Funktionen des FGF-7 stoßen die Methoden der Proteinchemie hier an ihre Grenzen und sollten daher mittels molekularer Methoden angegangen werden. Dennoch können Parallelen zum Wachstumsfaktor FGF-2 gezogen werden, welcher je nach Isoform bevorzugt parakrin, autokrin oder intrakrin wirken kann (Sorensen, Nilsen et al. 2006). Da FGF-7 keine unterschiedlichen Isoformen besitzt, muss dessen Regulation hingegen einem anderen Mechanismus unterstellt sein. Hierfür könnten die Glykosylierungen des FGF-7 einen

Erklärungsansatz bieten. Die Funktion der posttranslationalen Glykosylierungen war lange Zeit ein Rätsel. Mittlerweile werden ihnen verschiedenste Funktionen zugesprochen, zu denen die Beteiligung an der Faltung von Proteinen, am Schutz vor Degradation durch Proteasen, an Zell-Zellerkennungsprozessen sowie an der Sekretion von Proteinen in den extrazellulären Raum zählen (Alberts et al 2002). Im Zusammenhang mit der Lokalisation des FGF-7 könnte eine weitere Funktion hinzukommen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Glykosylierung die Voraussetzung der Sekretion von FGF-7 ist, wohingegen eine Aufnahme in den Zellkern eine Deglykosylierung verlangt (siehe Abb51).

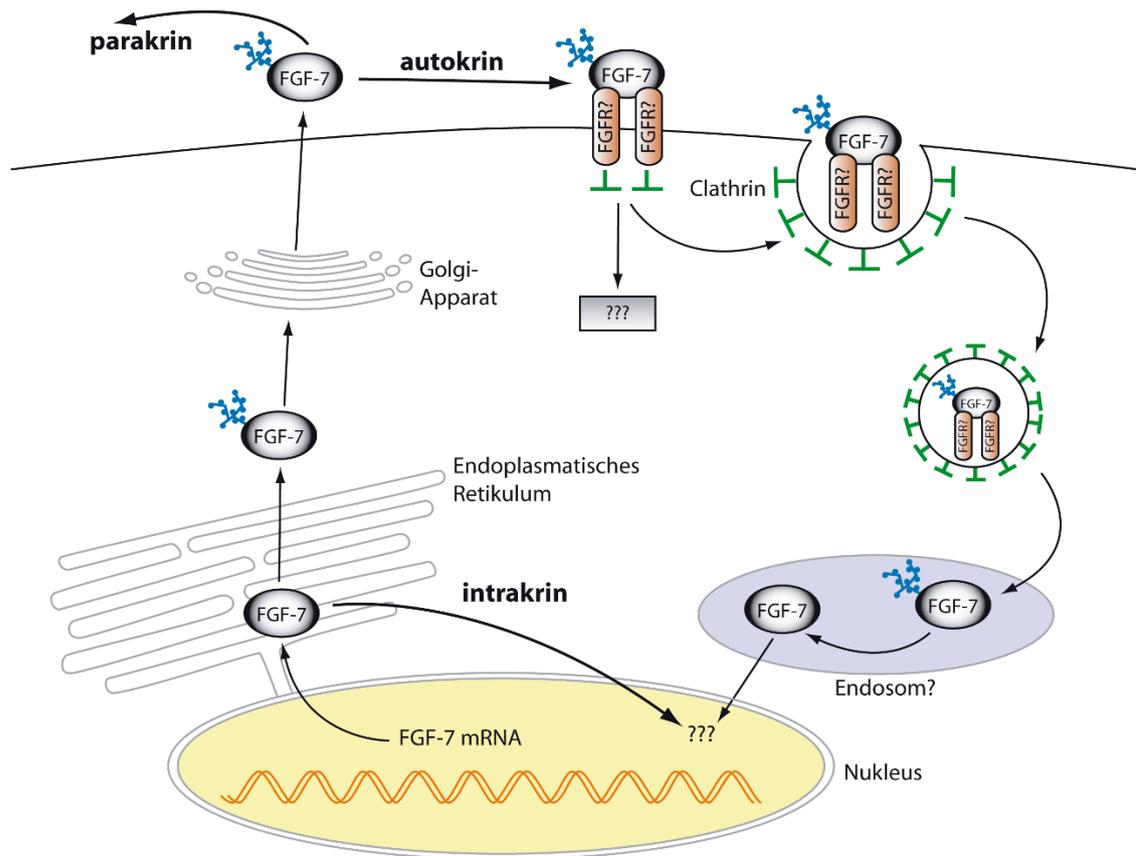


Abbildung 52: Schematische Darstellung der FGF-7 Wirkweise. Die im Zellkern gebildeten FGF-7 Transkripte wandern zum Endoplasmatischen Retikulum, wo sie zunächst zum Protein translatiert werden, um später glykosyliert zu werden. Dies führt zur Sekretion des Proteins in den extrazellulären Raum, wo es entweder parakrin auf andere Zellen wirken kann oder autokrin seinen Rezeptor bindet. Das hat wahrscheinlich zum einen eine Aktivierung bestimmter Signalkaskaden zur Folge und zum anderen wird glykosyliertes FGF-7 mittels Clathrin in die Zelle aufgenommen. Auf seinen Weg in den Zellkern muss es deglykosyliert werden, um den Zellkern betreten und seine Funktion dort ausüben zu können.

Zusammengefasst scheint es, dass Glykosylierungen dem FGF-7 einen gerichteten Fluss durch die Zelle ermöglichen, indem FGF-7 in Zellkompartimente gelangt, die zum einen zu seiner Sekretion führen und zum anderen seinen Transport in den Zellkern verhindern und schließlich den jeweiligen Wirkmechanismus bestimmen.

6. FGF-7 Einfluss auf die Bildung neuer Gefäße

Allgemeine Charakteristika des FGF-7 im vaskulären System wurden zum einen aus der Literatur wiedergegeben (siehe Einleitung) und zum anderen durch die oben beschriebenen Experimente herausgearbeitet. Auch bezüglich spezifischer Wirkungen des FGF-7 sind Berichte in der Literatur vorzufinden, die eine Rolle im Gefäßwachstum vermuten lassen. So zeigen Gillis et al eine Bildung neuer Kapillaren in der Kornea, die auf eine FGF-7 stimulierte Proliferation und Migration mikrovaskulärer Zellen zurückzuführen war. Zudem schützte FGF-7 die Endothelschicht gegenüber Wasserstoffperoxid und VEGF-induzierter Permeabilitätszunahme (Gillis, Savla et al. 1999). Gleichmaßen wird eine angiogenetische Wirkung für FGF-7 unter den pathologischen Verhältnissen eines Pankreakarzinoms angenommen, indem FGF-7 eine erhöhte VEGF-A Expression in den entarteten Zellen fördert (Cho, Ishiwata et al. 2007). Eine verstärkte FGF-7 induzierte VEGF Synthese wird desgleichen in epithelialen Zellen der Lunge (Koyama, Sato et al. 2002) sowie während der Wundheilung der Haut (Jeschke and Herndon 2007) beobachtet.

VEGF stellt im Prozess der Angiogenese einen vielfach umschriebenen Wachstumsfaktor dar (Carmeliet 2000). Es mehren sich indessen die Hinweise, dass VEGF auch einen Einfluss auf die Arteriogenese nehmen könnte. Demnach wird VEGF-A durch eine erhöhte Schubspannung in Endothelzellen hochreguliert. Dort könnte es zum einen die Proliferation von Endothelzellen und zum anderen die Rekrutierung von Makrophagen steigern (Pipp, Heil et al. 2003; van Oostrom, van Oostrom et al. 2008). Ein erhöhter Blutfluss durch Infusion von VEGF in wachsenden Kollateralen nach Okklusion der Femoralarterie stellt einen weiteren Beleg einer arteriogenetischen Wirkung dar (Schaper and Scholz 2003). Dennoch muss erwähnt werden, dass die vermehrte VEGF-Produktion erst stattfindet, wenn die meisten mitogenen Aktivitäten der vaskulären Zellen abgeschlossen sind (Cai and Schaper 2008).

Auf Basis der Annahme der soeben beschriebenen durch FGF-7 induzierten VEGF Expression sowie der VEGF Wirkung auf arteriogenetische Prozesse, wurde Mäusen Palifermin (rFGF-7) gespritzt, um daraufhin das Serum auf arteriogeneserelevante Faktoren zu testen. So wurde tatsächlich die VEGF-A (121 und 165 Aminosäuren Isoform) Konzentration durch FGF-7 signifikant auf das vierfache seiner Ausgangskonzentration gesteigert. Da VEGF nicht nur proliferativ auf Endothelzellen wirkt sondern auch einen der stärksten Induktoren der vaskulären Permeabilität (50.000 mal stärker als Histamin) darstellt (Buschmann, Heil et al. 2003), ist ein *in vivo*-Effekt des FGF-7 über die Hochregulation des VEGF auf das vaskuläre System gegeben. Eine Wirksamkeit des VEGF auf die Angiogenese steht außer Frage. Daher ist davon auszugehen, dass FGF-7 über die Regulation des VEGF die Bildung neuer Kapillaren intensiviert. Ob jedoch auch das Kollateralwachstum über eine VEGF Induktion verbessert werden kann, muss letztlich

im Ligationsmodell bewiesen werden. Neben VEGF wurde durch FGF-7 eine weitere gefäßaktive Substanz, PDGF-BB, hochreguliert. Ähnlich dem VEGF stellt PDGF-BB einen gut untersuchten und allgemein akzeptierten Wachstumsfaktor der Angiogenese dar, welcher unter anderem durch Rekrutierung von Perizyten die Gefäßstruktur stabilisiert (Risau 1997). Ferner lässt eine kombinierte Gabe von PDGF-BB und VEGF mehr reife Gefäße entstehen als eine Monotherapie der genannten Substanzen (Richardson, Peters et al. 2001). Gewisse Eigenschaften wie die verstärkte PDGF-BB Sekretion durch erhöhte Schubspannung (Risau 1997) und die vermehrte Freisetzung von Metalloproteinasen in Endothelzellen sowie Proliferation und Migration induzierende Effekte in vaskulären glatten Muskelzellen (Buschmann, Heil et al. 2003) lassen für PDGF-BB eine Funktion während der Arteriogenese vermuten. Cao et al konnten ein verstärktes Kollateralwachstum sowohl im Kaninchen- als auch im Ratten-Hinterlaufmodell nach PDGF-BB Infusion nachweisen. Dieser Effekt konnte mittels FGF-2 sogar gesteigert werden. Die Autoren erklären den additiven Effekt über eine vermehrte Expression des PDGF-BB Rezeptors durch FGF-2 (Cao, Brakenhielm et al. 2003). Im Gegenzug wird eine Beteiligung des PDGF am Kollateralwachstum als weniger wahrscheinlich angesehen, da eine erhöhte Schubspannung zu einer Abnahme der Akt-Aktivität führt. In vaskulären glatten Muskelzellen aktiviert PDGF-AB jedoch die Akt (Cai and Schaper 2008). Demnach scheint eine angiogenetische FGF-7-Wirkung über die vermehrte Expression von VEGF und PDGF-BB als sehr wahrscheinlich, auch wenn ein experimenteller Beweis hierfür noch erbracht werden muss.

Abgesehen von den soeben diskutierten angiogenetischen Wirkungen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit speziell der Einfluss des FGF-7 auf das Kollateralwachstums ermittelt werden. Erste Hinweise liefert die die in der Arbeitsgruppe von Frau Eva Bober (MPI für Herz- und Lungenforschung) generierte FGF-5/6/7 Knockout-Maus. Im Ligationsmodell konnte beobachtet werden, dass sich innerhalb der Knockout-Gruppe der Blutfluss im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant langsamer regenerierte bzw. dass sich das Kollateralwachstum mit starker Verzögerung entwickelte (Cai and Schaper 2008). Diese Ergebnisse lassen einen Einfluss von mindestens einem dieser Faktoren auf die Arteriogenese vermuten. Die Frage, welcher der Faktoren der Entscheidende ist oder welche Kombination aus diesen Faktoren die beschriebene Wirkung hervorruft, lässt sich mit dieser Knockout-Maus jedoch nicht beantworten. Aus diesem Grunde sollte das Mäuse-Hinterlaufmodell den Beweis einer proarteriogenen Wirkung FGF-7 erbringen. Überraschenderweise war das Kollateralwachstum der FGF-7 behandelten Mäuse jedoch im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant eingeschränkt. Die Durchblutung in den okkludierten Pfoten der gespritzten Mäuse erholte sich zwar nach ein bis drei Wochen, erreichte aber nicht die Werte der Kontrollmäuse (Abb.49).

Wie lässt sich solch ein Ergebnis mit den vorangehend gemachten Beobachtungen vereinbaren? Die Ursachen sollten zunächst im Versuchsaufbau gesucht werden. Allen voran ist die tägliche Dosis von 50µg (~2mg/kg) zu diskutieren. Sie stellt eine unphysiologisch hohe Konzentration dar und könnte zu einem Effekt auslösen, der im physiologischen Bereich nicht relevant ist und zum anderen könnte eine zu hohe Konzentration gegebenenfalls das Immunsystem sensibilisieren, sodass die für die Arteriogenese notwendigen Makrophagen für das Kollateralwachstum nicht zur Verfügung stehen. Auf der anderen Seite könnte ein maximaler Schutz vor Bleomycin- und Hyperoxie-induzierten Lungenschäden erst bei Konzentrationen von 5mg/kg erreicht werden (Guo, Yi et al. 1998), welche eine mehr als doppelt so hohe Konzentration als die in diesem Versuchsaufbau eingesetzte darstellt. Zudem sind zum jetzigen Zeitpunkt keine toxischen Nebenwirkungen durch FGF-7 Überdosierungen bekannt, sodass der Einsatz hoher Konzentrationen unproblematisch erschien. Ein weiterer Grund für die Inhibition des Kollateralwachstums könnte eine Infektion der Mäuse selbst sein, die das Immunsystem beeinträchtigt und auf diese Weise das Ergebnis verfälscht haben könnte. Dementsprechend sollte ein neuer Ansatz durchgeführt werden, der unterschiedliche Konzentrationen und möglicherweise auch eine unterschiedliche Applikationsdauer sowie einen unterschiedlichen Applikationszeitpunkt berücksichtigt. Unter der Voraussetzung, dass das Ergebnis auch unter anderen Bedingungen reproduzierbar ist, müsste eventuell die Antwort im Zellkern glatter Muskelzellen gesucht werden, in welchem FGF-7 eine nicht abzuspreekende Rolle einnehmen muss. Die Rolle entspreche in diesem Falle womöglich einer Inhibition arteriogenese-fördernder Mechanismen. Eine weitere Ursache für die unterschiedlichen Beobachtungen könnte der Unterschied zwischen dem komplexen in vivo System und dem einfachen System der Zellkultur darstellen. Die beobachtete Diskrepanz zwischen wachsenden Kollateralen und kultivierten glatten Muskelzellen könnte gegebenenfalls auch am Unterschied der Spezies (Schwein versus Maus) liegen. Vielmehr resultiert die Unstimmigkeit wohl aber aus der Tatsache, dass Kollateralen aus einer komplexen Wandstruktur, die aus multiplen Schichten vaskulärer Zellen (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten) besteht und nicht mit einer einzelnen Schicht glatter Muskelzellen, die auf einer Kulturschale ausgesät wurde, gleichzusetzen ist. Zusätzlich könnte die unterschiedliche Herkunft glatter Muskelzellen eine Erklärung bieten. Somit könnten sich glatte Muskelzellen, die am Aufbau der Kollateralen beteiligt sind, sich von denen aus der Aorta unterscheiden (Schwartz, deBlois et al. 1995).

7. Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit herausgearbeiteten Ergebnisse vertiefen das bisher in der Literatur wiedergegebene Verständnis des FGF-7 im makrovaskulären System und geben

einen Einblick in die Effekte, die FGF-7 auf das Gefäßwachstum und dabei insbesondere auf die Arteriogenese ausübt. Die aufgezeigten Mechanismen und Möglichkeiten, über die FGF-7 das Gefäßsystem beeinflussen kann, müssen dem ungeachtet noch näher untersucht werden, um ein abschließendes Bild zeichnen zu können. Das Hauptaugenmerk sollte dabei auf dem Einfluss des FGF-7 im Prozess der Arteriogenese liegen. Hierzu sollte im Ligationsmodell die oben beschriebene Versuchsanordnung durch Wahl anderer injizierter Konzentrationen, Applikationsdauer sowie -zeitpunkte variiert werden, um die bisherigen Ergebnisse zu bekräftigen oder auch zu widerlegen. Weitere Beweise könnten mit FGF-7 Knockout wie auch transgenen Mäusen geliefert werden. Obwohl einzelne Beobachtungen FGF-7 die Fähigkeit zusprechen, die Bildung neuer Kapillaren zu fördern, sollten neben der Auswirkungen auf die Arteriogenese auch die Effekte auf die Angiogenese geprüft werden, um FGF-7 gegebenenfalls als angiogenetischen Faktor zu etablieren.

Die Translokalisierung des FGF-7 in den Zellkern wurde in den zuvor beschriebenen Versuchen nachgewiesen. Darauf basierend sollte insbesondere die Funktion des FGF-7 im Zellkern mittels molekularer Methoden nachgegangen werden, da sie möglicherweise die Frage einer stimulierenden oder inhibierenden Wirkung des FGF-7 auf das Wachstum von Kollateralen beantworten könnten. Die für die Translokalisierung des FGF-7 in den Zellkern verantwortlichen Proteine könnten zusätzlich durch Co-Immunopräzipitationen identifiziert werden. Ebenso sollten molekulare Methoden bei der Suche nach Transkriptionsfaktoren hilfreich sein, die letztlich für die FGF-7 Synthese ausschlaggebend sind. Im Zusammenhang der FGF-7 Regulation sollte auch die durch p38 induzierte Phosphorylierungsstelle der MNK nachgewiesen werden. Zusätzliche Erkenntnisse der Regulation arteriogeneserelevanter Proteine würde die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die einer IL-13 verursachten Inhibition der FGF-7 Expression unterliegen, darbieten.

Unabhängig vom Einfluss des FGF-7 auf die Arteriogenese würden MNK Knockout Mäuse weitere Einblicke in die Regulierung intrazellulärer Signalwege ermöglichen. Hierbei könnte besonders die Relevanz der MNK als mögliche Schlüsselkinase in der Translation für die Arteriogenese notwendiger Proteine herausgearbeitet werden.

Letztlich sollten die oben erwähnten Beobachtungen in den Kontext der in der Klinik durchgeführten FGF-7 Therapie zur Prävention epithelialer Schäden im Gastrointestinaltrakt durch Radiatio und Chemotherapie gestellt werden. Denn die Therapie könnte neben epithelialer Schäden gegebenenfalls auch das Wachstum von Kollateralen reduzieren und könnte infolgedessen in herzkranken Patienten eine Verschlechterung der vorbestehenden kardialen Symptomatik verursachen.

VI. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Dissertation war es, die Bedeutung des Wachstumsfaktors „fibroblast growth factor 7“ (FGF-7) für das Gefäßsystem im Allgemeinen und insbesondere im Hinblick auf die Bildung neuer Kollateralen (Arteriogenese) aufzuklären.

FGF-7 und sein Rezeptor stellen im vaskulären System ein kontrovers diskutiertes Feld dar. Während vaskuläre glatte Muskelzellen (SMC) als FGF-7 Produzenten allgemein akzeptiert werden, wurde FGF-7 bisweilen in mikrovaskulären jedoch nicht in makrovaskulären Endothelzellen (EC) nachgewiesen. Desgleichen wird das Vorhandensein des FGF-7 Rezeptors in vaskulären Zellen überwiegend verneint. Dessen ungeachtet werden FGF-7 vermittelte Effekte in Form der Neubildung von Kapillaren (Angiogenese) beobachtet, wohingegen im makrovaskulären System die Rolle des FGF-7 unklar bleibt. Nichtsdestotrotz lassen „Gene array“ Daten, die eine verstärkte FGF-7 Expression während des Kollateralwachstums zeigen, eine Beteiligung FGF-7 im Prozess der Arteriogenese vermuten.

Neben SMC konnten auch makrovaskuläre EC als Quelle FGF-7 identifiziert werden, wohingegen eine Beeinflussung der Expression mit den Zytokinen Onkostatin M, Interleukin 1 und 13 nur in SMC gelang. Hierbei kristallisierte sich die MAPK-Interacting-Kinase 1 und 2 (MNK1/2) als Schlüsselenzym in der FGF-7 Expression heraus. Ferner konnte erstmals eine deglykosylierungsabhängige Lokalisation FGF-7 mit Hilfe der Immunofluoreszenz im Zellkern glatter Muskelzellen nachgewiesen werden. In EC konnte FGF-7 eine vermehrte Sekretion des arteriogenen Faktors FGF-2 induzieren. Zusätzlich zeigten FGF-7 behandelte Mäuse erhöhte Serumkonzentrationen der beiden angiogenen wie auch arteriogenen Wachstumsfaktoren „Vascular endothelial growth factor A“ (VEGF A) und „Platelet derived growth factor BB“ (PDGF BB). Obwohl die *in vitro* als auch die *in vivo* gesammelten Daten einen positiven Zusammenhang von FGF-7 und dem Wachstum von Kollateralen vermuten ließen, erwies sich FGF-7 im Mäuse-Hinterlaufmodell als der erste Inhibitor der Arteriogenese aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren. Auf der anderen Seite konnte die schon beschriebene Stimulation der Angiogenese durch FGF-7 mittels VEGF A Hochregulation untermauert werden und die Hochregulation von PDGF BB könnte zudem einen weiteren Mechanismus der Angiogeneseförderung darbieten.

In Anbetracht der vielen möglichen Funktionen FGF-7 im vaskulären System und der bisher unbekanntem Zellkernlokalisierung wird klar, dass weitere Studien nötig sind, um die dargebotene Ambivalenz des Wachstumsfaktors im Prozess der Arteriogenese zu klären. Besonders bedeutend ist dies im Hinblick auf die in der Klinik durchgeführte FGF-7 Therapie zur Prävention epithelialer Schäden im Gastrointestinaltrakt durch Radiatio und

Chemotherapie. Unter Umständen reduziert die Therapie neben epithelialer Schäden womöglich auch das Wachstum von Kollateralen und könnte infolgedessen in herzkranken Patienten eine Verschlechterung der vorbestehenden kardialen Symptomatik verursachen.

VII. Summary

The objective of the present study was to investigate the role of fibroblast growth factor 7 (FGF-7) in the vascular system in general and particularly with regard to the growth of collateral arteries (arteriogenesis).

In the vasculature the function and presence of FGF-7 and its receptor opens up a field of controversial discussions. Whereas the production of FGF-7 by vascular smooth muscle cells (SMC) is widely accepted, FGF-7 could only be detected in microvascular and not in macrovascular endothelial cells (EC). Likewise, the existence of the FGF-7 receptor is mainly denied in vascular cells. However, it is shown that FGF-7 is capable to induce new capillaries (angiogenesis) but the function in the macrovascular system remains unclear. Nevertheless gene-array data of growing collateral vessels show an upregulation of FGF-7 expression and would therefore expect an involvement of FGF-7 in the process of arteriogenesis.

Among SMC also macrovascular EC could be identified as source for FGF-7, whereas a cytokine (Onkostatim M, Interleukin1 and 13) dependent expression was seen in SMC only. Hereby, MAPK-Interacting kinase 1 and 2 (MNK1/2) was shown to be the key enzyme for the FGF-7 expression. Further a deglycosylation dependent nuclear localization of FGF7 was proven for the first time by immunofluorescence in SMC. In EC FGF-7 was able to induce an increased secretion of the potent arteriogenic factor FGF-2. Additional, FGF-7 treated mice showed elevated serum level for both angiogenic and arteriogenic growth factors “Vascular endothelial growth factor A” (VEGF-A) and “Platelet derived growth factor BB” (PDGF BB). Although the in vivo as well as the in vitro data would expect a positive correlation between FGF-7 and the growth of collateral vessels, in the mouse ischemia hind limb model FGF-7 turned out to be the first inhibitor of arteriogenesis within the growth factor family. On the other hand, stimulation of angiogenesis was supported by the known FGF-7 dependent upregulation of VEGF-A but the elevation of PDGF BB could also feature a new mechanism for angiogenesis by FGF-7.

Considering all potential functions of FGF-7 within the vascular system and the still unknown localization in the nucleus, it is obvious that more studies are necessary to solve the demonstrated ambivalence of the growth factor in the arteriogenic process. This is exceptionally important as FGF-7 is clinically used to prevent epithelic damage in the digestive tract after radiation and chemotherapy. Possibly, the therapy not only reduces epithelic damage but also growing collateral vessels and could therefore cause an impairment of cardiac function in patients with heart failure.

VIII. Literaturverzeichnis

- AHA (2007). "Heart Disease and Stroke Statistics-2007 Update." *Circulation*.
- Arras, M., W. D. Ito, et al. (1998). "Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb." *J Clin Invest* 101(1): 40-50.
- Baffour, R., J. Berman, et al. (1992). "Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor." *J Vasc Surg* 16(2): 181-91.
- Belleudi, F., L. Leone, et al. (2007). "Keratinocyte growth factor receptor ligands target the receptor to different intracellular pathways." *Traffic* 8(12): 1854-72.
- Berman, B., O. Ostrovsky, et al. (1999). "Similarities and differences between the effects of heparin and glypican-1 on the bioactivity of acidic fibroblast growth factor and the keratinocyte growth factor." *J Biol Chem* 274(51): 36132-8.
- Brauchle, M., K. Angermeyer, et al. (1994). "Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factors and pro-inflammatory cytokines in cultured fibroblasts." *Oncogene* 9(11): 3199-204.
- Brauchle, M., M. Madlener, et al. (1996). "Keratinocyte growth factor is highly overexpressed in inflammatory bowel disease." *Am J Pathol* 149(2): 521-9.
- Buschmann, I., M. Heil, et al. (2003). "Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis." *Microcirculation* 10(3-4): 371-9.
- Buschmann, I. and W. Schaper (1999). "Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth." *News Physiol Sci* 14: 121-125.
- Buxade, M., J. L. Parra-Palau, et al. (2008). "The Mnks: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases)." *Front Biosci* 13: 5359-73.
- Cai, W. and W. Schaper (2008). "Mechanisms of arteriogenesis." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40(8): 681-92.
- Cai, W., R. Vosschulte, et al. (2000). "Altered balance between extracellular proteolysis and antiproteolysis is associated with adaptive coronary arteriogenesis." *J Mol Cell Cardiol* 32(6): 997-1011.
- Cao, R., E. Brakenhielm, et al. (2003). "Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2." *Nat Med* 9(5): 604-13.

- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." *Nat Med* 6(4): 389-95.
- Celli, G., W. J. LaRochelle, et al. (1998). "Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi-organ induction and patterning." *Embo J* 17(6): 1642-55.
- Chedid, M., J. S. Rubin, et al. (1994). "Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1." *J Biol Chem* 269(14): 10753-7.
- Chen, W., M. O. Daines, et al. (2004). "Turning off signal transducer and activator of transcription (STAT): the negative regulation of STAT signaling." *J Allergy Clin Immunol* 114(3): 476-89; quiz 490.
- Cho, K., T. Ishiwata, et al. (2007). "Enhanced expression of keratinocyte growth factor and its receptor correlates with venous invasion in pancreatic cancer." *Am J Pathol* 170(6): 1964-74.
- Chrestensen, C. A., A. Eschenroeder, et al. (2007). "Loss of MNK function sensitizes fibroblasts to serum-withdrawal induced apoptosis." *Genes Cells* 12(10): 1133-40.
- Deindl, E., I. Buschmann, et al. (2001). "Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit." *Circ Res* 89(9): 779-86.
- Deindl, E., I. E. Hoefler, et al. (2003). "Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis." *Circ Res* 92(5): 561-8.
- Delghandi, M. P., M. Johannessen, et al. (2005). "The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells." *Cell Signal* 17(11): 1343-51.
- Derijard, B., M. Hibi, et al. (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." *Cell* 76(6): 1025-37.
- Dorr, W., R. Noack, et al. (2001). "Modification of oral mucositis by keratinocyte growth factor: single radiation exposure." *Int J Radiat Biol* 77(3): 341-7.
- Dvorak, P. and A. Hampl (2005). "Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells." *Folia Histochem Cytobiol* 43(4): 203-8.
- Eswarakumar, V. P., I. Lax, et al. (2005). "Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors." *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2): 139-49.

- Farrell, C. L., K. L. Rex, et al. (1999). "Effects of keratinocyte growth factor in the squamous epithelium of the upper aerodigestive tract of normal and irradiated mice." *Int J Radiat Biol* 75(5): 609-20.
- Fernandez, B., A. Buehler, et al. (2000). "Transgenic myocardial overexpression of fibroblast growth factor-1 increases coronary artery density and branching." *Circ Res* 87(3): 207-13.
- Finch PW, R. J., Miki T, Ron D, Aaronson SA (1989). "Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth." *Science*. 18: 752-5.
- Finch, P. W. and J. S. Rubin (2004). "Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair." *Adv Cancer Res* 91: 69-136.
- Florkiewicz, R. Z. and A. Sommer (1989). "Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(11): 3978-81.
- Folkman, J. (1995). "Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis." *N Engl J Med* 333(26): 1757-63.
- Forsythe, J. A., B. H. Jiang, et al. (1996). "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." *Mol Cell Biol* 16(9): 4604-13.
- Fulton, W. F. (1963). "Arterial Anastomoses in the Coronary Circulation. Ii. Distribution, Enumeration and Measurement of Coronary Arterial Anastomoses in Health and Disease." *Scott Med J* 8: 466-74.
- Gillis, P., U. Savla, et al. (1999). "Keratinocyte growth factor induces angiogenesis and protects endothelial barrier function." *J Cell Sci* 112 (Pt 12): 2049-57.
- Grant, S. L. and C. G. Begley (1999). "The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype?" *Mol Med Today* 5(9): 406-12.
- Guo, J., E. S. Yi, et al. (1998). "Intravenous keratinocyte growth factor protects against experimental pulmonary injury." *Am J Physiol* 275(4 Pt 1): L800-5.
- Guo, L., L. Degenstein, et al. (1996). "Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing." *Genes Dev* 10(2): 165-75.
- Guo, M., A. Joiakim, et al. (2000). "Suppression of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated aryl hydrocarbon receptor transformation and CYP1A1 induction by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1- benzopyran-4-one (LY294002)." *Biochem Pharmacol* 60(5): 635-42.

- Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." *Genes Dev* 18(16): 1926-45.
- Heil, M., I. Eitenmuller, et al. (2006). "Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences." *J Cell Mol Med* 10(1): 45-55.
- Helisch, A. and J. A. Ware (1999). "Therapeutic angiogenesis in ischemic heart disease." *Thromb Haemost* 82(2): 772-80.
- Herman, I. M. (1993). "Actin isoforms." *Curr Opin Cell Biol* 5(1): 48-55.
- Herzog, S., H. Sager, et al. (2002). "Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(5): H2012-20.
- Hsu, E., T. Osslund, et al. (2006). "Enhanced stability of recombinant keratinocyte growth factor by mutagenesis." *Protein Eng Des Sel* 19(4): 147-53.
- Ishiwata, T., Z. Naito, et al. (2002). "Differential distribution of fibroblast growth factor (FGF)-7 and FGF-10 in L-arginine-induced acute pancreatitis." *Exp Mol Pathol* 73(3): 181-90.
- Jameson, J., K. Ugarte, et al. (2002). "A role for skin gammadelta T cells in wound repair." *Science* 296(5568): 747-9.
- Jeschke, M. G. and D. N. Herndon (2007). "The combination of IGF-I and KGF cDNA improves dermal and epidermal regeneration by increased VEGF expression and neovascularization." *Gene Ther* 14(16): 1235-42.
- Johannessen, M., M. P. Delghandi, et al. (2004). "What turns CREB on?" *Cell Signal* 16(11): 1211-27.
- Kjellerup, R. B., K. Kragballe, et al. (2008). "Pro-inflammatory cytokine release in keratinocytes is mediated through the MAPK signal-integrating kinases." *Exp Dermatol* 17(6): 498-504.
- Koyama, S., E. Sato, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor mRNA and protein expression in airway epithelial cell lines in vitro." *Eur Respir J* 20(6): 1449-56.
- Kurita, Y., R. Tsuboi, et al. (1992). "Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in wound healing sites of mouse skin." *Arch Dermatol Res* 284(4): 193-7.
- Kyriakis, J. M., P. Banerjee, et al. (1994). "The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases." *Nature* 369(6476): 156-60.

- LaRochelle, W. J., K. Sakaguchi, et al. (1999). "Heparan sulfate proteoglycan modulates keratinocyte growth factor signaling through interaction with both ligand and receptor." *Biochemistry* 38(6): 1765-71.
- Lochner, A. and J. A. Moolman (2006). "The many faces of H89: a review." *Cardiovasc Drug Rev* 24(3-4): 261-74.
- Marchese, C., P. Mancini, et al. (1998). "Receptor-mediated endocytosis of keratinocyte growth factor." *J Cell Sci* 111 (Pt 23): 3517-27.
- Maseri, A. (1993). "Integration of cellular and molecular biology with clinical research in cardiology." *N Engl J Med* 328(6): 447.
- Miller, D. L., S. Ortega, et al. (2000). "Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice." *Mol Cell Biol* 20(6): 2260-8.
- Mire-Sluis (1998). "Cytokines."
- Nikolcheva, T., S. Pyronnet, et al. (2002). "A translational rheostat for RFLAT-1 regulates RANTES expression in T lymphocytes." *J Clin Invest* 110(1): 119-26.
local environment.
- O'Loghlen, A., V. M. Gonzalez, et al. (2007). "Characterization of the activity of human MAP kinase-interacting kinase Mnk1b." *Biochim Biophys Acta* 1773(9): 1416-27.
- Onda, M., Z. Naito, et al. (2003). "Expression of keratinocyte growth factor receptor (KGFR/FGFR2 IIIb) in vascular smooth muscle cells." *Pathol Int* 53(3): 127-32.
- Ornitz, D. M. and N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." *Genome Biol* 2(3): REVIEWS3005.
- Ornitz, D. M., J. Xu, et al. (1996). "Receptor specificity of the fibroblast growth factor family." *J Biol Chem* 271(25): 15292-7.
- Orton, K. C., J. Ling, et al. (2004). "Phosphorylation of Mnk1 by caspase-activated Pak2/gamma-PAK inhibits phosphorylation and interaction of eIF4G with Mnk." *J Biol Chem* 279(37): 38649-57.
- Pan, Z. Z., Y. Devaux, et al. (2004). "Ribosomal S6 kinase as a mediator of keratinocyte growth factor-induced activation of Akt in epithelial cells." *Mol Biol Cell* 15(7): 3106-13.
- Panoskaltis-Mortari, A., D. L. Lacey, et al. (1998). "Keratinocyte growth factor administered before conditioning ameliorates graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice." *Blood* 92(10): 3960-7.

- Peters, K., S. Werner, et al. (1994). "Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung." *Embo J* 13(14): 3296-301.
- Pipp, F., M. Heil, et al. (2003). "VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism." *Circ Res* 92(4): 378-85.
- Powers, C. J., S. W. McLeskey, et al. (2000). "Fibroblast growth factors, their receptors and signaling." *Endocr Relat Cancer* 7(3): 165-97.
- Raingeaud, J., S. Gupta, et al. (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." *J Biol Chem* 270(13): 7420-6.
- Ray, P., Y. Devaux, et al. (2003). "Inducible expression of keratinocyte growth factor (KGF) in mice inhibits lung epithelial cell death induced by hyperoxia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10): 6098-103.
- Renz-Polster (2005). *Basislehrbuch Innere Medizin*.
- Reusch, J. E. and D. J. Klemm (2003). "Cyclic AMP response element-binding protein in the vessel wall: good or bad?" *Circulation* 108(10): 1164-6.
- Richardson, T. P., M. C. Peters, et al. (2001). "Polymeric system for dual growth factor delivery." *Nat Biotechnol* 19(11): 1029-34.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." *Nature* 386(6626): 671-4.
- Risau, W. and I. Flamme (1995). "Vasculogenesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 73-91.
- Rissanen, T. T., J. E. Markkanen, et al. (2003). "Fibroblast growth factor 4 induces vascular permeability, angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model." *Faseb J* 17(1): 100-2.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 320-44.
- Rubin, J. S., D. P. Bottaro, et al. (1995). "Keratinocyte growth factor." *Cell Biol Int* 19(5): 399-411.
- Rubin, J. S., H. Osada, et al. (1989). "Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(3): 802-6.
- Saxena, N. K., D. Sharma, et al. (2007). "Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of

- invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells." *Cancer Res* 67(6): 2497-507.
- Schaper, J., M. Borgers, et al. (1972). "Ultrastructure of ischemia-induced changes in the precapillary anastomotic network of the heart." *Am J Cardiol* 29(6): 851-9.
- Schaper, W. (1993). "New paradigms for collateral vessel growth." *Basic Res Cardiol* 88(3): 193-8.
- Schaper, W. and I. Buschmann (1999). "Arteriogenesis, the good and bad of it." *Cardiovasc Res* 43(4): 835-7.
- Schaper, W. and W. D. Ito (1996). "Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth." *Circ Res* 79(5): 911-9.
- Schaper, W., Schaper J. (1993). Collateral circulation: heart, brain, kidney, limbs.
- Schaper, W. and D. Scholz (2003). "Factors regulating arteriogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(7): 1143-51.
- Scheper, G. C., N. A. Morrice, et al. (2001). "The mitogen-activated protein kinase signal-integrating kinase Mnk2 is a eukaryotic initiation factor 4E kinase with high levels of basal activity in mammalian cells." *Mol Cell Biol* 21(3): 743-54.
- Schiebler, S., Zilles (8.Auflage). "Anatomie."
- Scholz, D., W. J. Cai, et al. (2001). "Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease." *Angiogenesis* 4(4): 247-57.
- Scholz, D., W. Ito, et al. (2000). "Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis)." *Virchows Arch* 436(3): 257-70.
- Schwartz, S. M., D. deBlois, et al. (1995). "The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis." *Circ Res* 77(3): 445-65.
- Semenza, G. L., F. Agani, et al. (1999). "Regulation of cardiovascular development and physiology by hypoxia-inducible factor 1." *Ann N Y Acad Sci* 874: 262-8.
- Shay, J. W. and W. E. Wright (2000). "Hayflick, his limit, and cellular ageing." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 72-6.
- Smola, H., G. Thiekotter, et al. (1993). "Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction." *J Cell Biol* 122(2): 417-29.
- Sorensen, V., T. Nilsen, et al. (2006). "Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting." *Bioessays* 28(5): 504-14.
- Templeton, T. J. and S. D. Hauschka (1992). "FGF-mediated aspects of skeletal muscle growth and differentiation are controlled by a high affinity receptor, FGFR1." *Dev Biol* 154(1): 169-81.

- Trowbridge, J. M., J. A. Rudisill, et al. (2002). "Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratinocyte growth factor (FGF-7)." *J Biol Chem* 277(45): 42815-20.
- Ueda, T., R. Watanabe-Fukunaga, et al. (2004). "Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development." *Mol Cell Biol* 24(15): 6539-49.
- Unsicker, K., H. Reichert-Preibsch, et al. (1992). "Stimulation of neuron survival by basic FGF and CNTF is a direct effect and not mediated by non-neuronal cells: evidence from single cell cultures." *Brain Res Dev Brain Res* 65(2): 285-8.
- van Oostrom, M. C., O. van Oostrom, et al. (2008). "Insights into mechanisms behind arteriogenesis: what does the future hold?" *J Leukoc Biol*.
- van Royen, N., J. J. Piek, et al. (2001). "Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease." *Cardiovasc Res* 49(3): 543-53.
- Vanhaesebroeck, B., S. J. Leervers, et al. (1997). "Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers." *Trends Biochem Sci* 22(7): 267-72.
- Wei, P., J. Zhan, et al. (2006). "Generation and characterization of monoclonal antibodies to human keratinocyte growth factor receptor." *Hybridoma (Larchmt)* 25(3): 115-24.
- Werner, S., K. G. Peters, et al. (1992). "Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15): 6896-900.
- Werner, S., H. Smola, et al. (1994). "The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds." *Science* 266(5186): 819-22.
- Winkles, J. A., G. F. Alberts, et al. (1997). "Differential expression of the keratinocyte growth factor (KGF) and KGF receptor genes in human vascular smooth muscle cells and arteries." *J Cell Physiol* 173(3): 380-6.
- Wolf, C., W. J. Cai, et al. (1998). "Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries." *J Mol Cell Cardiol* 30(11): 2291-305.
- Yang, H. T., M. R. Deschenes, et al. (1996). "Basic fibroblast growth factor increases collateral blood flow in rats with femoral arterial ligation." *Circ Res* 79(1): 62-9.
- Yano, H., S. Nakanishi, et al. (1993). "Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells." *J Biol Chem* 268(34): 25846-56.

- Yi, E. S., S. T. Williams, et al. (1996). "Keratinocyte growth factor ameliorates radiation- and bleomycin-induced lung injury and mortality." *Am J Pathol* 149(6): 1963-70.
- Zhou, J. and P. W. Finch (1999). "Identification of a novel transcriptional regulatory element within the promoter region of the keratinocyte growth factor gene that mediates inducibility to cyclic AMP." *Biochim Biophys Acta* 1446(1-2): 71-81.

IX. Abkürzungsverzeichnis

ATF	Activating Transcription Factor
α -SMA	α -smooth muscle actin
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosin-Monophosphat
CARP	Cardiac ankyrin repeat protein
CREB	cAMP-response element binding protein
EC	Endothelial cell
EGR-1	Early growth response gene-1
eIF4E	Eukaryote Initiationsfaktor 4E
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FBS/FCS	Fetales bovines/Kälber Serum
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte magrophage-colony stimulating factor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
Hsp	Hitzeschockprotein
ICAM	Intercellular adhesive molecule
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
JNK/SAPK	c-jun N-terminale-/stressaktivierte Proteinkinase
kDa	Kilo Dalton
KGF	Keratinocyte growth factor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Macrophage chemoattractant protein-1
MK	MAPK-aktivierte Proteinkinase
MMP	Metalloproteinasen
MNK	MAPK-interagierende Kinase
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MSK	Mitogen- und stressaktivierte Proteinkinase

NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthetase
OSM	Onkostatin M
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PK	Proteinkinase
RSK	p90 ribosomal S6 kinase
SMC	Smooth muscle cell
SM-MHC	Smooth muscle myosin heavy chain
SSRE	Shear stress responding element
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF α	Tumor necrosis factor α
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor

X. Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr.med Dr.h.c. Jutta Schaper, die sich meines Projektes angenommen und mir damit eine intensive Ausarbeitung meines Themas ermöglicht hat. Ihre kritische Auseinandersetzung mit dem Manuskript und insbesondere ihre Hilfsbereitschaft waren für die Erarbeitung meiner Doktorarbeit unentbehrlich.

Herrn Dr. Rene Zimmermann möchte ich für die Überlassung des spannenden Themenfeldes danken sowie für die Möglichkeit, Erfahrungen im Bereich des wissenschaftlichen Arbeitens zu sammeln. Auch bei der Anfertigung des Manuskriptes waren seine Beiträge eine große Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Kubin, dem Betreuer meiner Dissertation. Er wies mich in den Großteil der Arbeitstechniken ein und stand mir für eine konstruktive Auseinandersetzung mit meinen Ergebnissen jederzeit zur Verfügung. Sein Enthusiasmus trieb mich stets an.

Nicht unerwähnt darf der Beitrag meiner Arbeitsgruppe zu dieser Arbeit bleiben. Danke Kerstin, Jutta, Ute, Sylvia, Katharina, Juliana, Jae Young, Holger, Praveen und Jochen für die konstruktive Zusammenarbeit und die täglich gute Stimmung im Labor.

Herrn Dr. Matthias Heil möchte ich für die Hilfe unter anderem am FACS-Gerät danken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Freunden für deren uneingeschränkten Rückhalt bedanken. Jamzn forever.

Ich möchte nicht versäumen, meiner Freundin Kerstin zu danken. Ich kann mich nicht genug für ihr Verständnis, ihre Geduld, ihren Glauben an mich und für ihre unermüdliche Liebe bedanken.

Meiner Familie gebührt besonderer Dank. Ich danke meinem Bruder Sadegh, meiner Schwester Mona und meiner Mutter Parvin für ihre unendliche Unterstützung und Förderung meiner Ambitionen und einem Zuhause voller Geborgenheit. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

