

**Der Einfluss von Simvastatin, Fluvastatin und  
Cerivastatin auf die proliferative und migrative  
Wirkung von FGF2 auf humanvenöse  
Endothelzellen.**

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

vorgelegt von Mark André Behrendt  
aus München  
Gießen 2011

Aus dem Zentrum für Innere Medizin  
**Medizinische Klinik I**  
**Abteilung für Kardiologie und Angiologie**  
des Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. Harald Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. med. Ali Erdogan

Gutachter: PD Dr. med. Jürgen Bauer

Tag der Disputation: 06.08.2012

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfsmitteln 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 mündlichen 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.

## **INHALTSVERZEICHNISS:**

**- DECKBLATT**

**- ZWEITLESER**

**- ERKLÄRUNG**

**- GLIEDERUNG**

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1. Atherosklerose	7
1.1.1. Endothelzellen und ihre Rolle in der Atherogenese	7
1.1.2. Atherosklerose als Krankheit	8
1.1.3. Die vier Stufen der Plaquentstehung	10
1.2. FGF2	12
1.2.1. Geschichte und Entdeckung von FGF2	12
1.2.2. Funktion von FGF2	13
1.3. Statine	14
1.3.1. Funktion (Simvastatin, Fluvastatin, Cerivastatin)	14
1.3.2. Die pleiotropen Effekte der Statine	15
1.4. Lipid Rafts	17
1.5. Mevalonatweg	18
1.6. Fragestellung	18
<b>2. EXPERIMENT</b>	<b>19</b>
2.1. Material & Methodik	19
2.1.1. Zellkultur	19
2.1.1.1. Zellisolation	19
2.1.1.2. Zellidentifikation	20
2.1.1.3. Kultivierung	20
2.1.2. Proliferation	21
2.1.2.1. Aussäen der Zellen	21
2.1.2.2. Stimulieren	21

2.1.2.3.	Messung der Exstinktion mit TecanGenios	24
2.1.3.	Migration	25
2.1.3.1.	Aussäen der Zellen	25
2.1.3.2.	Stimulation	26
2.1.3.3.	Messung	26
2.2.	Statistik	26
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>27</b>
3.1.	Proliferation	27
3.1.1.	Messreihen und Kontrollen	27
3.1.2.	Statine und FGF2	28
3.1.3.	Mevalonat	29
3.1.4.	MCD	31
3.1.5.	Isoprenoide	32
3.1.5.1.	FFP	32
3.1.5.2.	GGPP	33
3.2.	Migration	34
3.2.1.	Statine und FGF2	34
3.2.2.	Mevalonat	36
3.2.3.	MCD	37
3.2.4.	FFP	38
3.2.5.	GGPP	39
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>41</b>
4.1.	Ergebnisse vs. Literatur	41
4.1.1.	FGF2-Effekt	42
4.1.2.	Statine und FGF2	42
4.1.3.	Mevalonat	43
4.1.4.	MCD	43
4.1.4.1.	FGF2 Beeinflussung	43
4.1.4.2.	Statine und MCD	45
4.1.5.	Statine und ihr Effekt auf Isoprenoide	46
4.1.5.1.	FFP	50

4.1.5.2. GGPP	50
4.1.6. Zusammenfassung der Forschungshypothesen	52
4.2. Fehlerquellen	54
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>57</b>
<b>6. ABSTRACT</b>	<b>58</b>
<b>7. ANHANG</b>	<b>61</b>
7.1. Stichwortverzeichnis	61
7.2. Bilderverzeichnis	62
7.3. Tabellenverzeichnis	63
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>64</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>69</b>

## 1. EINLEITUNG

Meine Einleitung gliedert sich in vier Teile. Zuerst möchte ich die Atherosklerose und ihre Auswirkung auf das Endothel darstellen, anschließend werde ich den basic Fibroblastic Growth Factor (FGF2) näher beschreiben, will dann auf die Funktion von Statinen und deren Zusammenhang mit den Lipid Rafts eingehen und zuletzt eine Fragestellung formulieren.

### 1.1 Atherosklerose

#### 1.1.1 Endothelzellen und ihre Rolle in der Atherogenese

Bis auf einige Segmente der Endstrombahn (Kapillaren, Venolen) lässt sich in allen Blutgefäßen ein Dreischichtenaufbau erkennen. Von innen nach außen betrachtet, sind das; Die Tunica intima, bestehend aus Endothel und Basalmembran, ihr schließt sich die Tunica media an, die vorwiegend aus glatten Muskelzellen und elastischen Fasern besteht, welche nach Lokalisation und Beanspruchung des Gefäßes unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Die Tunica media dient der Stabilität und Elastizität der Gefäße. An der Peripherie befindet sich die Tunica adventitia, welche aus verschiedenen Bindegeweben (Fibroblasten, Proteoglykane, Kollagenfasern, Blut- und Lymphgefäße) aufgebaut ist und neben der Verankerung im Gewebe der Gefäß- und Nervenversorgung dient (Ullman-Rauch).

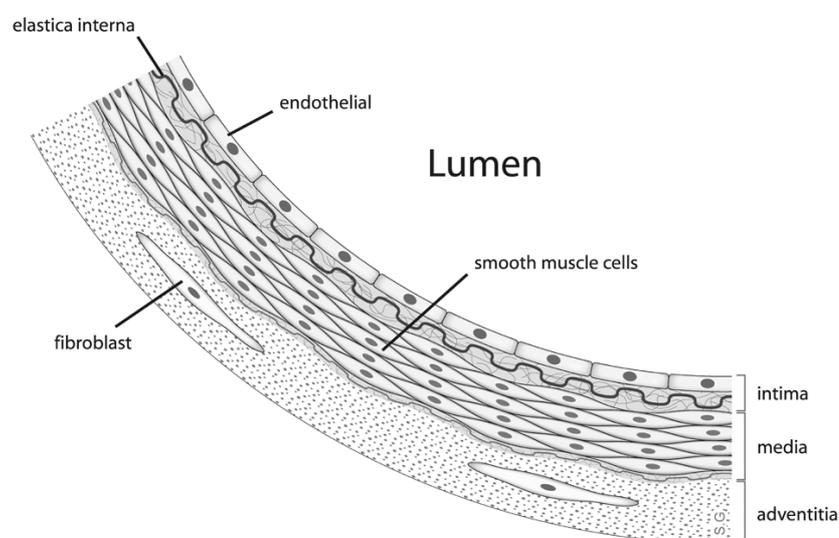


Abbildung 1.: Schematischer Aufbau der Gefäßwand.

Als innerste Schicht haben die Endothelzellen eine physiologische Barrierefunktion durch Regulation der Permeabilität. Verantwortlich für die Permeabilitätsänderung des Endothels sind „Zell-Zell-Kontakte“ in Form von „tight junctions“, die den Durchtritt von gelösten Stoffen regulieren, und „gab junctions“, welche die Diffusion von Ionen und kleinen Molekülen regulieren (Schaefer et al., 2006). Des Weiteren halten Endothelzellen ein antithrombotisches und profibrinolytisches System aufrecht, aber sie führen über die Produktion des Von-Willebrand-Faktors auch zur intravasalen Gerinnung. Sie regulieren den Gefäßtonus über vasodilatierende Stoffe, wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandin (PGI<sub>2</sub>) oder ATP und deren Gegenspieler, wie zum Beispiel Thromboxan und Endothelin. Des Weiteren regulieren sie das Gefäßwachstum (Angiogenese) und vermitteln bei der unspezifischen/spezifischen Immunabwehr. Sie stellen somit eine Grundvoraussetzung für die Funktionen des Blutes und der Organe dar.

### 1.1.2 Atherosklerose als Krankheit

Die WHO (1957) definiert Atherosklerose als variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen (Kalkablagerungen), verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia.

Atherosklerose ist eine Krankheit, deren chronische Verläufe und tödliche Ereignisse unter den ersten drei in den Industrienationen stehen. Nach dem 60. Lebensjahr rückt sie auf Platz eins in Deutschland. Ätiologisch korrelieren Risikofaktoren erster Ordnung (Zigarettenkonsum, Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Homocysteinämie, Infektion mit *Chlamydia pneumoniae*) und zweiter Ordnung (Adipositas, Bewegungsmangel, Distress, Thrombozyten, Lebensalter, Geschlecht, genetische Faktoren) mit ihrer Entstehung (Löffler, 1998).

Die Entstehung der Atherosklerose wurde bereits 1977 von Ross (Ross, Glomset, & Harker, 1977) in seiner "Response to Injury - Hypothese" beschrieben. Wie Virchow schon mehr als 100 Jahre zuvor, ging auch Russell Ross von einer Mischung von Inflammation und Proliferation als Ursache der Atherosklerose aus. Durch abgeschältes Endothel entstanden Läsionen, an denen Thrombozyten haften blieben

und aktiviert wurden. Die von ihnen ausgeschütteten Wachstumsfaktoren führten dann zur Proliferation von glatten Muskelzellen und anderen mesenchymalen Zellen. Beim Umbau des Bindegewebes kommt es laut seiner Hypothese weiter zur gleichzeitigen Einlagerung von extra- und intrazellulären Fetten und Lipoproteinen in Monozyten und glatten Muskelzellen, somit entstehen Schaumzellen. Die Schaumzellen führen zu einer Entzündungsreaktion, deren fibroproliferative Reaktion (Ross, 1995) jetzt von der Intima, der Endothelschicht des Gefäßes, auch auf die Media übergreift. Bei diesem Schritt, der aus Migration und Proliferation besteht, spielen eine Vielzahl von Polypeptidwachstumsfaktoren eine wichtige Rolle (Fan & Watanabe, 2003). Sie modulieren die Synthese des Mesenchyms, regen die Angiogenese an und ändern den Metabolismus der Zellen, wobei es zur verstärkten Einlagerung von Lipiden kommt. Diesem Schritt der Einlagerung und Interaktion von extra- und intrazellulären Fetten und Lipoproteinen in Zellen der Plaueformation (Endothelzellen, Makrophagen/Monozyten, glatte Muskelzellen, T-Zellen) wird heute die größte Bedeutung im Rahmen der multifaktoriellen Genese der Atherosklerose zugesprochen (Fan & Watanabe, 2003). Am stärksten proinflammatorisch gelten oxidiertes LDL, Lipoprotein A und  $\beta$ -VLDL. Antiinflammatorisch hingegen wirkt HDL, welches viele der Wirkungen der schlechten Fette blockiert und reversiert (Blankenhorn & Hodis, 1993; Fan & Watanabe, 2003).

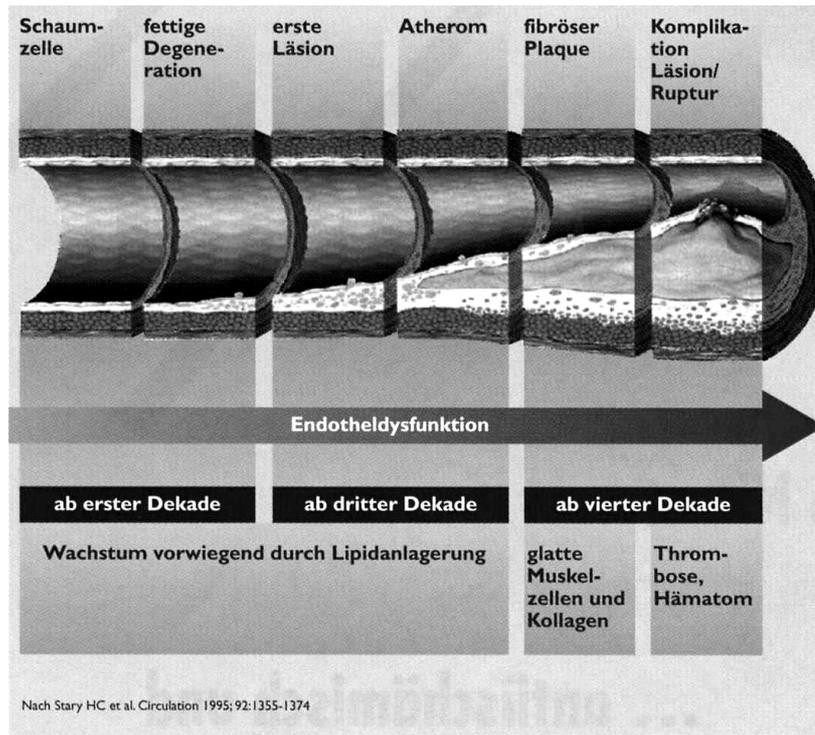
Am wichtigsten bei der Therapie ist die Prophylaxe, die mit gesunder Lebensweise und Ernährung zu tun hat. Therapeutisch bieten sich drei Möglichkeiten: Diät, Pharmakotherapie und chirurgische Intervention. Diätetisch ist auf ausgewogene vitaminreiche Ernährung zu achten und die Qualität von guten (ungesättigten) und ungesunden (gesättigten) Fetten zu bedenken. Chirurgisch stehen die Angioplastien mit Stenteinlage oder die Bypass-Operation zur Verfügung. Pharmakologisch ganz vorne rangieren die Statine, Niacin und Cholesterinabsorptionshemmer wie Ezitimibe und Fibrate, auf die ich später noch genauer eingehen werde. Bei der pharmakologischen Therapie tritt jedoch auch immer mehr die hypertone und inflammatorische Komponente in den Vordergrund (Insull, 2009).

### 1.1.3 Die vier Stufen der Plaqueentstehung

I. Als erstes mikroskopisches Resultat der Atherosklerose, das ist die Einlagerung von Fetten in Zellen, entstehen fatty streaks. Die Grundlage hierfür wird bereits in der Kindheit gelegt und setzt sich bis ins hohe Alter fort. Oxidiertes-LDL lagert sich in der Intima ab und führt dort zu einer Inflammation. Diese wiederum führt zur Einwanderung von Entzündungszellen, worunter sich Makrophagen befinden, die das LDL-ox zu phagozytieren versuchen und sich als Schaumzellen darstellen lassen. Sind diese Schaumzellen gesättigt, akkumulieren die Fette im Gewebe und die Atherogenese beginnt (Insull, 2009).

II. Die sich im Gewebe ablagernden Fette akkumulieren zu Fibroatheromen (=Plaques). Schon in der Jugend entstehen Fibroatherome mit zunehmender Inflammation, welche zu Zelldebris führt. Der Debris der beteiligten Zellen wiederum regt selbst eine Entzündung an und führt somit zu Nekrosen in der Gefäßwand, wodurch die Fettablagerungen zum Lumen exponiert werden. Fibroblasten probieren diesem Geschehen entgegen zu wirken und bilden eine fibröse Kappe (Fibrous Cap). Das Ausmaß und die Geschwindigkeit dieser fibrösen Kappe korreliert mit der Risikogruppe der kardiovaskulären Ereignisse und ist durch gesunden Lebenswandel nicht mehr zu reversieren (Insull, 2009).

III. Das Atherom wächst weiter, wodurch die fibröse Kappe an einigen Stellen ausdünn und zu reißen droht. Im Alter von 55 bis 65 Jahren kommt es zur höchsten Inzidenz für kardiovaskuläre Ereignisse durch instabile Plaquerupturen (Insull, 2009). Während stabile Plaques sich durch eine dicke fibromuskuläre Decke und hohe Proliferation von glatten Muskelzellen darstellen, befinden sich in instabilen Plaques mehr Lipidablagerungen und Entzündungszellen (Fan & Watanabe, 2003).



### Verlauf der Atherosklerose

Abbildung 2.: Plaqueentstehung im Modell.

Bleibt der Plaque stabil, so wird er umgebaut (=Remodeling). Gefäße und glatte Muskelzellen wandern ein, das eigentliche Gefäß dehnt sich aus zur Lumenkompensation, fibröse Verwachsungen nehmen zu und nekrotische Areale führen zu Blutgerinnung und Thrombenbildung.(Insull, 2009) Spätestens jetzt ist auch der stabile Plaque dauerhaft hämodynamisch relevant. Im Gegensatz zu den Stenosen der stabilen Plaques, die erst ab 75% Lumeneinengung pathologisch werden (Maseri & Fuster, 2003), stellen Plaquerupturen die akut tödlichen und schwer verhinderbaren Symptome der Atherosklerose dar (Hansson, 2005).

IV. Auch wenn das Atherom stabil ist, so reißen doch ab und zu kleinere Teile aus. Diese Plaqueabrisse führen zu Reperationsprozessen, welche Calcium ablagern, hierdurch wird die Stenose rigider und größer.

## 1.2 FGF2

### 1.2.1 Geschichte und Entdeckung von FGF2

Zuerst möchte ich kurz auf die Entdeckung und den Rezeptor von FGF2 eingehen, bevor ich die Funktion erkläre. Entdeckt wurde FGF2 von Gospodarowicz 1939 (Ribatti, Vacca, Rusnati, & Presta, 2007); er beschrieb einen potenten Wachstumsfaktor, den er aus der Hypophyse von Rindern gewann. Obwohl er den genauen Faktor nicht kannte, nannte er ihn "fibroblastischer Wachstumsfaktor". Der Wachstumsfaktor hatte ein Gewicht von 14-16kDa. 1984 entdeckten Shing et al. (Shing & Klagsbrun, 1984), dass sich FGF mit hoher Affinität an eine Heparinsäule bindet und sich somit isolieren lässt (Ribatti et al., 2007). Das Molekulargewicht wurde auf 14,8kDa bestimmt. Auf Grund des isoelektrischen Punktes wurden ein basisches bFGF, heute FGF-2, und ein azidisches aFGF, heute FGF-1, benannt (Mohammadi, Olsen, & Ibrahimi, 2005), welche nicht nur Fibroblasten, sondern alle Zellen mit hämatopoetischem Ursprung, unter anderem Endothelzellen, zum Wachstum anregen (Ribatti et al., 2007).

Nach heutigem Wissensstand gibt es 23 FGF's und vier Rezeptoren mit mehreren Isoformen (Javerzat, Auguste, & Bikfalvi, 2002). Der FGF-Rezeptor ist eine transmembranäre immunglobulinähnliche Dimerdomäne mit Tyrosinkinaseaktivität, welche stark von HSPG (Heperansulfat Proteoglykan) abhängt. Über diesen Rezeptor wird unter anderem die MAPK (mitogenassoziierte Proteinkinase) aktiviert, welche neben vielen anderen Signalwegen für Proliferation und Differenzierung wichtig ist. Des weiteren wird bei Aktivierung des Rezeptors eine Vielzahl von Proteinen aktiviert, die in mehreren Signalschleifen miteinander interagieren um die proliferativen, apoptotischen und differenzierenden Wirkungen von FGFs zu koordinieren (Murakami, Elfenbein, & Simons, 2008). So dient der FGF-Rezeptor1 der Proliferation, Migration, Proteasenproduktion und Zellskelettmorphogenese, während der FGF-Rezeptor2 der Zellmotilität zugeschrieben wird (Javerzat et al., 2002). FGF2 dockt an beide Rezeptoren an, es besteht somit eine Inkongruenz. Hinzu kommt, dass für FGF2 in der modernen Literatur noch diverse andere Rezeptor- und Signalmöglichkeiten sowie Sekretionswege beschrieben werden (Javerzat et al., 2002; Murakami et al., 2008; Vincent et al., 2001).

Es wird eine große Anzahl von angiogeneseanregenden Faktoren beschrieben, wie

Angiopoetine, TGFs, PDGFs, TNF-alpha, Interleukine, Chemokine, VEGFs und FGFs. Die beiden letztgenannten sind hierbei als die stärksten hervorzuheben, daher möchte ich als Nächstes auf die Funktion von FGF2 näher eingehen (Presta et al., 2005).

### 1.2.2 Funktion von FGF2

HUVECs exprimieren Rezeptoren für fast alle FGFs und reagieren besonders auf die angiogenetischen FGF1,2,4,5 in vitro und in vivo (Seelenmeyer, Stegmayer, & Nickel, 2008). Endothelzellen selbst werden zur Produktion von FGF2 angeregt durch IL-2, IL-1b und NO, dessen Produktion durch Zytokine, Endotoxine, Neuropeptide, und Scherstress provoziert wird (Presta et al., 2005). Ein großer Anteil des angiogenetischen Effekts von FGF2 wird auf die Hochregulierung der NO-Produktion in Endothelzellen zurückgeführt (Matsumoto, Turesson, Book, Gerwins, & Claesson-Welsh, 2002).

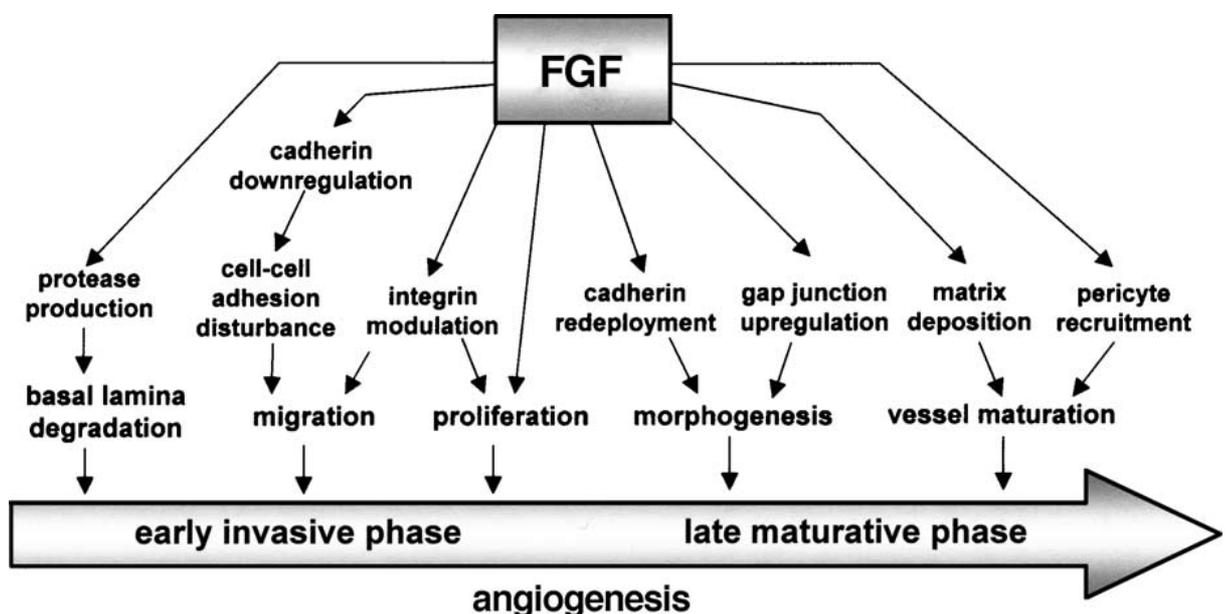


Abbildung 3.: FGF-Effekte an Endothelzellen (Presta et al., 2005).

Die Darstellung zeigt, wie weitläufig die Wirkungen von FGF2 auf die Angiogenese sind. FGF2 ist wohl in Differenzierung und Morphogenese (Murakami et al., 2008), Proliferation, Migration und Tubulogenese bei der Angiogenese von Endothelzellen (Javerzat et al., 2002) beteiligt, über eine große Anzahl von nur zum Teil bekannten

Signalkaskaden. Zudem werden seine Wirkung und sein angiogenetisches Potenzial im Sinne von Stabilität, lokaler Konzentration, Interaktion mit Rezeptoren und Verfügbarkeit von vielen Faktoren beeinflusst (Ribatti et al., 2007). Solche Faktoren bestehen aus Heparansulfat Proteoglykanen, Integrinen, Chemokinen und vielen anderen extrazellulären Matrixproteinen (Presta et al., 2005). Das breite Spektrum von Wirkungen und Rezeptormechanismen hat die genaue Analyse der angiogenetischen Funktion von FGF2 erschwert (Javerzat et al., 2002).

Die proangiogenetische Wirkung von FGF2 ist mehr als eine proliferative, so gibt es zunehmend den Verdacht, dass FGF2 in vitro in 3D-Kollagen-Sproutingassays die Tubulogenese über Apoptose regelt (Matsumoto et al., 2002).

### 1.3 Statine

#### 1.3.1 Funktion (Simvastatin, Fluvastatin, Cerivastatin)

Diese Arbeit behandelt nicht nur die Wirkung von FGF2 auf Endothelzellen, sondern vielmehr die Interaktion eines Wachstumsfaktors mit Statinen und deren Wirkung auf HUVECs. Insofern macht es Sinn, einen Überblick über die verwendeten Statine zu geben, um auf den Kontext der Fragestellung hinzuführen.

Die verwendeten Statine Simvastatin (1. Generation Statin), Fluvastatin und Cerivastatin (3. Generation Statin, höhere Hydrophilität), hemmen die HMG-CoA-Reduktase, welche aus HMG-CoA Mevalonat bildet und daher auch als erster Schritt des Mevalonatweg bezeichnet wird. Die HMG-CoA-Reduktase stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinbiosynthese dar, einer Enzymkaskade welche aus dem entstandenen Mevalonat in 18 weiteren Schritten den Weg zur Entstehung von Cholesterin bildet (Liao & Laufs, 2005).

Statine hemmen die HMG-CoA-Reduktase, indem sie reversibel an Seitenäste des aktiven Zentrums des Enzyms binden und die Substrat-Produkt-Transformation behindern (Istvan, Deisenhof 01). Ihre klinische Bedeutung gewannen Statine wegen ihrer Effekte auf den Fettstoffwechsel im Organismus, insbesondere das Herabsenken des systemischen LDL-Cholesterins (Robinson, Smith, Maheshwari, & Schrott, 2005). Weiter wegen der Erhöhung der Bioverfügbarkeit von NO jeder einzelnen Endothelzelle, durch Förderung der Expression der eNOS (Rikitake & Liao, 2005). NO schützt die Zellen vor oxidativem Stress durch oxidiertes LDL-

Cholesterin und Hypoxie welche zum Großteil für die endotheliale Dysfunktion verantwortlich sind (Liao & Laufs, 2005).

### 1.3.2 Die Pleiotropen Effekte der Statine

Seit einem Jahrzehnt entdecken prospektive Studien in Kombination mit Tierversuchen zusätzlich, dass Statine andere, so genannte pleiotrope Effekte haben, da sie nicht nur den Cholesterinlevel senken, sondern diverse kardiovaskuläre Risikofaktoren positiv beeinflussen, noch bevor ihre Cholesterinwirkung zu tragen kommt (Buhaescu & Izzedine, 2007) .

In mehreren Studien zeigte sich, dass der cholesterinsenkende Effekt der Statine nicht allein für deren kardio- und atheroprotektiven Charakter verantwortlich sein kann. Vergleicht man die dauerhaft gesenkten Cholesterinlevel von Statinen mit denen anderer cholesterinsenkender Pharmazeutika (Fibrate, Cholestyramin, Ezetimib), so war der protektive Effekt der Statine bei gleichniedrigem Cholesterinniveau um einiges stärker (Liao & Laufs, 2005). Diese Effekte wirken sich positiv aus auf atherosklerotische Risiken wie Entzündung, Immunmodulation, und Plaquestabilisation. Neuere Studien verweisen auch auf Verbesserung des Knochenmetabolismus und Demenzrisikos hin (Hillyard et al., 2007).

Alle durch Statine erzielten Effekte werden neben dem Senken des Cholesterinlevels somit als deren pleiotrope Effekte definiert. Die meisten dieser pleiotropen Effekte werden auf die Isoprenoidintermediate zurückgeführt (Buhaescu & Izzedine, 2007).

Abbildung 4. gibt einen Überblick der durch Studien belegten pleiotropen Effekte.

Table 1  
Pleiotropic effects of statins resulting from inhibition of the mevalonate pathway and their therapeutical implications

Pleiotropic effects of statins	Mechanism	Clinical studies	Comments
Improve endothelial function/stabilize the atherosclerotic plaque	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Inhibition of isoprenoids synthesis via inhibition of HMGR</li> <li>– Up-regulation of the endothelial nitric oxide (NO) synthase and NAD(P)H oxidase activity [76,77]</li> <li>– Regulation of the vascular smooth muscle cell migration [34] and proliferation [78]</li> <li>– Regulation of the cell cycle</li> <li>– Regulation of tissue plasminogen activator (tPA)/tPA inhibitor expression [79]</li> <li>– Inhibition of the expression of endothelin-1 and its vasoconstriction/mitogenic activities [80]</li> <li>– Increasing the collagen content/reducing metalloproteinase activity, decreasing lipid content, inflammation and cell death in atherosclerotic plaques [81]</li> </ul>	<p>Significant lipid lowering-independent protective effect in secondary prevention of cardiovascular events:</p> <p>MIRACLE [82] PROVE-IT [83] WOSCOPS [84]</p>	
Anti-inflammatory and immunomodulatory effects	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Reducing plasma concentrations of pro-inflammatory cytokines [85–88]</li> <li>– Decreasing the proliferative response of mononuclear cells [89]</li> <li>– Inhibition of leukocyte–endothelial cell adhesion by inhibition of geranylgeranylation of GTP-binding protein Rho [90,91]</li> <li>– Inhibition of interferon-<math>\gamma</math>-induced expression of major histocompatibility complex II molecules on human endothelial cells and macrophages [92–94]</li> <li>– Inhibition of T cells' activation [95]</li> </ul>	<p>Statins decrease CRP levels independently of the lipid lowering effect:</p> <p>CARE [96] PRINCE [97]</p> <p>The decrease in CRP level predict a better cardiac outcome, independent of the lipid-lowering effect of statins:</p> <p>AFCAPS/TexCAPS [98] PROVE-IT [99] REVERSAL [100]</p> <p>Statins as immunosuppressive drugs in heart transplantation: less severe coronary vasculopathy and less severe rejection episodes compared to placebo Kobashigawa et al. [101]</p>	
Effects on bone metabolism	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Stimulation of the production of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) [102,103]</li> <li>– Stimulation of osteoblast differentiation and activity [104,105]</li> <li>– Inhibition of osteoclast development [106,107]</li> </ul>	<p>Statins decrease the fracture risk</p> <p>Meier et al. [109] Chan et al. [108] Scranton et al. [110]</p>	<p>Controversial results of other studies, that found no beneficial effects of statins on fracture risk</p> <p>Reid et al. [111,112] Van Staa et al. [113]</p>
Anti-proliferative effects	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Inhibition of HMGR, with consecutive reduction of cellular pool of non-sterol isoprenoids FPP and GGPP</li> <li>– Inhibition of the isoprenylation of GTP-binding proteins Rho, Rac, Rab, Rap, Ras, responsible for important cell signaling in cell proliferation and migration [3,12,13]</li> <li>– Inhibition of tumor growth and differentiation [114]</li> </ul>	<p>Statins decrease the risk of different types of cancer</p> <p>Poynter et al. [115] Graaf et al. [116] Boudreau et al. [117]</p>	<p>Controversial results of other studies, that found an increased incidence of cancer in a population treated with statins (pravastatin) PROSPER [43]: significantly higher incidence of cancer (breast and gastrointestinal tumors) in the pravastatin group compared to placebo</p> <p>CARE [101]: increased incidence of breast cancer in the pravastatin group</p> <p>Controversial results of other studies, that found no effects of statins on cognitive function in patients with dementia PROSPER [43]</p>
Effects on risk of dementia	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Reducing <math>\beta</math>-amyloid formation and deposition [118]</li> <li>– Anti-inflammatory effects</li> <li>– Regulation of microglial activation [119]</li> </ul>	<p>Statins reduce the risk of developing dementia</p> <p>Jick et al. [120] Rockwood et al. [121] Wolozin et al. [122]</p> <p>Statins slow cognitive decline in mild to moderate Alzheimer's disease Sparks et al. [123]</p>	

Abbildung 4.: Pleiotrope Effekte der Statine (Buhaescu & Izzedine, 2007)

Neben den Isoprenoiden wird der Einbau von Rezeptoren und Signalmolekülen in cholesterinreiche Mikrodomänen, auch Lipid Rafts genannt, für die pleiotropen Effekte von Statinen verantwortlich gemacht (Hillyard et al., 2007). Ich möchte daher im nächsten Punkt näher auf diese eingehen.

#### 1.4 Lipid Rafts

Lipid Rafts, auch DRMs (Detergent resistant Membranes) genannt, sind dynamische Ansammlungen von Cholesterin, Sterolsphingolipiden und Proteinen, welche mit Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Ankern in der Zellmembran verankert sind. Obwohl deren genaue Zusammensetzung und Funktion noch nicht eruiert sind, stimmt die Forschung in der Annahme einer dynamischen transmembranären Plattform überein, deren chemoassoziative Funktion in Signalverkehr und Übermittlung besteht (Lingwood & Simons, 2010). Die dynamische Komponente erhalten sie nicht nur durch die sich räumlich verändernden Protein-Protein und Protein-Lipid-Interaktionen (Pike, 2006), sondern auch durch ihre zeitliche, sekundäre Zusammensetzung und Kristallinität im immerwährenden Fluss der Membran (Hanzal-Bayer & Hancock, 2007). Unter den genannten Proteinen befinden sich neben Membrantransportern auch Signal- und Rezeptormoleküle des Tyrosinkinasetyps, wie es zum Beispiel der FGF-Rezeptor ist. Auf Grund dieser funktionellen Moleküle sind Lipid Rafts beteiligt an Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose von Zellen, zu denen auch vaskuläre Endothelzellen zählen (P. L. Li, Zhang, & Yi, 2007).

Wie bereits erwähnt, beruht die Funktionalität der Lipid Rafts auf ihrer Zusammensetzung. So sorgt jene für Vernetzungen und Konformitätsänderungen von Fetten und dient somit der Aktivierung von Proteinen. Cholesterole stellen einen großen Bestandteil der Lipid Rafts dar, in denen sie für die Phasentrennung und die Verpackung von gesättigten Fetten sorgen (Dainese, Oddi, Bari, & Maccarrone, 2007). Unterbricht man also den Cholesterolhaushalt einer Zelle durch Statine oder MCD, stört man die Funktionalität der Lipid Rafts (Dainese et al., 2007).

Es befinden sich nicht nur Tyrosinkinasen, wie zum Beispiel der FGF-Rezeptor, in den Lipid Rafts, sondern auch HSPGs, welche FGF2 in hoher Affinität binden und dadurch die Rezeptoraktivierung verlängern, beziehungsweise verändern. Somit dient die Konzentration von HSPGs in den Lipid Rafts der Zelle der Steigerung der Sensitivität und Aktivität von Wachstumsfaktoren wie FGF2 (Chu, Buczek-Thomas, & Nugent, 2004).

## 1.5 Mevalonatweg

An weiteren Substanzen in dieser Arbeit wurde Mevalonat verwendet. Der Mevalonatweg dient der zellinternen Produktion von Sterolen wie Cholesterin, Steroidhormonen, Isoprenoiden und anderen Nicht-Sterol-Derivaten (Buhaescu & Izzedine, 2007). Statine hemmen die HMG-CoA-Reduktase, welche das geschwindigkeitsbestimmende Enzym dieses Mevalonatweges darstellt. Das Produkt der HMG-CoA-Reduktase ist Mevalonat. Gibt man also Mevalonat zu Statinen, sollte man deren cholesterinabhängige Wirkung umgehen. Des Weiteren wurden Farnesyl-Pyrophosphat (FPP) und Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP) verwendet, Zwischenprodukte des Mevalonatweges, welche zu den Isoprenoiden gezählt werden. Diese beiden Isoprenoide dienen der Prenylierung von G-proteinen der Ras-Familie und haben eine höhere Affinität zu Enzymen, die nicht die Cholesterinsynthese speisen (Faust, Brown, & Goldstein, 1980; Massy, Keane, & Kasiske, 1996). Die Prenylierung erhöht unter anderem die Membraninteraktion der G-proteine und dient somit letztendlich der intrazellulären Signalübermittlung und Stimulation von Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation und anderen Funktionen (Buhaescu & Izzedine, 2007). Gibt man also eines der beiden Isoprenoide zu Statinen hinzu, so umgeht man einen Teil der cholesterinabhängigen Wirkung der Statine und kann somit Rückschlüsse ziehen auf Teile deren Funktion.

## 1.6 Fragestellung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie verschiedene Statine die angiogenetische Wirkung von FGF2 auf Endothelzellen und den Einbau des FGF-Rezeptors in Lipid Rafts beeinflussen. Darüber hinaus sollen der Effekt von Statinen und FGF2 auf die Isoprenylierung im Hinblick auf pleiotrope Effekte untersucht werden.

## 2. EXPERIMENT

### 2.1 Material und Methoden

#### 2.1.1 Zellkultur

In den folgenden Abschnitten werden die Isolation, Identifikation und Kultivierung der humanen venösen Endothelzellen (HUVEC) nach dem Verfahren von Jaffe et al beschrieben (Jaffe, 1973).

##### 2.1.1.1 Zellisolation

Die bei meinen Versuchen verwendeten Nabelschnüre werden direkt nach der Abnabelung in ein steriles Gefäß gelegt und mit einer sterilen Kompresse gereinigt. Anschließend wird die Nabelschnur nach Perforationen untersucht, indem mittels einer Knopfsonde zweimal mit je 50 ml HEPES (PAA, Linz, Österreich) gespült wird. Erweist sich die Vene als Verletzungsfrei, kann sie am anderen Ende abgeklemmt werden. Jetzt wird sie mit 0,025 % Collagenaselösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefüllt und bei 37° C für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert, damit sich die Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVECs) aus ihrem Zellverband lösen und in Suspension gehen. Währenddessen wird zur Vorbereitung 1ml fetales Kälberserum (Biowest; Nuaille Frankreich) in ein 50 ml Röhrchen (Becton Dickinson, USA) gegeben. Nach der Inkubation wird die Nabelschnur mit 30ml HEPES ausgespült und die Suspension in das 50ml Röhrchen überführt. Das Röhrchen wird nun bei 1000 Umdrehungen/min, 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation saugt man den Überstand ab, das bodenständige Pellet wird nun mit 5ml Endothelzellenbasalmedium (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert. Das Medium wird zusätzlich mit folgenden Aliquots versetzt (alle Promo Cell, Heidelberg, Deutschland): 0,4% ECGS/H, Epidermal Growth Factor 0,1 ng/ml, Hydrocortison 1µg/ml, basic Fibroblast Factor 2 ng/ml, Amphotericin 50 ng/ml, Gentamycin 50 µg/ml und 2% FCS (PAA, Linz, Österreich). Zuletzt werden die Zellen auf eine mit 0,2 % Gelatine (Serva, Heidelberg, Deutschland) vorbeschichtete 25 cm<sup>2</sup> Plastik Kulturschale (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät. Die Zellen sind jetzt in Primärkultur.

### 2.1.1.2 Zellidentifikation

Die Identifikation der Zellen geschieht einerseits durch lichtmikroskopische Beurteilung und andererseits durch Zuhilfenahme von Immunfluoreszenz. Unter dem Lichtmikroskop bilden Endothelzellen einen kopfsteinplasterartigen Monolayer aus, der als „Cobblestone“-Phänomen beschrieben ist. Fibroblasten und Muskelzellen hingegen, die nicht erwünscht sind bilden spindelförmige sich überlappende Zellhaufen.

Zur Immunfluoreszenz werden die Zellen auf ein Deckglas ausgesät, kultiviert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Methanol fixiert. Endothelzellen sind die einzigen Zellen, die den Von Willebrand-Faktor exprimieren. Diese Eigenschaft nutzt man, um den Von Willebrand-Faktor mit einem Antikörper (Dakopatts GmbH, Hamburg, Deutschland) zu beschicken und diesen wiederum mit einem fluoreszierenden Antikörper gegen den Von Willebrand-Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-FITC; Dianova, Hamburg, Deutschland) zu binden. Im Fluoreszenzmikroskop lassen sich nun die Zellen leicht identifizieren und gegen andere abgrenzen.

### 2.1.1.3 Kultivierung

Die HUVEC in Primärkultur werden bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  in einem Brutschrank kultiviert. Wenn der einschichtige Zellverband (Monolayer) konfluierend zusammengewachsen ist (Zellrasen), werden die Zellen passagiert. Hierbei wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit HBSS (Hank's Balanced Salt Solution Cat. No H15-009, PAA Laboratories GmbH, Pasching A-4061, Austria ) von extrazellulärem Kalzium gereinigt. Danach werden die Zellen eine Minute mit 1,5ml Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Wenn sich die Zellen in beweglicher Kugelform unter dem Lichtmikroskop darstellen, sind sie komplett abgelöst. Die Wirkung der Trypsin-EDTA-Lösung wird nun mit 3ml Endothelzellenmedium abgestoppt. Danach überführt man die Zellen in ein 50ml Röhrchen (Becton Dickinson, USA) und zentrifugiert sie bei 1200 U/min für 5 min. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und das entstandene Pallet mit Endothelzellenmedium, inklusive 10% FCS, resuspendiert. Jetzt können die Zellen als Sekundärkultur in mit 0,2% Gelatine (Gelatin, SERVA, No.22151; D-69115 Heidelberg, Germany) beschichtete 10cm-Diameter-Kulturschalen (Falcon 353003)

bei einer Dichte von ungefähr  $3000/\text{cm}^2$  ausgesät werden. Alle 2-3 Tage wird das Medium der 10cm-Diameter-Kulturschalen gewechselt, indem man es absaugt und neues Endothelzellenmedium hinzugibt. Wenn die Zellen konfluent gewachsen sind, werden sie erneut wie beschrieben passagiert und gehen in die nächste Passage.

Zellmorphologie und Zelldichte werden täglich unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Sollte hierbei eine Kontamination auffallen, werden die Zellen verworfen.

## 2.1.2 Proliferation

### 2.1.2.1 Aussäen der Zellen

Zum Aussäen der Zellen werden 96-Well-Platten (Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen, Germany, No.655180) mit Gelatine beschichtet und bei  $37^\circ\text{C}$  20 min inkubiert. Hierbei werden die randständigen Wells ausgelassen, weil sie Ungenauigkeiten aufweisen, sodass sich ein Feld von  $6 \times 10$  Wells ergibt. Die Zellen werden wie beim Passagieren beschrieben mit HBSS gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung gelöst, zentrifugiert und mit Endothelzellenmedium resuspendiert. Jetzt wird mit der Neubauerzählkammer die Konzentration (Zellen/ml) bestimmt. Zu dem für die Aussaat vorbereiteten Endothelzellenmedium (2% FCS) wird dann ein Anteil der Zellsuspension pipetiert ( $100\mu\text{l}/\text{Well}$  entspricht  $6\text{ml}/\text{Platte}$  mal Anzahl der Platten). Der Anteil, dessen Leervolumen vorher vom Aussaatmedium abgenommen wurde entspricht einer Endkonzentration im Medium von  $1.000.000$  Zellen/ $10\text{ml}$ , was bei genauem Arbeiten mit steriler Multipette und Zellenwanne zu  $10.000$  Zellen/Well führt. Vor dem Beimpfen der Platten wird die Gelatine wieder abgesaugt. Die Aussaat wird unter dem Lichtmikroskop nach Homogenität überprüft und dann kommen die Zellen in den Brutschrank.

### 2.1.2.2 Stimulation

Nach 48 Stunden im Brutschrank werden die Zellen stimuliert. Hierzu werden einzelne Vials mit Endothelzellenmedium und den jeweiligen Stimulanzen vorbereitet. Anschließend wird das alte Medium Reihe für Reihe abgesaugt und neues Endothelzellenmedium mit Stimulanzen wieder aufpipetiert.

Im folgenden Abschnitt beschreibe ich den allgemeinen Ablauf meines Versuches. Mit der Proliferation sollte die Wirkung des Wachstumsfaktors FGF2 in Kombination mit verschiedenen Stimulanzen auf das Teilungs- und Wachstumsverhalten von HUVEC beurteilt werden. Zuerst wird eine Testreihe als Vorversuch mit steigenden Konzentrationen von FGF2 (Pepro Tech: Cat.No 100-18B, PeproTech GmbH; Winterhuder Weg 40; D-22085 Hamburg) angelegt, um die Konzentration mit dem stärksten proliferativen Effekt zu finden. Für die darauf folgenden Versuche wird FGF2 mit einer Konzentration von 50 ng/ml verwendet.

Im ersten Versuch werden einzeln die Statine Simvastatin (Calbiochem 567021), Fluvastatin (Calbiochem 344095) und Cerivastatin (Calbiochem; nicht mehr im Handel) (alle Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) mit ihrem antiproliferativen Effekt auf die Zellen untersucht und mit den Statinen + bFGF verglichen. Laut Literatur (Schaefer et al., 2004) werden Simvastatin und Fluvastatin mit 2µl/ml (= 2µM/l) und Cerivastatin mit 1µl/ml (= 1µM/l) verwendet, um den maximalen Hemmeffekt zu erreichen.

Kontrolle	Vs.	-
bFGF	Vs.	-
Simvastatin	Vs.	Kontrolle
Fluvastatin	Vs.	Kontrolle
Cerivastatin	Vs.	Kontrolle
Simvastatin	Vs.	Simvastatin + bFGF
Fluvastatin	Vs.	Fluvastatin + bFGF
Cerivastatin	Vs.	Cerivastatin + bFGF

Tabelle 1.: Proliferation, Statine und FGF2

Im zweiten Teil sollte die den Effekt der Statine aufhebende Wirkung von Mevalonat (=Mev; Mevalonic Acid Lactone: Sigma M-4667) untersucht werden und mit Statine + Mev + bFGF verglichen werden. Hierzu wird Mevalonat mit einer Konzentration von 5µl/ml verwendet. Mevalonat ist ein Zwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese und Produkt der HMG-CoA-Reduktase, welche durch Statine gehemmt wird. Der Effekt der Statine sollte sich somit aufheben lassen.

Kontrolle	Vs.	-
bFGF	Vs.	-
bFGF	Vs.	Mevalonat
Mevalonat + Simvastatin	Vs.	bFGF + Simvastatin + Mevalonat
Mevalonat + Fluvastatin	Vs.	bFGF + Fluvastatin + Mevalonat
Mevalonat + Cerivastatin	Vs.	bFGF + Cerivastatin + Mevalonat

Tabelle 2.: Proliferation mit Mevalonat

Als Drittes galt es, die Lipid Rafts mit MCD (Methyl- $\beta$ -cyclodextrin: Sigma C 4555) zu zerstören. MCD ist ein zyklisches Polysaccharid, welches Cholesterin in seiner hydrophoben Tasche chelatiert und es somit der Zellmembran entzieht (Chu et al., 2004). Der Wachstumsfaktor FGF2 sollte somit, wenn sein Rezeptor sich in den Lipid Rafts akkumuliert befindet, wenig bis keinen proliferativen Effekt nach MCD-stimulation mehr ausüben können.

MCD wird mit einer Endkonzentration von 10mM auf die Zellen pipetiert und eine halbe Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Hiernach sind die Lipid Rafts zerstört nicht jedoch die Zellmembran (Chen, Chen, Wang, & Tang, 2007). Anschließend werden die Wells abgesaugt und dreimal mit HBSS gewaschen, bevor das neue Medium mit Stimulanzien auf die Zellen kommt. Es werden MCD + Statine mit MCD + Statine und bFGF verglichen.

Kontrolle	Vs.	-
bFGF	Vs.	-
bFGF	Vs.	bFGF + MCD
MCD + Simvastatin	Vs.	bFGF + Simvastatin + MCD
MCD + Fluvastatin	Vs.	bFGF + Fluvastatin + MCD
MCD + Cerivastatin	Vs.	bFGF + Cerivastatin + MCD

Tabelle 3.: Proliferation mit MCD

Der vierte Versuchsteil sollte zeigen, ob FGF2 über Farnesyl-PP (Sigma F 6892) oder Geranylgeranyl-PP (Sigma: Deisenhofen, Germany, Cat. No.G 6025) prenyliert

wird und ob die Statine einen Einfluss darauf haben. Es werden jeweils Farnesyl-PP mit einer Konzentration von 4,34  $\mu\text{l/ml}$  und Geranylgeranyl-PP mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{l/ml}$  + Statine mit Farnesyl-PP/Geranylgeranyl-PP + Statine + bFGF verglichen.

Kontrolle	Vs.	-
bFGF	Vs.	-
bFGF	Vs.	bFGF + Farnesyl-PP
bFGF	Vs.	bFGF + Geranylgeranyl-PP
Farnesyl-PP + Simvastatin	Vs.	bFGF + Simvastatin + Farnesyl-PP
Farnesyl-PP + Fluvastatin	Vs.	bFGF + Fluvastatin + Farnesyl-PP
Farnesyl-PP + Cerivastatin	Vs.	bFGF + Cerivastatin + Farnesyl-PP
Geranylgeranyl-PP + Simvastatin	Vs.	bFGF + Simvastatin + Geranylgeranyl-PP
Geranylgeranyl-PP + Fluvastatin	Vs.	bFGF + Fluvastatin + Geranylgeranyl-PP
Geranylgeranyl-PP + Cerivastatin	Vs.	bFGF + Cerivastatin + Geranylgeranyl-PP

Tabelle 4.: Proliferation mit FPP/GGPP

Bei jedem Versuch laufen Vergleichskontrollen mit, um eine nicht erwartete Beeinflussung der Stimulanzien untereinander auszuschließen oder zu erkennen. Zusätzlich wird bei jedem Versuch eine Reihe (10Wells) mit 2% FCS und eine Reihe mit 50ng/ml bFGF als 0- bzw Positivkontrolle aufgeführt.

#### 2.1.2.3 Messung der Exstinktion mit dem TecanGenios

Nach dem Stimulieren werden die Zellen 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird der Metabolismus der Zellen, also ihre Teilungsfähigkeit, mit 30 $\mu\text{l}$  Glutaraldehyd 5,5% (Gillies, Didier, & Denton, 1986) gestoppt. Glutaraldehyd verlinkt die Kollagene und führt so zu einer Stilllegung der metabolischen Prozesse (Cheung & Nimni, 1982). Es wird unter einem Laborabzug auf das Medium pipetiert

und die Platten werden 30 min lang auf eine Schüttelplatte gestellt. Nun da die Zellen miteinander verklebt und fest auf dem Boden der Wells sesshaft sind, wird das Medium im Sonderabfall entsorgt und die Platten wie beschrieben dreimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen und mehrere Stunden zum schonenden Lufttrocknen auf Tücher ausgelegt (Gillies et al., 1986). Als Nächstes werden 100µl von 1mM Kristallviolettlösung (Neissers Lösung Ib (Kristallviolett) 109239, Merck GKaA, Darmstadt, Germany) in die Wells gegeben und die Platten wieder 30min auf die Schüttelplatte gestellt, danach wieder dreimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Kristallviolett, dessen Affinität mit steigendem pH-Wert steigt, färbt die Nuklei der Zellen bläulich (Kueng, Silber, & Eppenberger, 1989).

Zum eigentlichen Messvorgang werden die am Boden der Wells sitzenden, gefärbten Zellen mit 100µl 10%er Essigsäure zerstört und in Lösung gebracht (Kueng et al., 1989). Die Platten werden einzeln mit Essigsäure beimpft und zur Exstinktionsmessung in den Genios (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Österreich) gestellt. Der Genios ist ein Plattenlesegerät, das unter anderem auch zur Exstinktionsmessung eingesetzt werden kann. Die Exstinktion wird bei einer Wellenlänge von 590nm gemessen, welche die spektralgrößte Genauigkeit für Kristallviolett ist. Das Genios ist so programmiert, dass es die Platten 30 Sekunden lang zur Homogenisierung der Flüssigkeit rüttelt und anschließend zwei Durchgänge mit drei Messungen pro Well durchführt und die Ergebnisse in Excel ausgibt. Die so gemessene Exstinktion entspricht dann der Menge an Zellen, die im Well waren (Gillies et al., 1986; Kueng et al., 1989).

Der Exstinktionswert (E) wurde dann mit dem der Kontrolle (K) verglichen und in einen %-Wert umgerechnet  $E(\%) = K/E \times 100$ .

### 2.1.3 Migration

Mit diesem Verfahren sollte das Migrationsverhalten der HUVEC und die Beeinflussung durch Stimulanzen dargestellt werden.

#### 2.1.3.1 Aussäen der Zellen

Als Erstes wird in jedes Well der 12-Well-Platten (Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen, Germany, No.665180) ein kleiner Silikonquader eingesetzt, der ein Areal mit geraden Rändern aus dem Zellrasen aussparen soll. Nun werden die Zellen wie bei der Proliferation bereits beschrieben mit einer Dichte von 100.000/Well bei 2% FCS ausgesät und 48 Stunden lang im Brutschrank inkubiert.

#### 2.1.3.2 Stimulation

Zunächst werden die Silikonquader mit einer sterilen Pinzette gezogen. Nun wird unter einem Mikroskop bei 4-facher Vergrößerung der Raum zwischen den beiden geraden Rändern dreimal auf  $\mu\text{m}$  genau ausgemessen, ein Mittelwert gebildet und ein Bild davon im Computer gespeichert. Dieser Wert, der für jedes Well einzeln erstellt wird, gilt später als Referenzwert (A) im Vergleich zur Migration nach Stimulation (E). Zugleich werden die Zellen auf Wachstum und Homogenität überprüft. Nun werden die Wells wie bei der Proliferation bereits beschrieben mit 1ml Stimulanzienmedium beimpft. Auf jeder Platte wurde eine 2% FCS 0-Kontrolle miterstellt und bei jedem Versuch eine Positivkontrolle mit 20% FCS und FGF2 erstellt. Anschliessend wird wieder 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

#### 2.1.3.3 Messung

Zur Auswertung wird wieder ein Bild gemacht und der Zwischenraum erneut mehrfach ausgemessen, wodurch sich ein Mittelwert (E) ergibt. Die Strecke der Migration (M) einer Seite ist somit die Hälfte der Differenz der beiden Mittelwerte,  $M(\mu\text{m})=(A-E)/2$ . Die Werte der Migration (M) werden anschließend in %-Werte der Kontrolle (K) umgerechnet,  $M(\%) = K/M \times 100$ .

## 2.2 Statistik

In der Statistik wird mit einem nonparametrischen Kurskal-Wallistest der Unterschied bzw. die Variation zwischen Gruppen analysiert und anschließend jede Gruppe mit den anderen durch einen post-hoc Tukey-Test verglichen.(SPSS for Windows) Die Ergebnisse werden als %-Wert der Kontrolle mit dazugehörigem

SEM angegeben. Die Signifikanzen werden mit  $P \leq 0.05$ , 0.01 und 0.001 auf signifikant, hoch und sehr hoch signifikant festgelegt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Proliferation

Im Experimentalteil wurden der genaue Versuchsaufbau und sein zeitlicher Ablauf beschrieben, nun will ich die Ergebnisse darstellen und erläutern.

##### 3.1.1 Messreihen und Kontrollen

Es ist das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Statinen auf die angiogenetische Wirkung von FGF2 zu zeigen. FGF2 dient als Wachstumsfaktor, der die Angiogenese in Endothelzellen im Sinne von Migration und Proliferation anregt. Der proliferative In-vitro-Effekt der so erzeugt wird, soll im weitesten Sinne die Zellwucherung der Endothelzellen bei der Entstehung eines arteriosklerotischen Plaques mimen.

Als Erstes galt es eine Dosisreihe auszutesten, um die Konzentration zu finden, bei der der größte Effekt mit minimalstem Verbrauch erzielt wird. Diese Konzentration war in unserem Labor bereits bekannt (50ng/ml; (Kuhlmann et al., 2004)), jedoch war der Versuchsaufbau mit den 96-Well-Platten neu, so musste bei optimaler Zellkonzentration (10000/well) die Dosisreihe erneut erstellt werden. Es stellte sich jedoch auch eine Konzentration von 50ng/ml als sinnvoll heraus.

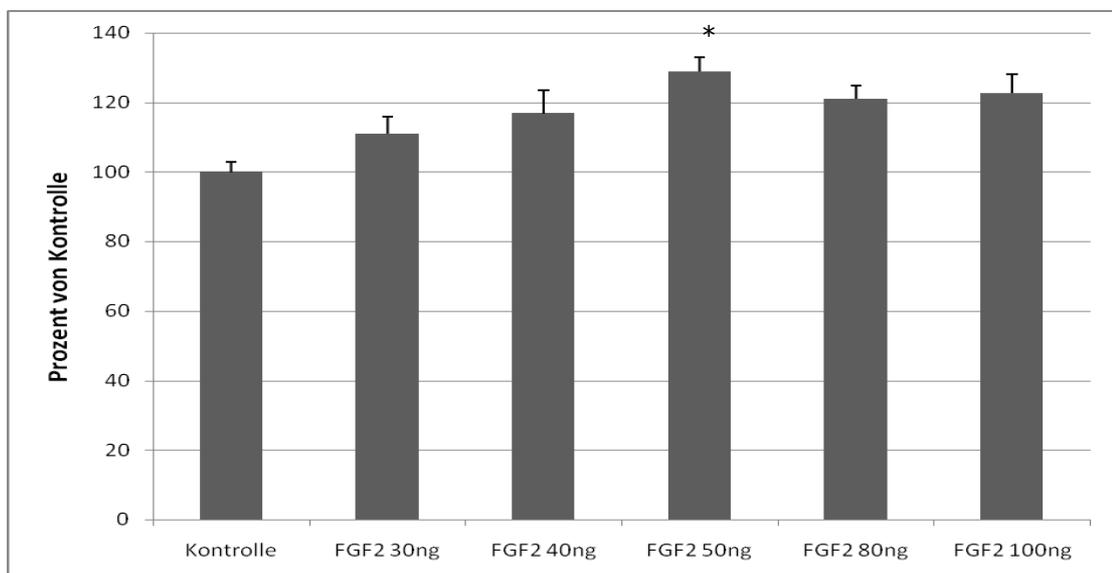


Tabelle 5.: FGF2 Messreihe: Signifikant: \* vs. Kontrolle. Als Kontrolle wurden immer 10.000 Zellen/Well mit 2% FCS verwendet. Alle Ergebnisse sind angegeben als Prozentmittelwert + Prozent SEM von Kontrolle. Man kann anhand des Grafen ersehen, dass bei 50ng die maximale Proliferation durch FGF2 erreicht ist. Durch mehr Stimulans lässt sich keine weitere Wirkung mehr erzielen.

In den Aliquots die zu dem basalem Zellmedium gegeben wurden sind geringe Mengen FGF2 (1ng/ml) enthalten, ich entschloss mich diesen Störfaktor auch auszutesten und fand keine abweichenden Ergebnisse.

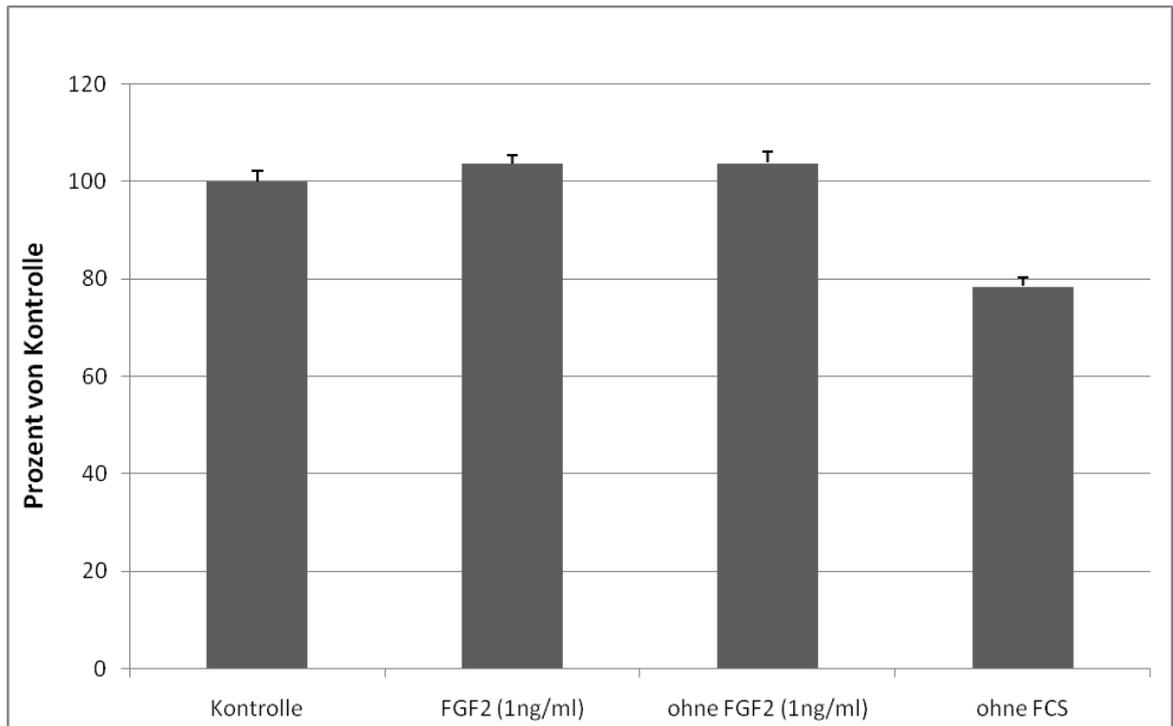


Tabelle 6.: Kontrolle gegen Basalzellmedium mit FGF2 (1ng/ml), ohne FGF2 (1ng/ml) und ohne FCS aufgeführt. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen, welche mit basalem Zellmedium stimuliert wurden, und denen, worin das enthaltene FGF2 entfernt wurde. Lässt man das FCS ganz weg, kommt es zum Verhungern der Zellen.

### 3.1.2 Statine und FGF2

Als Nächstes galt es, die Wirkung der Statine (Simvastatin, Fluvastatin, Cerivastatin) auf die Proliferation der Endothelzellen zu überprüfen und deren Effekt auf die Wirkung von FGF2.

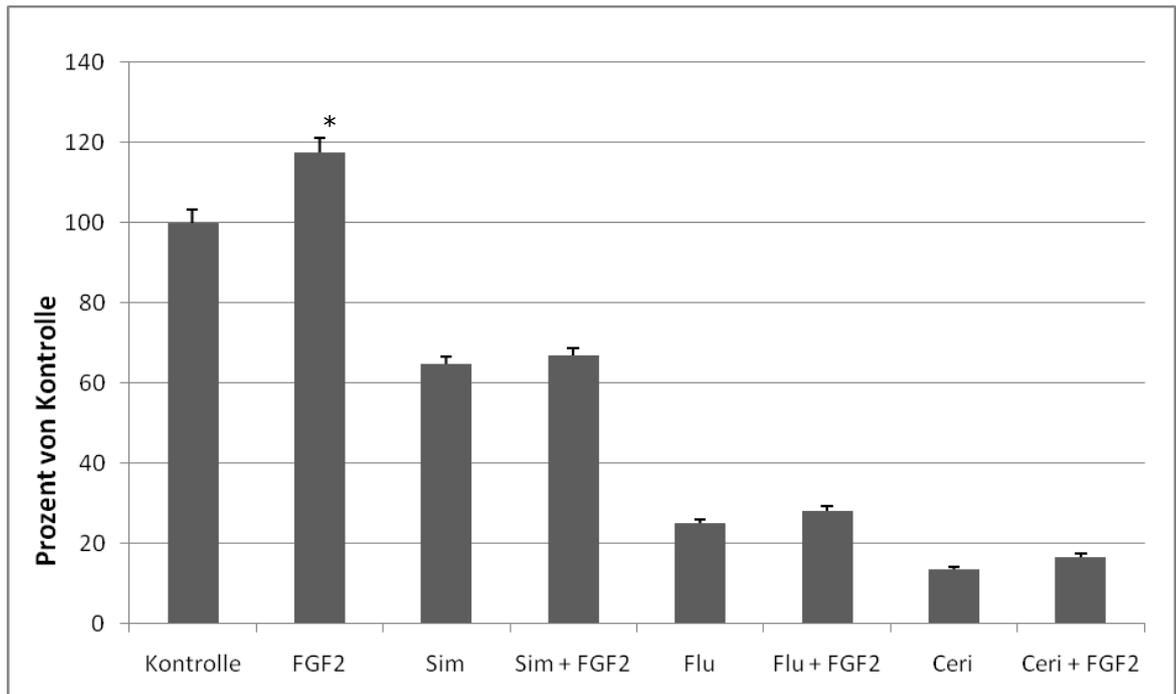


Tabelle 7.: Ergebnisse Proliferation Statine und FGF2: Signifikant: \* vs. Kontrolle. Die Signifikanzen wurden als Gruppen mit einem nonparametrischen Kurskal-Wallistest und einzeln gegeneinander mit einem post-hoc Tukey-Test erstellt. In der Grafik erkennt man einen signifikanten proliferationsfördernden Effekt von FGF2. Zusätzlich zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Statinen, wenn diese Zellen zusätzlich mit FGF2 stimuliert werden.

Anhand der Grafik ist zu erkennen, dass Statine die Proliferation von HUVECs in verschieden starker Ausprägung hemmen. Simvastatin hemmt die Proliferation signifikant, Fluvastatin sogar noch stärker. Am stärksten wirkt Cerivastatin. Der hemmende Effekt der Statine wird bei gleichzeitiger Stimulation mit FGF2 nicht signifikant aufgehoben. Im Umkehrschluss heben Statine somit den proliferativen Effekt von FGF2 auf.

### 3.1.3 Mevalonat

Als Nächstes galt es zu bestätigen, dass die Wirkung der Statine wieder aufgehoben werden kann durch Umgehung der HMG-CoA-Reduktase. Hierzu verwendete ich Mevalonat, das Produkt dieses Enzyms. Auf der Suche nach den pleiotropen Effekten wollte ich herausfinden, ob diese von der Hauptwirkung der Statine auf die Cholesterinbiosynthese oder den Nebenprodukten des Mevalonatwegs abhängen oder nicht. Lässt sich die Statinwirkung mit Mevalonat wieder reversieren, so gilt diese

Hypothese als bestätigt. Weiter galt es herauszufinden, ob FGF2, das auf statinstimulierte Zellen keinen Effekt hat, durch Mevalonat wieder wirksam wird. Hierzu wurden Statine + Mevalonat mit FGF2 + Statine + Mevalonat verglichen.

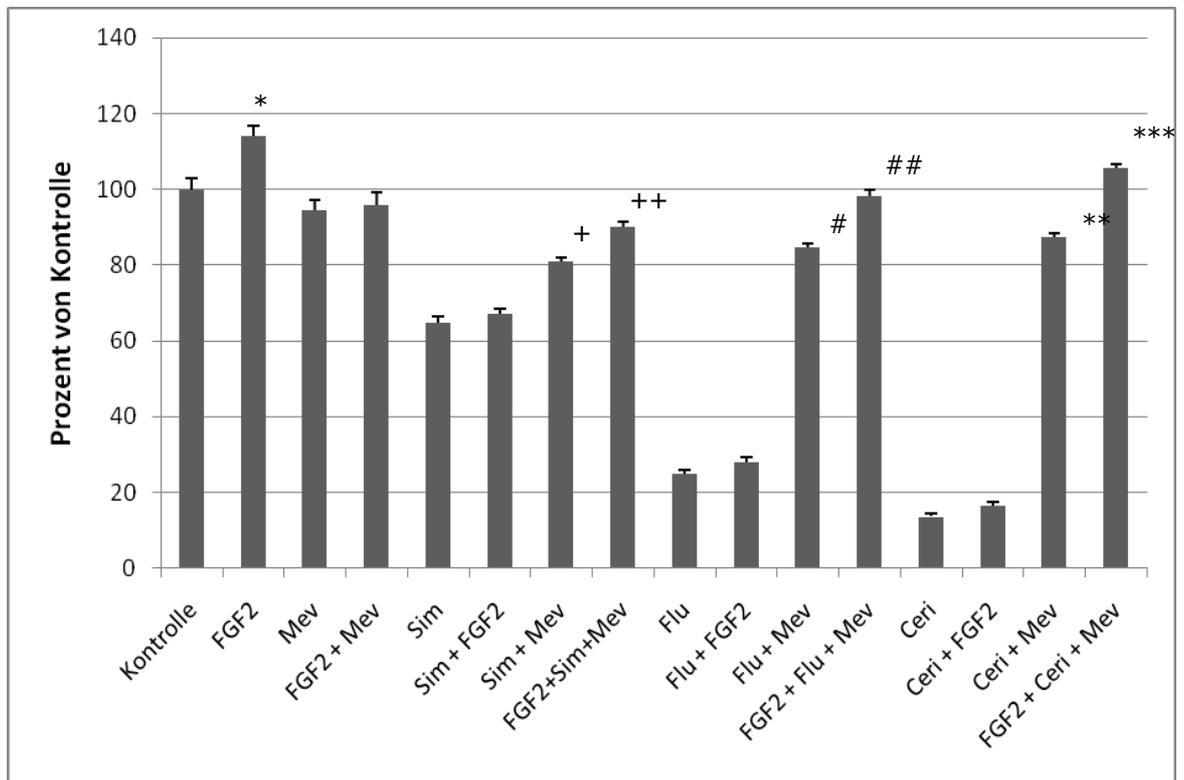


Tabelle 8.: Ergebnisse Proliferation Mevalonat: Signifikant: \* vs. Kontrolle, + vs. Sim, ++ vs. Sim+Mev, # vs. Flu, ## vs. Flu+Mev, \*\* vs. Ceri, \*\*\* vs. Ceri+Mev. Mevalonat alleine und in Kombination mit FGF2 hat keinen Einfluss auf die Proliferation, jedoch hebt es den Effekt der Statine wieder auf. Gibt man weiters FGF2 hinzu, erzielt man wieder einen proliferativen Effekt.

Es ist zu erkennen, dass Mevalonat im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation hat. Auf mevalonatstimulierte Zellen hat FGF2 auch keinen proproliferativen Effekt mehr (FGF2 vs FGF2+MEV). Betrachtet man den Einfluss von Mevalonat auf simvastatinstimulierte Zellen (Sim vs Sim+Mev), so fällt auf, dass die Wirkung von Simvastatin wieder signifikant aufgehoben wird. Durch Zugabe von FGF2 lässt sich die Proliferation wieder signifikant verstärken. (Sim+Mev vs. Sim+Mev+FGF2). Die gleichen Beobachtungen gelten auch für fluvastatin- und cerivastatinstimulierte Zellen, jedoch ist hier der Mevalonateffekt noch stärker ausgeprägt. Bei der Flu+Mev+FGF2-Stimulation wird der Statineffekt

wieder vollständig aufgehoben. In der Ceri+Mev+FGF2 vs Mev Stimulation überschreitet der Wert (105% von Kontrolle) die Wirkung von Mevalonat alleine signifikant.

### 3.1.4 MCD

Im nächsten Versuch sollte das Vorhandensein und die Funktionalität der Lipid Rafts untersucht werden. Lipid Rafts sind cholesterinreiche Domänen in der Membran der Endothelzellen, welche durch MCD zerstört werden können (Lingwood 2009; 2010).

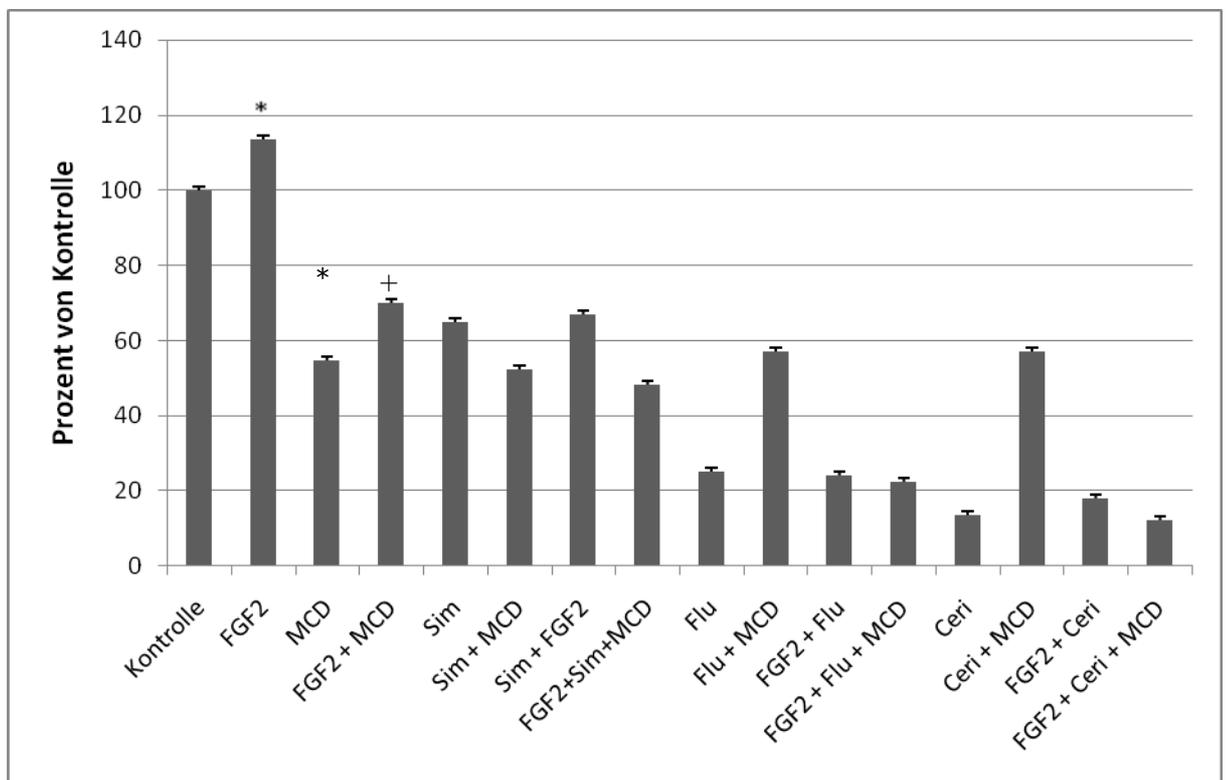


Tabelle 9.: Ergebnisse Proliferation MCD: Signifikant: \* vs. Kontrolle, + vs. MCD. MCD zerstört membrangebundenes Cholesterin und hemmt somit die Proliferation, was gleichzeitig die Wirkung der Statine signifikant stört. Durch FGF2 lassen sich MCDstimulierte Zellen wieder zur Proliferation anregen, jedoch nicht, wenn sie vorher mit Statinen inkubiert wurden, welche das zellinterne Cholesterin beeinflussen.

Es ist zu erkennen, dass MCD die normale Proliferation hoch signifikant hemmt. Dennoch hat FGF2 einen signifikanten Effekt auf MCD-stimulierte Zellen (MCD vs. MCD+FGF2).

Kombiniert man Simvastatin mit MCD wird die Proliferation nicht signifikant gehemmt.

FGF2 hat auf die Sim+MCD-stimulierten Zellen keinen weiteren Effekt. Bei Fluvastatin und Cerivastatin stört bzw. hemmt MCD deren antiproliferative Wirkung. Auch hier hat FGF2 keinen weiteren Einfluss auf die mit Statinen+MCD+FGF2 stimulierten Zellen.

### 3.1.5 Isoprenoide

In hoher Dosierung, welche in den Versuchen vorliegen, blockieren Statine nicht nur die Cholesterinbiosynthese, sondern auch dessen Nebenprodukte, die Isoprenoide. Jetzt wollte ich herausfinden, welches der beiden Isoprenoide einen weiteren Effekt in HUVECs erzielt und ob FGF2 diesen Effekt beeinflussen kann.

#### 3.1.5.1 FPP

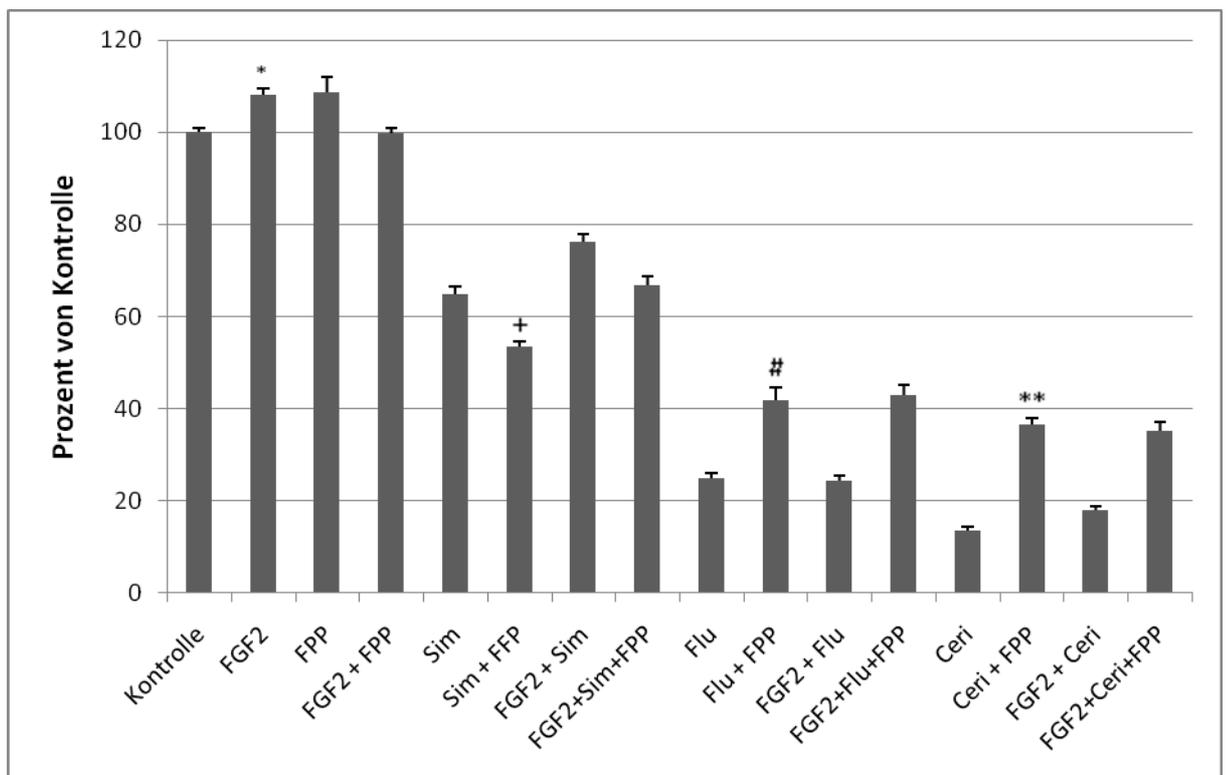


Tabelle 10.: Ergebnisse Proliferation FPP: Signifikant: \* vs. Kontrolle, + vs. Sim, # vs. Flu, \*\* vs. Ceri. FPP alleine und mit FGF2 hat keinen Effekt auf die Proliferation. Zudem hat FPP eine störende Wirkung auf den Statineffekt, dieser lässt sich durch FGF2-Hinzugabe auch nicht weiter verändern.

In der Abbildung ist zu erkennen, dass FPP keinen signifikanten Einfluss auf die Kontrolle oder die Wirkung von FGF2 hat. Bei FPP in Kombination mit Simvastatin ist ein signifikanter Unterschied zu erkennen, jedoch nur von 10%. Werden die Zellen neben Simvastatin mit FPP und FGF2 stimuliert, so ist kein signifikanter Unterschied zu der Simvastatinwirkung alleine zu erkennen. Auf Fluvastatin und Cerivastatin hat FPP auch eine leicht (20%) störende Wirkung. Werden die statinstimulierten Zellen mit FPP und FGF2 beimpft, so lässt sich keine Wirkung von FGF2 feststellen (Stat+FPP+FGF2 vs Stat+FPP).

### 3.1.5.2 GGPP

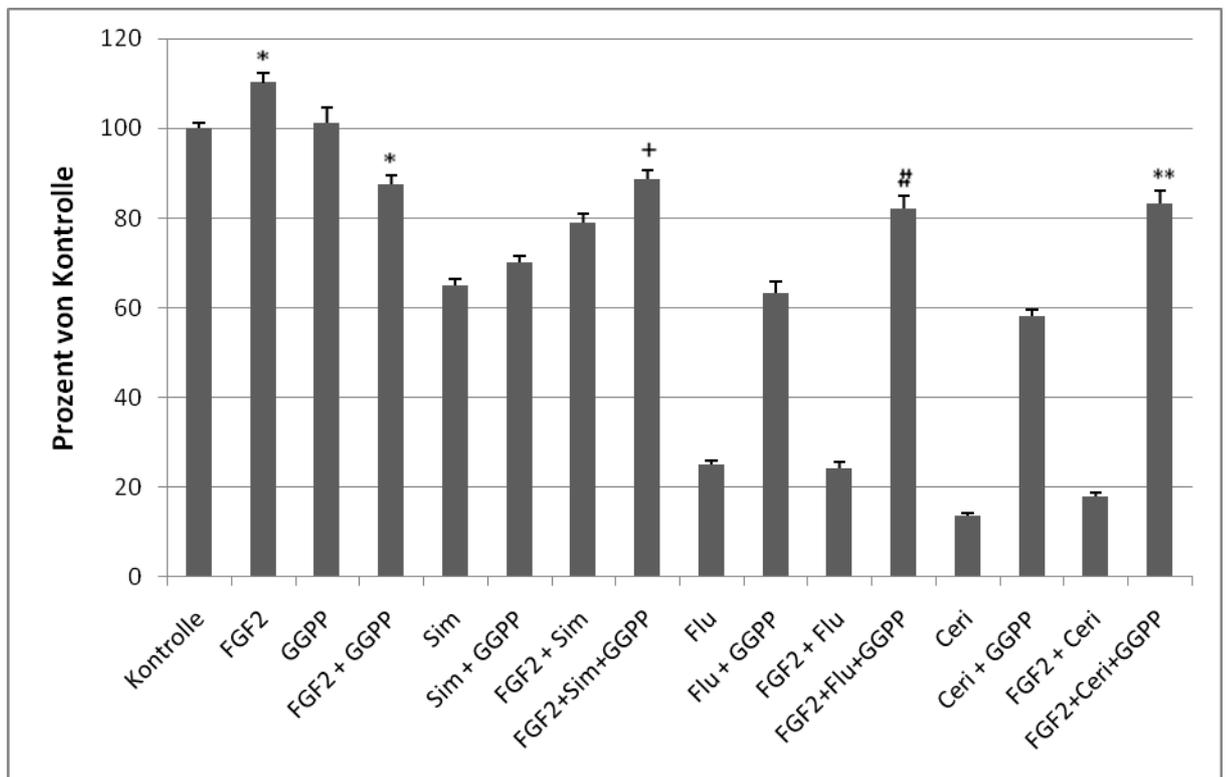


Tabelle 11.: Ergebnisse Proliferation GGPP: Signifikant: \* vs. Kontrolle, + vs. Sim+GGPP, # vs. Flu+GGPP, \*\* vs. Ceri+GGPP. GGPP alleine hat keinen Einfluss auf die Proliferation und einen störenden, kompetitiven Effekt auf die FGF2-Wirkung. In Kombination mit Statinen hebt GGPP deren Wirkung signifikant auf. Diese Zellen lassen sich zusätzlich durch FGF2 zur Proliferation anregen.

GGPP hat keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation im Vergleich zur Kontrolle und einen hemmenden Einfluss auf die FGF2-Wirkung. GGPP und FGF2 kompetieren also um die selben Produkte oder Enzyme.

Auf Simvastatin zeigt GGPP keinen Einfluss, jedoch hat FGF2 einen proliferativen Einfluss auf Sim+GGPP+FGF2 (Sim+GGPP vs. Sim+GGPP+FGF2). Die proliferationshemmende Wirkung von Fluvastatin und Cerivastatin wird durch GGPP um mehr als den doppelten Ausgangsprozentwert sehr hoch signifikant aufgehoben (Stat+GGPP vs. Stat). GGPP und FGF2 in Kombination heben den Effekt der Statine Fluvastatin und Cerivastatin wieder vollständig auf (Stat+GGPP+FGF2 vs. FGF2+GGPP).

### 3.2 Migration

In der Migration wurden die gleichen Konzentrationen wie bei der Proliferation verwendet, jedoch wurden zusätzlich 20% FCS Kontrollen mit ausgeführt, um eine hochpositive Wachstumskontrolle zu haben.

#### 3.2.1 Statine und FGF2

Auch in der Migration sollte der Effekt der Statine bewiesen und Unterschiede aufgezeigt werden.

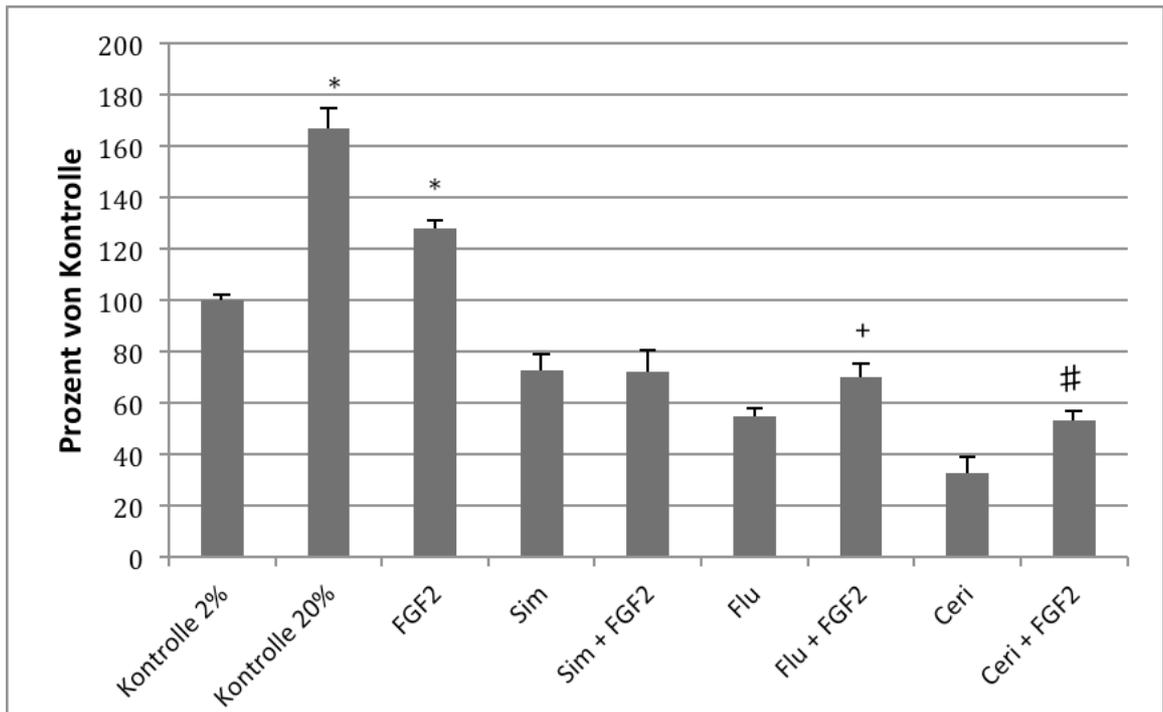


Tabelle 12.: Migration Statine und FGF2: Signifikant: \* vs. Kontrolle, + vs. Flu, # vs. Ceri. Migration mit Kontrolle 2%, als Positivkontrolle 20%, FGF2 und Statine in Kombination. Es zeigt sich, dass FGF2 auf statin-stimulierte Zellen keinen bzw. nur einen leichten promigrativen Effekt hat.

Parallel zur Proliferation regt FGF2 in der Migration das Wachstum an und verstärkt das natürliche Migrationsverhalten. Auf die Kontrolle mit 20% FCS reagieren die Zellen noch stärker als auf den Wachstumsfaktor FGF2. Anders als bei Geweben oder Organen, welche stark durch nervale und humorale Stimuli beeinflusst werden können, wirken Nährstoffe auf einzelne Zellen immer noch als stärkster Antrieb zum Wachstum.

Die Statine zeigen eine migrationshemmende Wirkung, welche von Simvastatin über Fluvastatin zu Cerivastatin zunimmt. Der Unterschied der Statine ist jedoch nicht so stark wie in der Proliferation ausgeprägt. Auch in der Migration hemmen Statine den Effekt von FGF2, jedoch kann FGF2 bei Fluvastatin und Cerivastatin noch einen signifikanten Unterschied erzielen. Dieser promigrative Effekt ist jedoch nur leicht ausgeprägt und hebt die Wirkung der Statine nicht annähernd auf.

### 3.2.2 Mevalonat

Mevalonat umgeht die HMG-CoA-Reduktase und soll somit die Wirkung und das Vorhandensein von pleiotropen Effekten der Statine in der Migration untersuchen.

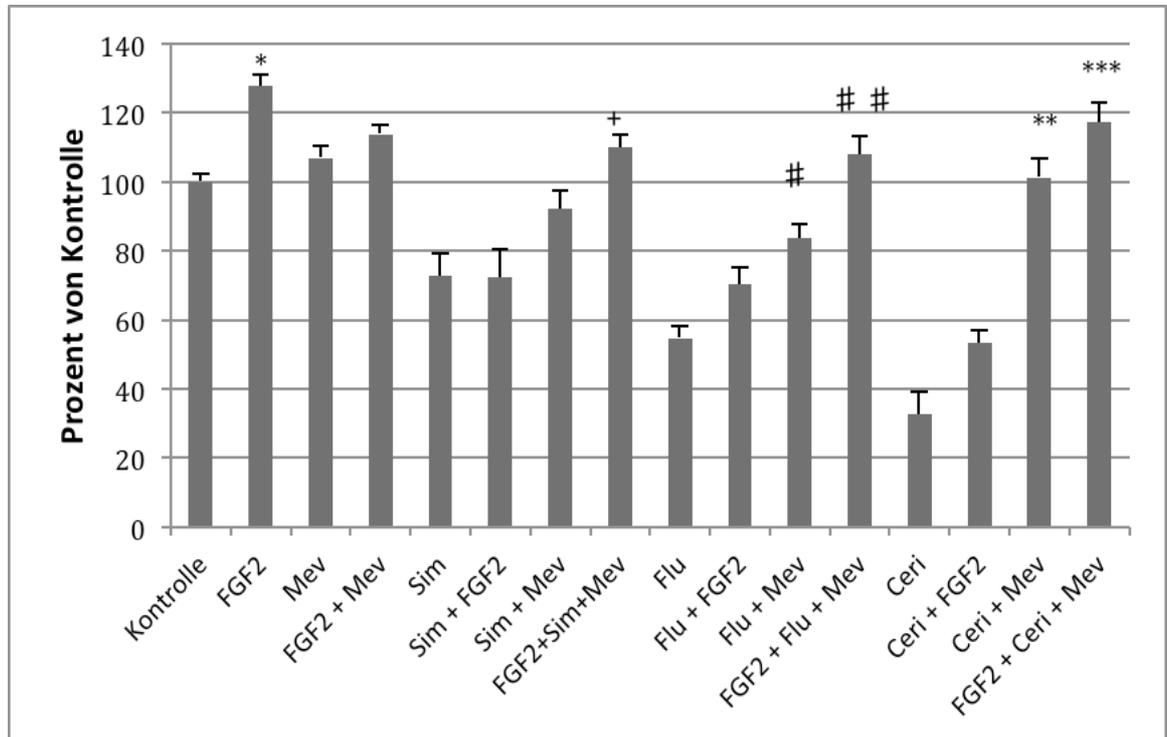


Tabelle 13.: Ergebnisse Migration Mevalonat: Signifikant: \* vs. Kontrolle, + vs. Sim+Mev, # vs. Flu, ## vs. Flu+Mev, \*\* vs. Ceri, \*\*\* vs. Ceri+Mev. Mevalonatversuche dienen der Umgehung oder als Bypass der HMG-CoA-Reduktase, gezeigt werden soll der Einfluss der Statine auf dieses Enzym und die Wechselwirkung mit FGF2, wenn das Enzym umgangen wird. So hebt Mevalonat die Statinwirkung wieder auf und gibt FGF2 die Möglichkeit, die Migration weiter zu verstärken. Bei allen drei Statinen zeigt sich das selbe Muster in Abhängigkeit von dem Statineffekt.

Mevalonat alleine hat keinen signifikanten Einfluss auf die Migration (Kontrolle vs. Mev). Auch in Verbindung mit FGF2 stellt sich kein signifikanter Unterschied heraus (Mev vs. FGF2+Mev). In Kombination mit Simvastatin hat Mevalonat keinen signifikanten Einfluss, jedoch in Kombination auf Fluvastatin (hoch signifikant) und Cerivastatin (sehr hoch signifikant). Bei allen drei Statinen hat FGF2 wieder einen promigrativen Effekt, wenn mit Mevalonat kostimuliert wurde (Stat + FGF2 + Mev vs Stat). Der Mevalonat-Effekt hebt die jeweilige Statinwirkung sogar vollständig auf ( Stat + FGF2 + Mev vs. FGF2 + Mev = kein Unterschied). Es ist ein

gleiches Reaktionsmuster zwischen den Statinen in diesem Versuch zu erkennen.

### 3.2.3 MCD

Zerstört man das membranständige Cholesterin durch MCD, so beeinflusst man die Zusammensetzung der Membran, insbesondere die cholesterinhaltigen Lipid Rafts. Durch Zugabe von Statinen kann man zusätzlich die Neubildung von Cholesterin verschieden stark beeinflussen. Einzeln und in Kombination lässt sich damit etwas über die Funktionalität und Integration des FGF2-Rezptors in den Lipid Rafts und deren Rolle in der Migration aussagen.

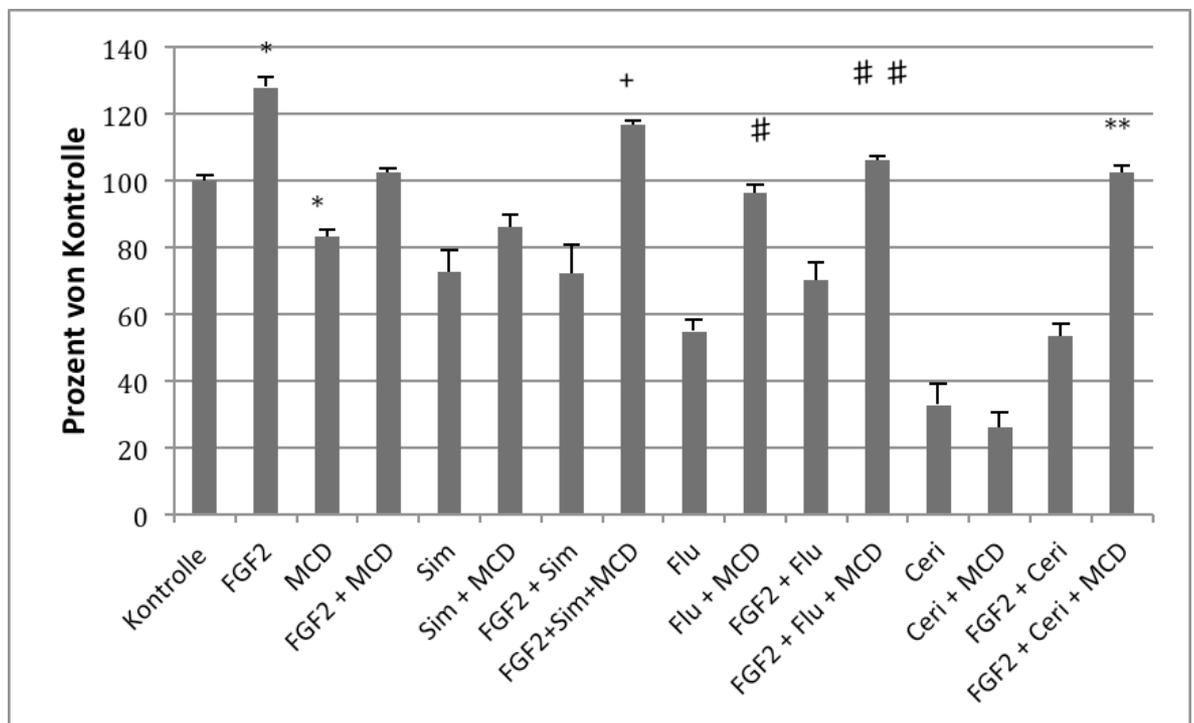


Tabelle 14.: Ergebnisse Migration MCD: Signifikant: \* vs. Kontrolle, + vs. Sim+MCD, # vs. Flu, ## vs. Flu+MCD, \*\* vs. Ceri+MCD. In den MCD-Versuchen wird das membranständige Cholesterin und die darin enthaltenen Lipid-Rafts zerstört. Wie zu erwarten hemmt MCD die Migration. Weiters ist zu erkennen, dass MCD die Statine in ihrer Wirkung hemmt bzw. stört. Der promigrative Effekt von FGF2 scheint nicht stark durch MCD beeinflusst zu sein.

MCD hemmt die Migration sehr hochsignifikant. In Kombination mit FGF2 wird dieser Effekt wieder aufgehoben (Kontrolle vs FGF2+MCD = keine Signifikanz). In Kombination mit Statinen hemmt bzw. stört MCD deren Wirkung. Kostimuliert man

Zellen mit Simvastatin+MCD, so stellt sich kein signifikanter Unterschied heraus (MCD vs Sim+MCD = kein Unterschied). Gibt man FGF2 hinzu, erreicht man wieder einen promigrativen Effekt mit sehr hoher Signifikanz.

Auf Fluvastatin hat MCD einen hemmenden Einfluss (Flu vs Flu+MCD). Kombiniert man Flu+MCD mit FGF2, erreicht man eine signifikante Zunahme der Migration (Flu+MCD vs. Flu+MCD+FGF2 = signifikant).

Bei Cerivastatin stellt sich wie bei Simvastatin kein Unterschied zwischen Ceri und Ceri+MCD heraus. Bei Zugabe von FGF2 wird die Cerivastatinwirkung vollständig sehr hoch signifikant aufgehoben (Cer+MCD+FGF2 vs MCD+FGF2).

### 3.2.4 FFP

Um die pleiotropen Effekte der Statine genauer zu untersuchen, verwendete ich FFP und GGPP. Es galt herauszufinden auf welches der beiden Isoprenoide die HUVECs in der Migration ansprechen und ob es Unterschiede bei den Statinen und deren Effekte gibt. Als erstes verwendete ich FFP.

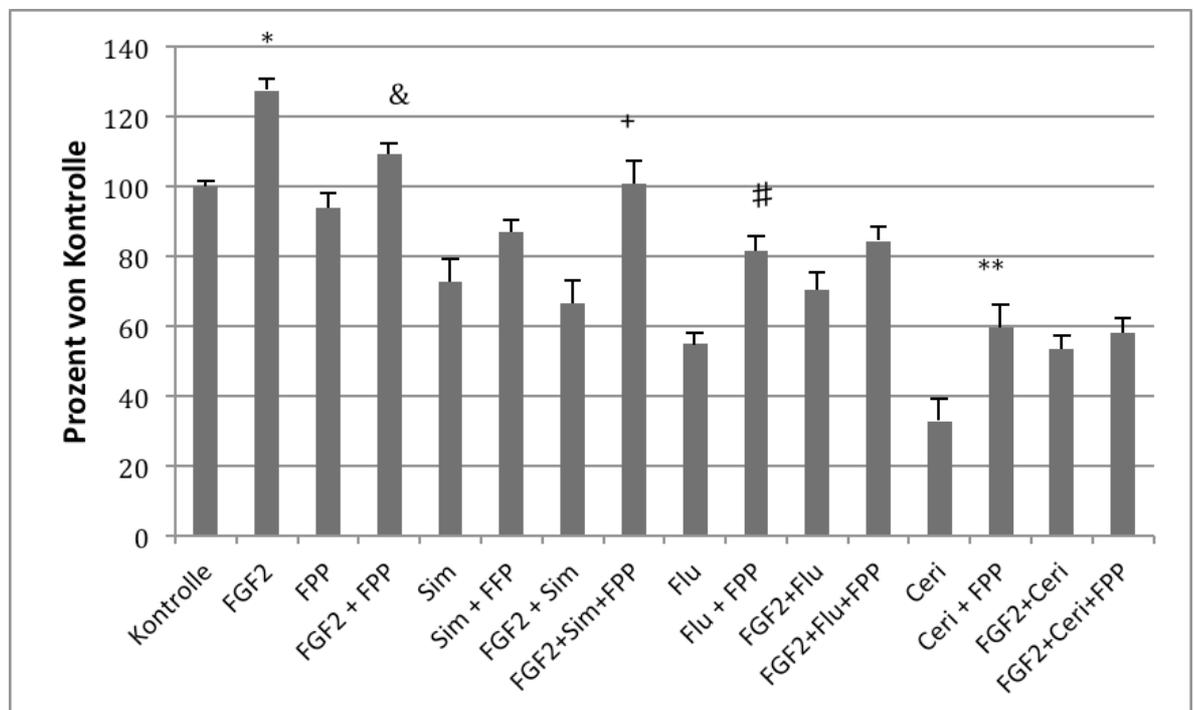


Tabelle 15.: Ergebnisse Migration FFP: Signifikant: \* vs. Kontrolle, & vs. FPP, + vs. Sim+FPP, # vs. Flu, \*\* vs. Ceri. FFP hat keinen Einfluss auf die Migration oder den promigrativen Effekt von FGF2. Die hemmende Wirkung aller drei Statine wird durch FFP gestört bzw. teilweise aufgehoben. In

Kombination mit FGF2 ergibt sich kein eindeutiger Trend.

FPP alleine hat keinen Einfluss auf die Migration (Kontrolle vs FPP). FGF2 hat einen signifikant promigrativen Einfluss auf FFP. In Kombination mit Simvastatin hat FPP keinen Einfluss, gibt man FGF2 hinzu, so wird der Simvastatineffekt wieder signifikant aufgehoben (Sim+FFP vs Sim+FFP+FGF2). Kombiniert man Fluvastatin mit FPP, so ergibt sich eine hochsignifikante Störung der Fluvastatinwirkung (Flu vs. Flu+FFP). Durch Hinzugabe von FGF2 lässt sich kein signifikanter Effekt erzielen. Cerivastatin wird signifikant durch FPP in seiner Wirkung gestört, ein Effekt, der durch FGF2 nicht weiter fortgesetzt werden kann.

### 3.2.5 GGPP

Als Nächstes verwendete ich GGPP als Isoprenoid, um es FPP gegenüberzustellen und seinen Einfluss auf Statine, FGF2 und die Migration zu untersuchen.

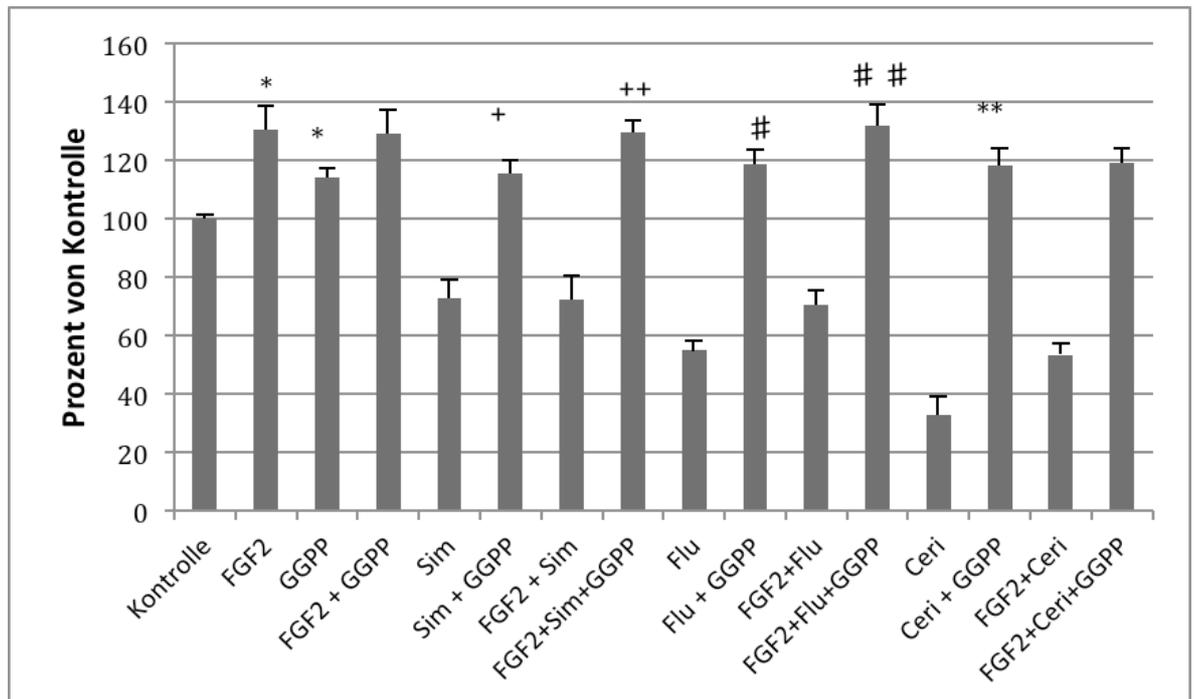


Tabelle 16.: Ergebnisse Migration GGPP: Signifikant: \* vs. Kontrolle, + vs. Sim, ++ vs. Sim+GGPP, # vs. Flu, ## vs. Flu+GGPP, \*\* vs. Ceri. GGPP wirkt alleine schon promigrativ. FGF2 verstärkt diesen Effekt. Die Wirkung der Statine wird signifikant vollständig aufgehoben. FGF2 kann seine normale Wirkung vollständig ausüben bei Sim und Flu. Bei Ceri ist kein signifikanter Effekt mehr zu erzielen.

GGPP alleine ist bereits hoch signifikant promigrativ, ein Effekt, der durch FGF2 noch signifikant verstärkt wird. Die Wirkung von Simvastatin wird durch GGPP hoch signifikant aufgehoben (Sim vs Sim+GGPP). In Kombination mit FGF2 kann der volle FGF2-Effekt zum Tragen kommen (FGF2 vs Sim+GGPP+FGF2). Auch auf Fluvastatin hat GGPP eine hochsignifikante migrative Wirkung und auch hier lässt sich durch FGF2 noch eine signifikante Migrationszunahme erzielen. Cerivastatin wird durch GGPP bereits vollständig aufgehoben (Kontrolle vs Ceri+GGPP kein Unterschied). Durch FGF2 lässt sich kein weiterer migrativer Effekt mehr erzielen.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Ergebnisse versus Literatur

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, wie Statine die angiogenetische Wirkung von FGF2 auf Endothelzellen beeinflussen. Um dies zu tun, galt es die Effekte der Statine und FGF2 auf die Isoprenylierung zu testen. Ich möchte nun die gewonnenen Ergebnisse diskutieren und im Licht der vorhandenen Literatur betrachten.

Atherogenese ist ein multifaktorielles Geschehen aus zu hohen Blutfetten, Entzündung und Wachstum von Zellen und Geweben. Statine sind seit langem bekannte Pharmazeutika, welche diesen Effekt durch Senkung des LDL-Cholesterin im Blut positiv beeinflussen (Chopra V., 2007). Sie entwickeln jedoch eine Reihe von pleiotropen Effekten, noch zum Teil bevor ihre cholesterinsenkende Wirkung zum Tragen kommt (Liao & Laufs, 2005). Neben dem Vermindern des oxidativen Stresses, der Entzündung (größtenteils Makrophagen- und T-Zell-Aktivierung) und der Thrombusentstehung (Liao, 2005), beeinflussen sie die Angiogenese. Die Angiogenese hat einen großen Anteil bei der Modellierung der Atherome, welche für die gefährlichste Komplikation, die Plaqueruptur, verantwortlich gemacht werden (Vincent et al., 2001). Zur Hemmung der Atherosklerose und der damit verbundenen Angiogenese werden Statine in hohen Dosen eingesetzt. Im Körper werden therapeutische Dosen von Statinkonzentrationen von 0.002 bis 0.1  $\mu\text{M/l}$  gefunden. In vitro wirken Statinkonzentrationen von 0.005 bis 0.05  $\mu\text{M/l}$  proangiogenetisch über die Aktivierung von Epidermalen Progenitorzellen (=EPC) und darüber hinaus angiostatisch (Park et al., 2002; Vincent et al., 2001). Ich verwendete daher Konzentrationen von 1 $\mu\text{M/L}$ , um den angiostatischen Effekt zu untersuchen. Es ist jedoch zu bedenken, dass in vivo die Konzentrationen auch auf angiogenetische Werte abfallen können.

Ein weiterer Faktor, der bei der Verwendung von Statinen zu bedenken ist, ist ihre Lipophilie. Ältere Statine wie Simvastatin sind lipophiler als spätere Generationen wie Fluvastatin und Cerivastatin. Als Resultat haben diese eine längere

Halbwertszeit. Je lipophiler ein Pharmakon ist, umso besser ist seine Penetration in die einzelnen Zellen. Im Vergleich dazu sorgt die Pharmakokinetik und längere Halbwertszeit bei den weniger lipophilen für eine stärkere Wirkung in der Leber, also wird im höheren Ausmaß das extrazelluläre Cholesterin beeinflusst. Diese Eigenschaft der unterschiedlichen Statine könnte deren Wirkort, aber auch ihre pleiotropen Effekte ausmachen oder beeinflussen. Bei kontroverser Studienlage wollte ich darum die Effekte bei hoher Dosis auf HUVECs untersuchen, da die Lipophilie nicht alleine ausschlaggebend scheint (Liao, 2002).

#### 4.1.1. FGF2-Effekt

Wie im Ergebnisteil bereits beschrieben, verwendete ich FGF2 mit einer Konzentration von 50ng/ml, wobei das im Basalzellmedium enthaltene FGF2 von 1ng/ml keinen weiteren Einfluss hatte. Es stellte sich eine signifikante Proliferations- und Migrationsverstärkung durch FGF2-Hinzugabe heraus. Wie bereits bekannt, konnte ich diesen Effekt bestätigen und für HUVECs auf 96-Well-Platten anwenden (Presta 2005; Murakami 2008). Als Nächstes wollte ich herausfinden wie Statine die Wirkung von FGF2 beeinflussen.

#### 4.1.2. Statine und FGF2

Wie zu erwarten, hemmen die drei Statine Proliferation und Migration signifikant, wobei Simvastatin die schwächste Wirkung hat und Cerivastatin die Stärkste. Inkubiert man die Zellen simultan mit FGF2, würde man eine Steigerung der Proliferation erwarten. Dieser Effekt tritt allerdings nicht ein. Die Statine haben somit einen hemmenden Einfluss auf die proliferative Wirkung von FGF2 (Seelenmeyer et al., 2008). Bei der Migration zeigt sich bei Hinzugabe von FGF2 auf Fluvastatin- und Cerivastatinstimulierte Zellen ein kleiner (+10%), aber signifikanter promigrativer Effekt. Zusammenfassend ist jedoch ein migrationshemmender Effekt der Statine bei HUVECs wie bereits für HMECs bekannt zu verzeichnen (Asakage et al., 2004; Vincent et al., 2002). Für Cerivastatin war die Hemmung der Proliferation und Migration in Kombination mit FGF2 schon bekannt (Seelenmeyer et al., 2008), jedoch nur für sehr geringe Probezahlen (n=5) und in überphysiologischen Konzentrationen (10ng/ml Cerivastatin). Insgesamt zeigt sich, dass durch die

Hemmung der zellinternen Cholesterinbiosynthese durch Statine die angiogene Wirkung von FGF2 unterdrückt bzw. gehemmt wird.

Auf Grund ihrer antiangiogenen Wirkungen auf die Proliferation und Migration wurden Statine in hohen Dosen auch schon als Anti-Tumor-Mittel vorgeschlagen (Asakage et al., 2004).

#### 4.1.3. Mevalonat

Mevalonatversuche dienen der Umgehung oder als Bypass der HMG-CoA-Reduktase; gezeigt werden soll der Einfluss der Statine auf dieses Enzym und die Wechselwirkung mit FGF2, wenn das Enzym umgangen wird. Durch Mevalonat lässt sich die antiproliferative Wirkung der Statine wieder aufheben.(Buhaescu & Izzedine, 2007; Schaefer et al., 2006) Für Cerivastatin und Atorvastatin wurde dieser Effekt mit HMVECs in vivo und in vitro bereits bewiesen (Weis, Heeschen, Glassford & Cooke, 2002). Der Effekt der Statine beruht also zum Großteil auf deren Wirkung auf die zellinterne Cholesterinsynthese. Bei hoher Konzentration hemmen Statine die Proliferation und Migration von HUVECs (Weis et al., 2002). Mevalonat und FGF2 in Kombination beeinflussen sich nicht gegenseitig, es kommt zu keiner Substrathemmung. Zusätzlich lassen sich diese Zellen wieder zu verstärkter Proliferation durch FGF2 anregen. In der Migration hebt Mevalonat den Statineffekt sogar wieder vollständig auf, wie bereits aus in vivo Studien und Wundheilungsassays bekannt.(Vincent et al., 2001) Der FGF2-Effekt ist also abhängig vom Vorhandensein von Cholesterin und dessen Vorstufen in den Zellen. Um herauszufinden, ob es sich um zytoplastisches oder membrangebundenes Cholesterin handelt, verwendete ich MCD im nächsten Versuch.

#### 4.1.4. MCD

##### 4.1.4.1 FGF2-Beeinflussung

Die MCD-Versuche galten zwei verschiedenen Fragestellungen. Einmal sollte das Vorhandensein und die Funktionalität der Lipid Rafts untersucht werden. Lipid Rafts sind cholesterinreiche Domänen in der Membran der Endothelzellen. Sie stellen zeitlich inkongruente funktionelle Einheiten dar, die unter anderem Rezeptoren wie

den FGF-Rezeptor beherbergen (Lingwood, Kaiser, Levental, & Simons, 2009; Pike, 2006).

Durch MCD wurde die Proliferation stark eingeschränkt; die Zerstörung der membranständigen Lipid Rafts beeinträchtigt also das Proliferationsverhalten der Endothelzellen. In Kombination mit Fluvastatin und Cerivastatin stört MCD deren Effekt, was wahrscheinlich auf eine gestörte Aufnahme zurückzuführen ist.

In der Migration stört MCD wieder den Effekt von Fluvastatin, jedoch diesmal nicht von Cerivastatin. Die Arbeitsgruppe von Vincent et al. (Vincent et al., 2001) fand für Cerivastatin heraus, dass es nur auf chemotaktisch oder angiogenetisch (z.B. FGF2) stimulierte Zellen einen antimigrativen Effekt hat. Obwohl sich in meiner Arbeit dieser Effekt bei der Proliferation nicht darstellt, lässt sich die Cerivastatinwirkung auf die Migration durch MCD nicht abschwächen.

Als Zweites galt es herauszufinden, ob durch die Zerstörung des Cholesterin in der Membran und den membranständigen Lipid Rafts der FGF2-Effekt über Störung der Lokalisation des FGF-Rezeptors stattfindet. Inkubiert man die Zellen mit MCD für 30 Minuten, so zerstört man das membraninterne Cholesterin und somit die vorhandenen Lipid Rafts (Chen et al., 2007). Setzt man die Zellen zusätzlich unter hohe Konzentrationen von Statinen, so stoppt man die interne Cholesterinsynthese und unterbindet die Neubildung von Lipid Rafts (Dainese et al., 2007).

Für glatte Muskelzellen und Oligodendrozyten war bereits bekannt, dass durch MCD oder Filipin die Bindung von FGF2 an die Zellen bei gleichbleibender HSPG-Konzentration in der Membran bis um das Fünffache reduziert wurde (Chu et al., 2004). So korreliert die Konzentration von FGF-Rezeptoren und HSPGs in den Lipid Rafts mit der Wahrscheinlichkeit und Dauer der Stimulans-Rezeptor-Assoziation und erhöht somit die FGF2 Wirkung (Chu et al., 2004).

FGF2 hatte keinen proproliferativen Effekt mehr auf MCD+Statin-stimulierte Zellen. Die Zerstörung der Lipid Rafts hat somit einen negativen Einfluss auf die FGF2-Wirkung. Wird die zellinterne de-novo-Synthese des Cholesterins und damit der

Lipid Rafts jedoch zusätzlich durch Statine gestoppt, so hat FGF2 keinen Effekt mehr. Der FGF-Rezeptor ist somit mit den Lipid Rafts assoziiert. Da Statine die Isoprenylierung und damit die Membranlokalisation von Enzymen hemmen, lässt sich folgern, dass der FGF2-Effekt direkt durch die Rezeptorlokalisation und indirekt durch Membranlokalisation von Enzymen, die in der FGF2-Kaskade benötigt werden, gehemmt wird.

#### 4.1.4.2. Statine & MCD

Zum anderen wollte ich herausfinden, ob die pleiotropen Effekte von Statinen vielleicht durch die Lipid Raft-Störung zustande kommen und nicht durch Hemmung der Isoprenylierung. Die Isoprenoide prenylieren Proteine und sorgen so dafür, dass diese in die Membran eingebaut werden. Zerstört man die Lipid Rafts, welche der Ort für den Einbau von Proteinen sind, könnte man etwas über die von den Isoprenoiden ausgelösten pleiotropen Effekte und deren Mechanismus aussagen (Melkonian, Ostermeyer, Chen, Roth, & Brown, 1999).

Zusätzlich können Enzymkaskaden auch rückwärts ablaufen; gibt man Mevalonat oder Isoprenoide auf statinstimulierte Zellen, so kann aus den Isoprenoiden auch Cholesterin produziert werden was für die Lipid Rafts benötigt wird. Gleichzeitig lässt sich im Vergleich veranschaulichen, ob Statine mehr über Senkung des Serumcholesterin oder des intrazellulären Cholesterins wirken (Hillyard et al., 2007).

In meinen Ergebnissen zeigt sich, dass MCD die hemmende Wirkung der Statine stört. Indem man verhindert, dass Cholesterin in die Membran eingelagert wird, dass sich Lipid Rafts in der Membran formen oder bestehende zerstört werden, hat man einen Einfluss auf die Statinwirkung oder deren Aufnahme in die Zelle. Die antiproliferative Wirkung der Statine hängt unter anderem vom Vorhandensein und der Zusammensetzung von membrangebundenem Cholesterin ab. Ähnliche Ergebnisse bestanden bereits für NK-Zellen mit Simvastatin und Fluvastatin (Hillyard et al., 2007).

FGF2 hat in der Migration einen wesentlich stärkeren Effekt auf statinstimulierte Zellen als in der Proliferation, bis hin zur signifikanten Zunahme durch FGF2. Der FGF2-Effekt hat also einen größeren Einfluss auf die Migration als die Proliferation.

Dieser Eindruck wird dadurch verstärkt, dass MCD keinen Einfluss auf FGF2 hat und somit das membrangebundene Cholesterin bzw. die Lipid Rafts nicht alleine oder nur gering für die FGF2-Wirkung verantwortlich sind. Obwohl die Lipid Rafts zerstört sind und die intrazelluläre Cholesterinbildung gehemmt ist, erreicht FGF2 einen wachstumsfördernden Effekt. Ob dieser Effekt auf der Störung der Statinfunktion durch MCD beruht oder sich auf noch vorhandene Produkte der Cholesterinbiosynthese bezieht, wollte ich in meinen Versuchen mit den Isoprenoiden FPP und GGPP herausfinden.

#### 4.1.5 Statine und ihr Effekt auf Isoprenoide

Bevor ich die Ergebnisse meiner Versuche mit Statinen diskutiere, möchte ich eine theoretische Einführung geben.

Die meisten ihrer pleiotropen Effekte erreichen die Statine, indem sie die Endothelzellen anregen zur NO-Produktion, welche autokrine und parakrine Wirkung hat (Liao & Laufs, 2005; Wang, Liu, & Liao, 2008). Ich möchte nun im Detail erklären, wie dieser Effekt zustande kommt, um damit die Fragestellung mit Hilfe meiner gewonnenen Ergebnisse genauer zu beleuchten.

Die HMG-CoA-Reduktase macht aus Acetyl-CoA Mevalonat und stellt damit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinsynthese dar. Mevalonat wird nun einerseits über Squalene zu Cholesterol umgebaut und andererseits in Isopentyl-Pyrophosphat (=Isopentyl-PP) verwandelt. Isopentyl-PP kann weiter durch die Farnesyl-PP-Transferase zu Farnesyl-PP, einem C15-Körper, umgebaut werden (Liao & Laufs, 2005). Farnesyl-PP kann weiter durch die Geranylgeranyl-PP-Transferase zu Geranylgeranyl-PP, einem C20-Körper umgebaut werden (X. Li et al., 2002). Beide Moleküle dienen der Isoprenylierung von Proteinen, mit denen sie einen Cystein-Thioesterkomplex am Carboxylende der Proteine formen (X. Li et al., 2002). Dieser Lipidanhang am Cysteinterminus dient einer Vielzahl von Proteinen und deren posttranslationaler Modifikation, unter anderem der  $\gamma$ -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen wie Heme-A, nukleären Laminen und kleinen GTP-bindenden Proteinen (=GTPasen) (Rikitake & Liao, 2005). Zu diesen GTPasen zählen Ras, Rho, Rab, Ral und Rap, wobei Ras durch FPP isoprenyliert wird und die

anderen, wie zum Beispiel Rho, durch GGPP (Liao & Laufs, 2005). Im Falle der G-Proteine dient die Isoprenylierung der Relokalisierung vom Zytosol in die Membran und überführt sie somit aus einem inaktiven zytosolischen Zustand in einen aktiven membrangebundenen (Endres & Laufs, 2004). Hierdurch werden spezifische lipidunlösliche Peptide in die Zellmembran eingebaut und funktionalisiert (Hillyard et al., 2007), so aktiviert FPP Ras.

Ras regt den Zellzyklus an und fördert Wachstum und Proliferation unter anderem durch Aktivierung der MAP-Kinase (Liao & Laufs, 2005).

Im Vergleich dazu regt GGPP die Rho-GTPasen an, zu denen RhoA, Rac und Cdc42 zählen.

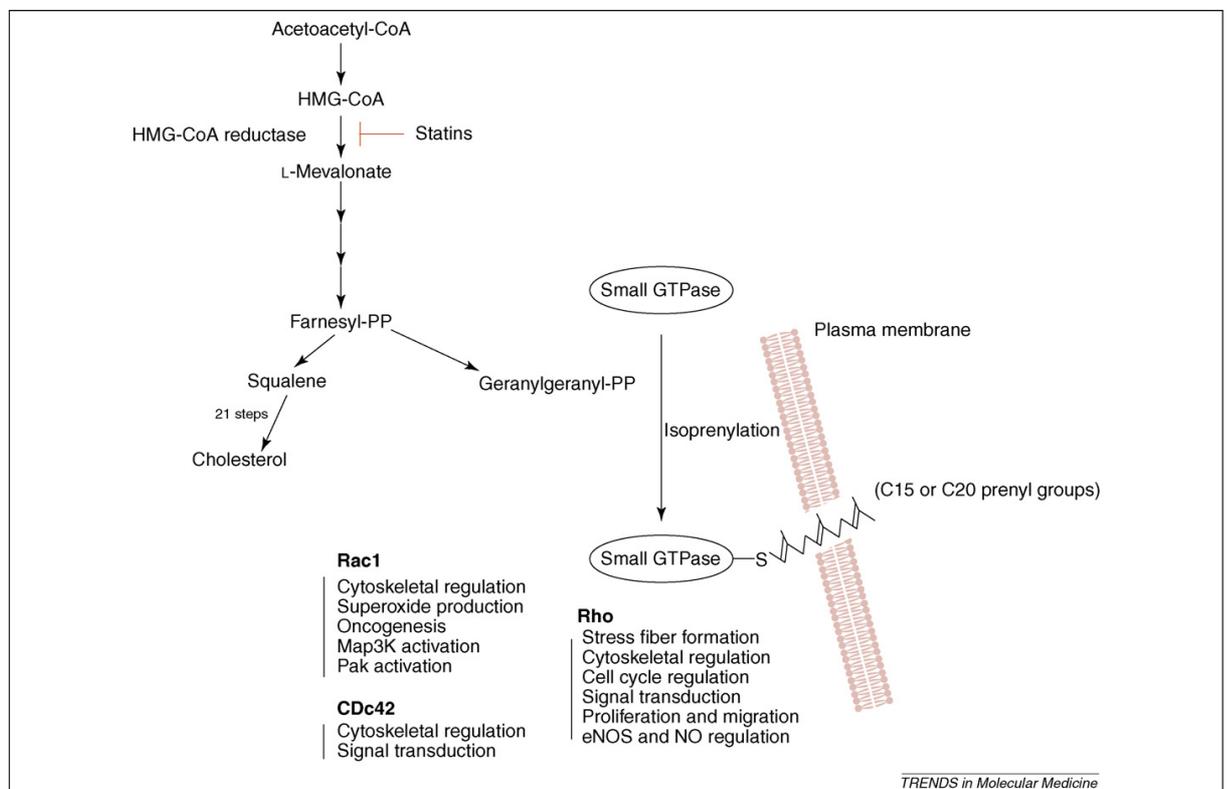


Abbildung 5.: Aktivierung kleiner G-Proteine durch Isoprenoide (Wang et al., 2008).

RhoA wiederum aktiviert Rho-Kinasen (ROCKs), welche einen doppelten Einfluss auf NO zu haben scheinen (Liao & Laufs, 2005). Einmal aktivieren sie MLC-Phosphatasen, welche das Aktinzytoskelett, auch "Stress-Fibres" genannt, negativ beeinflussen (Somlyo, 2002). Das Aktinzytoskelett dient unter anderem der Bindung, dem Transport und der subzellulären Lokalisierung diverser m-RNAs (Endres & Laufs, 2004). Durch diese Reorganisation von mRNAs wird die Halbwertszeit

verlängert, wie zum Beispiel die der eNOS (Gelosa et al., 2007). Da RhoA die Bildung des Aktinzytoskeletts hemmt, wirkt es sich negativ auf die Expression der eNOS aus, ein Effekt, der durch Statingabe unterbunden werden kann (Gelosa et al., 2007; Rikitake & Liao, 2005). Längere Halbwertszeit der mRNA der eNOS führt zu mehr Gentranslation und effektiv zu mehr produziertem NO, welches Großteils für die bereits aufgeführten Effekte der Gefäßrelaxation, Plättchenaggregation, SMC-Proliferation und Endothel-Leukozyten-Interaktion verantwortlich ist (Liao & Laufs, 2005).

Zum anderen hemmt RhoA über ROCKs die Phosphorylierung und damit Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt (PI3-Akt-Kaskade). Hierdurch werden ROCKs ein negativer Effekt auf die eNOS-Aktivität zugesprochen (Kureishi et al., 2000). Ein weiterer schnell zu reversierender Effekt (15min, (Skaletz-Rorowski A, 2004), der bereits durch geringe Dosen von Statinen erreicht werden kann, ist die direkte Aktivierung der PI3-Akt-Kaskade (Gelosa et al., 2007; Ii & Losordo, 2007). In geringen Dosen aktivieren Statine die PI3-Akt-Kaskade direkt und umgehen somit den RhoA-Zyklus. Die PI3-Akt-Kaskadenaktivierung ist mit Lipid Rafts assoziiert und kann durch vorherige Beladung der Endothelzellen mit Cholesterin oder Zerstörung der vorhandenen Lipid Rafts unterbunden werden (Skaletz-Rorowski A, 2004).

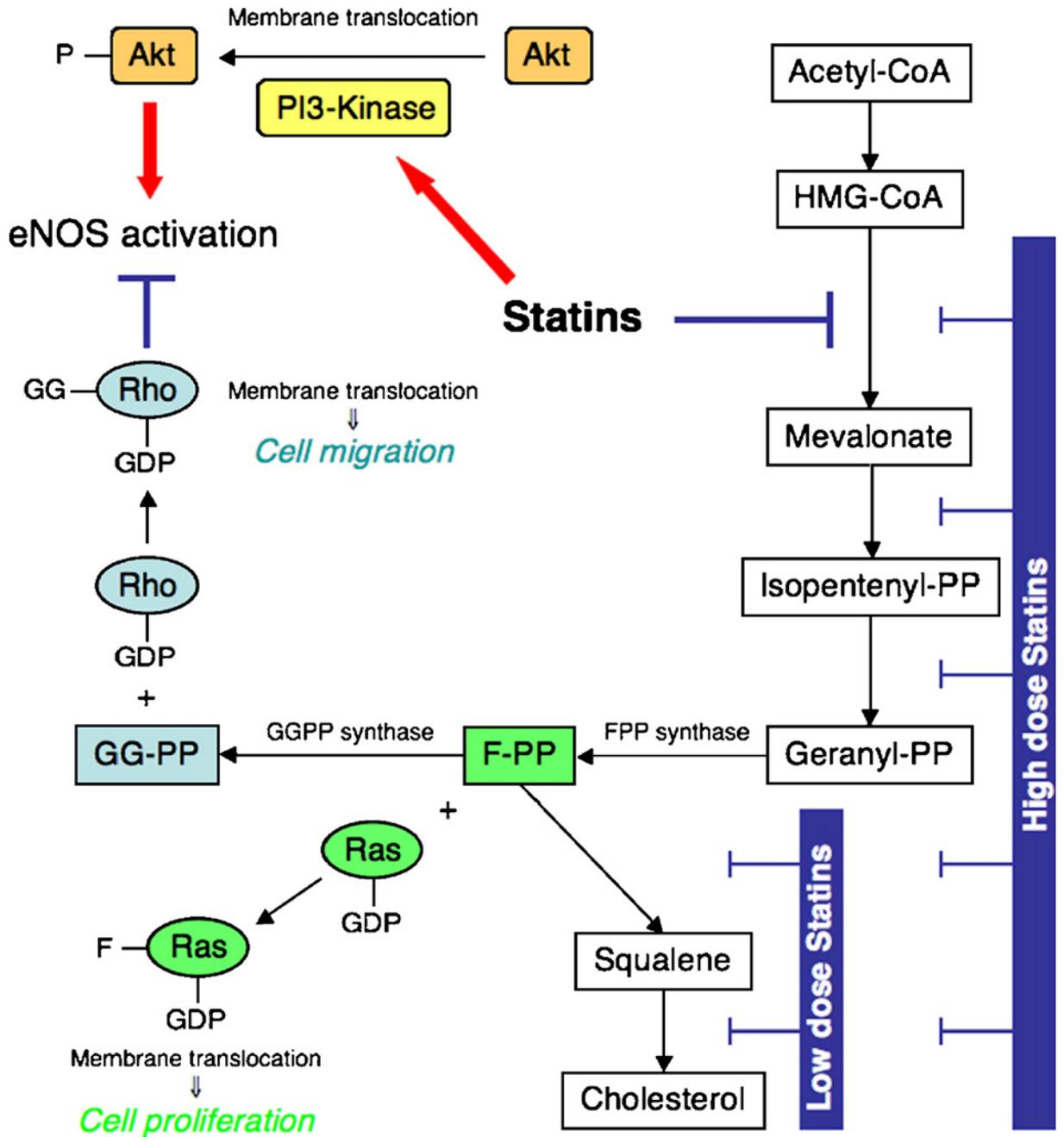


Abbildung 6.: Dosisabhängige Statineffekte (Ii & Losordo, 2007).

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit wollte ich zum einen herausfinden, ob Statine die angiogenetische Wirkung von FGF2 auf Endothelzellen und den Einbau des FGF-Rezeptors in Lipid Rafts beeinflussen und zum anderen, ob Statine und FGF2 in Zusammenhang mit pleiotropen Effekten stehen. Hierzu möchte ich meine Ergebnisse betrachten und mit ähnlichen Studien vergleichen.

Es ist bekannt, dass durch Stimulierung mit Isoprenoiden wie FPP und GGPP die Wirkung von Statinen wieder partial aufgehoben werden kann (Hillyard et al., 2007). Meine Versuche sollten herausfinden, welche der beiden in HUVECs diese Wirkung erzielt, ob diese Isoprenoide mehr Wirkung in der Proliferation oder Migration haben und ob es einen Unterschied zwischen den Statinen gibt.

#### 4.1.5.1. FPP

Bei meinen FPP-Versuchen stellte sich heraus, dass FPP keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation ausübt. Sowohl für Proliferation als auch für Matrigel-Tubeformationassay (=Sprouts) in Kombination mit Simvastatin war bereits bekannt, dass Simvastatin durch FPP nicht signifikant umgangen werden kann (Park et al., 2006). Dieser Effekt zeigte sich auch in der Migration. FGF2 zeigt zwar noch einen promigrativen Effekt, welcher sich jedoch nicht von der FPP+FGF2-Kontrolle abhebt und somit nicht aussagekräftig ist.

Für Cerivastatin war beschrieben, dass FPP keinen signifikanten Effekt hat; dies wurde in vivo (wound-healin-assays) und in-vitro (Matrigel-Tubeformationassays) bestätigt (Vincent et al., 2001). Im Gegensatz mit der bestehenden Literatur, konnte ich in meinen Proliferations- und Migrationsversuchen mit Cerivastatin und Fluvastatin diese Ergebnisse nicht nachvollziehen, da beider Wirkung durch FPP gestört wurden. Laufs et al jedoch konnten auch einen statinstörenden Effekt durch FPP und GGPP zeigen (Liao & Laufs, 2005).

Die Hinzugabe von FPP auf statinstimulierte Zellen scheint die Enzyme des Mevalonatweges in beiden Richtungen (Mevalonat, Cholesterin) anzuregen, was wiederum die Statinwirkung blockiert, jedoch erzielt es keinen zusätzlichen Effekt auf Proliferation und Migration.

#### 4.1.5.2. GGPP

Auf die Proliferation hat GGPP keinen Einfluss, jedoch macht sich bei der Migration bereits ein promigrativer Effekt bemerkbar, der durch FGF2 noch verstärkt werden kann.

In Kostimulation mit FGF2 wird die Proliferation signifikant gehemmt. Die beiden Stimulanzen kompetieren also miteinander um die selben Produkte bzw. Enzyme.

In der Proliferation hebt GGPP den Effekt von Fluvastatin und Cerivastatin wieder auf, die Zellen lassen sich zudem mit FGF2 weiter zu Proliferation anregen. Bei Simvastatin hat GGPP+FGF2 auch wieder eine proproliferative Wirkung, jedoch bewirkt GGPP alleine keine vollständige Aufhebung des Simvastatineffekts.

Andere Studien jedoch fanden, dass Simvastatin vollständig durch GGPP reversiert werden kann, in Sprouts(Park et al., 2006) und parallel durch Inhibierung der Geranylgeranylation von RhoA (Tang et al., 2006). Indem man einen spezifischen Antikörper gegen GGPP nahm, konnte man die Migration und Kapillarenbildung (Tubeformation) wieder herstellen, welche zuvor von Simvastatin gehemmt wurde. Die Literatur ist sich somit einig, dass Simvastatin mit der Angiogenese in Zusammenhang steht über die Inhibierung der Isoprenylierung von RhoA mit GGPP (Park et al., 2006). Nachdem der antiproliferative Effekt in meinen Versuchen von Simvastatin wieder durch GGPP aufgehoben worden war, liessen sich die Zellen wieder zur Proliferation mit FGF2 anregen. FGF2 welches ohne die vorherige Isoprenylierung mit GGPP keinen signifikanten Effekt hatte, könnte somit auch über RhoA funktionieren.

Statine, haben neben ihrer cholesterinsenkenden Wirkung auch andere therapeutische Effekte. Sie hemmen die Angiogenese nicht nur über die Hemmung der Cholesterinbiosynthese, sondern auch durch Intervention an Signalmolekülen, kleinen GTPasen, wie RhoA und deren Lokalisation an der Zellmembran von Endothelzellen (Rikitake & Liao, 2005). Angiogenese wird unter anderem durch RhoA angeregt, dessen Membranlokalisation wiederum von der Isoprenylierung mit GGPP abhängt. Das ist ein Prozess, welcher durch Statine unterbunden werden kann, daher erklärt sich der Zusammenhang des Cholesterinmetabolismus und der Angiogenese in Endothelzellen. Wurden Endothelzellen mit einem Adenovirus mit DN-RhoA infiziert, konnte der Statineffekt umgangen werden (Park et al., 2006). Es war bereits bewiesen, dass Statine Veränderungen im Aktinzytoskelett und in der Zusammensetzung von lokalen Adhäsionskomplexen hervorrufen und so die Isoprenylierung von GTPasen hemmen können (E. M. Laufs U, Custodis F, Gertz K, Nickenig G, Liao JK, Böhm M., 2000).

Die Membranlokalisation von RhoA wiederum führt zur Aktivierung der eNOS (Liao & Laufs, 2005). Somit schließt sich wieder mein Gedankenkreis, da das Vorhandensein von NO die Angiogenese anregt, was bereits vorher bekannt war (Kureishi et al., 2000; L. F. V. Laufs U, Plutzky J, Liao JK., 1998). Gleichzeitig hemmt NO viele weitere bereits erwähnte Komponenten der Atherogenese (Rikitake & Liao, 2005). Ein Prozess der dem Einfluss von Hypoxie, Inflammation und ox-LDL-Cholesterin entgegenwirkt (Liao & Laufs, 2005). Wird durch Statine die RhoA-

Aktivierung gehemmt, so wirkt sich dies bei gleichbleibender Aktivität der eNOS auch hemmend auf die Proliferation und Migration von Endothelzellen aus (Ii & Losordo, 2007).

Die oben beschriebenen Effekte ließen sich nicht nur für Simvastatin, sondern auch für Cerivastatin nachweisen. So ließen sich *in vitro* (Proliferationsassay, capillary tube assay) und *in vivo* (wound healing assays) der hemmende Effekt von Cerivastatin durch Mevalonat und GGPP, nicht jedoch durch FPP, wieder vollständig reversieren (Vincent et al., 2001). Zusätzlich konnte auch wieder ein proliferativer Effekt durch FGF2 erzeugt werden, nachdem der Cerivastatineffekt wieder mit Mevalonat oder GGPP aufgehoben worden war. In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass es bei Delokalisation des aktivierten RhoA von der Zellmembran zu einer Zellrundung und Stop der Migration und Tubeformation kam (Vincent et al., 2001). Diese Ergebnisse decken sich mit meinen, bei denen durch Statine die Migration gehemmt und der Zellverbund gelockert wurde, die Effekte jedoch wieder durch GGPP aufgehoben werden konnten. Inwieweit RhoA und seine nachgeschalteten Mediatoren genau auf den Metabolismus von Endothelzellen wirken und wo genau man pharmakologisch eingreifen kann, ist noch herauszufinden. Zwei der RhoA Mediatoren, die MLC und ROCK, sind bereits im Rampenlicht der Forschung, so wurde für die letztere bereits die Hemmung von Atherosklerose (Mallat Z., 2003) und die Prevention von arteriellem Remodelling nach Gefäßverletzung beschrieben (Sawada N, 2000).

Dass Statine das Serumcholesterollevel senken, ist bereits weitgängig etabliert. Zusätzlich dazu haben sie cholesterinunabhängige Effekte am Endothel, welche dessen Funktionalität verbessern und damit in kardioprotektiven und antiatherosklerotischen Vorteilen resultieren. Hierbei ist bei den bereits bekannten pleiotropen Effekten das klinische Outcome bezüglich der Vorteile noch unbekannt. Des Weiteren ließen sich biphasische Effektniveaus für Statine *in vitro* und *in vivo* feststellen, welche zu pro- und antiangiogenen Effekten führen. Inwieweit dieses Potential für die Krebsforschung oder die Statinapplikation in ischämischen Erkrankungen eingesetzt werden kann, wird aktuell bereits erforscht.

#### 4.1.6. Zusammenfassung der Forschungshypothesen

Statine dienen der Primär- und Sekundärprophylaxe von Atherosklerose und koronarer Herzkrankheit. Sie entwickeln dabei neben der systemischen Cholesterinsekung pleiotrope Effekte wie zum Beispiel ein biphasisches Potential,

welches die Angiogenese, die Proliferation, Migration und tube-formation, dosisabhängig anregen oder inhibieren können. In niedrigen Dosen wird parallel zur Unterdrückung der Cholesterinbiosynthese, die Angiogenese gefördert, durch posttranslationale Aktivierung des PI3-Akt-Kaskade, was zur Steigerung der zellinternen NO-Produktion führt. In höheren Dosen wird die Produktion von Nicht-Sterolprodukten unterbunden und somit die Aktivierung kleiner GTPasen wie RhoA gehemmt, zum Beispiel über die Unterdrückung seiner Isoprenylierung mit GGPP. Das führt letztendlich zur Stabilisierung der mRNA der eNOS und dient gleichzeitig der Unterdrückung der Angiogenese (Li & Losordo, 2007; Urbich C, 2002).

In vitro versus in vivo Studien ergeben unterschiedliche Ergebnisse für Therapiekonzentrationen und derer Antwort auf die Frage, was niedrige und hohe Dosen sind, und wie sich die Pharmakokinetik bei chronischer Statingabe verhält. Die meisten in vitro Studien verwenden zu hohe Dosen die lediglich die Isoprenoide und Angiogenese hemmen (Pedersen & Tobert, 2004). Aktuell und zukünftig von großer Relevanz ist die genaue Untersuchung bezüglich der subzellulären Wirkungen von Statinen und deren pleiotropen Effekten für deren therapeutische Wirkung und Dosierung sowie für die Weiterentwicklung bzw. Neuentwicklung anderer Pharmaka. Für einen Teil der pleiotropen Effekte ist die Isoprenylierung kleiner GTPasen wie Rho, Ras und Rac verantwortlich, welche die Lokalisation und Aktivierung dieser GTPasen beeinflusst und durch Statine gehemmt werden kann.

Es wurde jedoch gezeigt, dass durch Statingabe und die damit verbundene Hemmung der Isoprenylierung mit Ras und Rho diese in der Zelle inaktiv verbleiben. Setzt man nun nach kontinuierlicher Gabe die Statintherapie abrupt ab, kann es durch die angesammelten Isoprenoide zu Rebound-Phänomenen kommen (Liao & Laufs, 2005). Zum Beispiel hemmt aktiviertes RhoA das Aktinoskelett, was über die mRNA der eNOS NO freisetzt. Werden Statine abgesetzt kann der Rebound bis zur totalen Hemmung von NO Translation führen (Endres & Laufs, 2004). Zusätzlich wird jedoch auch die Unterdrückung der Genexpression von Rho durch Statine diskutiert (Gelosa et al., 2007).

Werden diese GTPasen und weitere Moleküle des Mevalonatweges gehemmt, so führen hohe Konzentrationen von Statinen zur Apoptose was in meinen Ergebnissen gut ersichtlich ist. Jedoch wurde durch einen selektiven Antagonisten nachgewiesen, dass die selektive Ausschaltung von RhoA alleine nicht zur Apoptose führt (Urbich C, 2002).

Für einen anderen Teil der pleiotropen Effekte verantwortlich ist die Aktivierung von PI3-Akt-Kaskade, welche zur Phosphorylierung und somit Aktivierung der eNOS führt. Diese Aktivierung, welche innerhalb von Sekunden bis Minuten nach der

Statingabe stattfindet, ist unabhängig vom Mevalonatweg und der Aktivierung kleiner G-Proteine, vielmehr hängt sie von der Membranrezeptoraktivierung zum Beispiel durch Wachstumsfaktoren ab (Harris MB, 2004).

In meinen Ergebnissen konnte ich mit Hilfe des Wachstumsfaktors FGF2 zeigen, dass sich die Wirkung der Statine auf die HUVECs nur gering durch den Wachstumsfaktor ändern lässt. Das ist ein Effekt, der vielleicht noch auszubauen wäre durch die Untersuchung Statine neuerer Generationen wie Rosuvastatin, welches bei höherer Halbwertszeit und Lipophilie noch gezielter auf die Serumcholesterinsenkung über die Leber wirkt und damit weniger auf die zellinternen Mechanismen (Liao & Laufs, 2005). Andererseits werden so die pleiotropen Effekte minimiert. Ein weiterer pleiotroper Effekt ist die Tatsache, dass Statinbehandlung die vaskuläre Ansprache auf Angiotensin II erhöht. In diesem Zusammenhang stellt sich auch wieder die Frage nach der Definition der pleiotropen Effekte. Je nach Herangehensweise scheint es zumal sinnvoller von hepatischen und nicht-hepatischen Effekten zu reden im Vergleich zu Serumcholesterinsenkung und pleiotropen Effekten (Liao, 2002).

Es gibt Hinweise, dass die Akt-Signalkaskade nur durch Statine aktiviert werden kann, wenn die Endothelzelle zuvor über Rezeptoren in Lipid Rafts aktiviert worden ist (Kureishi et al., 2000).

In diesem Zusammenhang wurde bestätigt, dass die statinabhängige Aktivierung der eNOS vom Endotheltyp abhängt und dessen Volumen an inhibitorischem Caveolin, insbesondere Caveolin-1. So haben Aortenendothelzellen wenig Caveolin, was im Gegenteil zu peripheren Endothelzellen mit viel Caveolin zu einer großen eNOS-Aktivierung führt. Es wird sich in Zukunft herausstellen, ob die Forschung an Statinen und deren pleiotropen Effekten unsere Wahrnehmung bezüglich Indikation und Dosis von Statinen ändern wird oder sich auf ihrer Grundlage neue Pharmaka entwickeln lassen.

#### 4.2. Fehlerquellen

Als Teil der Diskussion möchte ich meine eigene Arbeit kritisch betrachten und deren mögliche Fehlerquellen aufsuchen.

Eine der größten Diskrepanzen fiel mir gleich am Anfang bei der Gewinnung der Stammzellen auf. Diese stammen wie beschrieben aus diversen Nabelschnüren von Kindern spendefreiwilliger Mütter. Obwohl diese Zellen noch sehr jung und flexibel

in ihrem Wachstum, ihrer Genexpression und damit ihrer Funktion sind, spiegeln sie diverse Genpools wider. Ein einheitliches Ergebnis mit unterschiedlichen Zellen zu produzieren ist somit ausgeschlossen. Also müssen die Statistik und das Mittelmaß erhalten.

Im weiteren Vorgehen mussten die Zellen ausgezählt und letztendlich auf 95-Well-Platten verteilt werden. Trotz dreimaligem Auszählen in der Neubauerkammer und Arbeiten mit 10er-Pipette war es eine Herausforderung in der Arbeit, konstante Zellzahlen in den Wells zu erhalten, damit anschließend die Stimulation und der Versuch beginnen konnte.

Die Länge der Arbeit stellt keine direkte Fehlerquelle aber einen Nachteil dar. Insgesamt erstreckt sich die Arbeit über fünf Jahre, auf Grund von Studium und der anschließenden Berufsbelastung. Was der Qualität der Arbeit nicht absagt, jedoch wurden in dieser Zeit eine Menge neuer Erkenntnisse in dem Gebiet der Arbeit gewonnen.

Von Anfang an wurde in unserem Labor die Verwendung von Cerivastatin kritisch bewertet. Als eines der potentesten Statine stellt es zwar eine hervorragende Positiv-Kontrolle dar, jedoch ist es nicht mehr im medizinischen Gebrauch und somit nur von theoretischem Interesse. Hinzu kommt, dass der Vorrat unseres Labors stetig abnahm, wäre zum Beispiel mit dem lichtempfindlichen Reagenz etwas schief gelaufen, wäre keines mehr zu erwerben gewesen.

Obwohl mit konstanten Konzentrationen gearbeitet wurde, welche bei erprobt niedrigen Konzentrationen die maximale Wirkung erzielten, wurde mir doch erst zu spät an Hand der sich entwickelnden Studienlage bewusst, dass in vivo viel niedrigere Konzentrationen herrschen, welche zu den pleiotropen Effekten beitragen können, in meinen Versuchen aber nicht erfasst sind.

Die Statistik stellt im Rahmen der Forschung immer wieder eine Herausforderung dar. Sowohl deren Berechnung, als auch deren Interpretation, fallen trotz berechneter Signifikanzen schwer.

Gegenüber meinem fachlichem Interesse und meiner großen Motivation, machte sich die Tatsache von wechselnden Laborbetreuern über die Zeit hin negativ bemerkbar. Dass auf Grund fehlender Betreuungskonstanz die Feedbackschleifen und Wissensstände immer wieder neu aufgebaut werden mussten,

machte meine Arbeit nicht leichter und stellte sich als sehr zeitintensiv und erschwerend heraus.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit ist es, drei verschiedene Statine auf ihre angiostatische Wirkung zu untersuchen. Es war bereits aus Langzeitstudien ersichtlich, dass Statine zu ihrer cholesterinsenkenden Wirkung andere, sogenannte pleiotrope Effekte entwickeln, welche sich positiv auf die Atherosklerose und deren Risikoprofil auswirken. Dem stellte ich FGF2 gegenüber, einen bekannten Wachstumsfaktor, welcher die Angiogenese bewiesenermaßen fördert. Im Zusammenspiel wollte ich so mehr über die jeweiligen Funktionsmechanismen bezüglich des Proliferations- und Migrationsverhaltens der stimulierten Endothelzellen und deren Interaktion erfahren.

Als Erstes konnte ich Unterschiede in der Effektivität der drei Statine aufzeigen. So zeigte Simvastatin durchwegs die schwächste und Cerivastatin die stärkste Wirkung. In Kombination mit FGF2 konnte ich zeigen, dass dessen Wirkung bei Proliferation und Migration auf zellinternes Cholesterin angewiesen ist. In den Mevalonatversuchen, bei denen ich die von den Statinen gehemmte HMG-CoA-Reduktase umging, konnte ich belegen, dass der Großteil der Statinwirkungen auf Endothelzellen auf der direkten Hemmung der Cholesterinbiosynthese beruht.

Durch Ausschalten beziehungsweise Auflösen des in der Zellmembran befindlichen Cholesterins und der davon stark abhängigen Lipid Rafts mittels MCD konnte ich zeigen, dass die Funktion beziehungsweise die Aufnahme der Statine gestört war. Obwohl der FGF2-Rezeptor Lipid Raft assoziiert ist, hatte FGF2 immer noch einen proangiogenen Effekt, nicht jedoch auf statinostimulierte Zellen. Hieraus war zu schließen, dass die durch den FGF2-Rezeptor vermittelte Angiogenese von zellinternen Produkten der Cholesterinbiosynthese oder deren Zwischenprodukten abhängig ist.

Im Hinblick der pleiotropen Effekte von Statinen rückten die Isoprenoide, zellmembranverankernde, proteinaktivierende Zwischenprodukte der Cholesterinbiosynthese, immer mehr in den wissenschaftlichen Fokus. In Anbetracht der theoretisch wissenschaftlichen Grundlage der Isoprenoide verwendete ich FPP und GGPP. Für FPP stellten sich inkongruente Ergebnisse heraus, sodass lediglich

gezeigt werden konnte, dass es ein Zwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese ist, welches die Enzymkette in beide Richtungen unterhalten kann. Für GGPP konnte ich zeigen, dass es in großen Konzentrationen die Statinwirkungen wieder aufhebt. Hier stellte sich nun der Unterschied in der Lipophilie zwischen Simvastatin und den anderen beiden Statinen Fluvastatin und Cerivastatin heraus. In Koherenz mit der Literatur (siehe Diskussion) konnte ich zeigen, dass die beiden Letzteren einen stärkeren Einfluss auf die endotheleigene Cholesterinbiosynthese haben im Gegensatz zu lipophilen Statinen (Simvastatin), welche eher systemisch über die Leber wirken. So hatten die Isoprenoide, besonders GGPP, einen stärkeren Effekt auf Fluvastatin und Cerivastatin.

Da FGF2 in Costimulation mit GGPP wieder normale Effektivität zeigte, folgerte ich einen Zusammenhang zwischen der in der Endothelzelle durch FGF2 ausgelösten proangiogenetischen Reaktion und dem G-Protein RhoA, welches durch GGPP aktiviert wird. Weiter gebe ich einen theoretischen Überblick über die von Statinen ausgelösten pleiotropen Effekte und deren biokinetische Mechanismen. In Anbetracht der aktuellen Wissens- und Forschungsgrundlage äußerte ich Zukunftsaussichten bezüglich pharmakologischer und wissenschaftlicher Forschungsmöglichkeiten.

## 6. ABSTRACT

It is widely known that statins produce angiostatic effects, for example Simvastatin, Fluvastatin and Cerivastatin. Although different in their level of expression, they all have shown in vivo and in vitro to produce those effects, next to their primary effect as lipidlowering agents. In recent years a whole range of useful side effects have been discovered and have been termed pleiotopic effects.

Opposed to the angiostatic effects of statins, I used FGF-2, a potent proangiogenic growthfactor, to further investigate the underlying mechanism of the agents in proliferation- and migrationessys of endothelial cells.

Beyond showing a difference in efficacy of the three statins, Simvastatin being the weakest and Cerivastatin the strongest, I complementary added FGF2 to show, that proliferation and migration depend upon cellinherent cholesterol.

Furthermore bypassing the HMG-CoA-reductase of the mevalonate-pathway via mevalonate, I could show, that the majority of the statineffects are due to their direct inhibition of that pathway.

Thereafter I used MCD to dissolve membranebound cholesterol strongly associated with lipid rafts, which led to a highly impaired uptake of statins into the endothelial cells. FGF2 still acted as a growthfactor, although its receptor is known to be lipid-raft associated, an effect not measurable by cells which had been co stimulated with statins earlier. The proangiogenic effect of FGF2 must therefore be related to the cells internal cholesterolproduction and its intermediates.

Two of those intermediates are the isoprenoid-units FPP und GGPP which act as protein cascade activating agents. As suggested by the literature, my results for FPP were incongruent, showing that FPP is an intermediate, which fuels the mevalonate-pathway both ways. For GGPP my results show an inhibiting effect for statins at high serumconcentrations, while distinguishing among the statins. Simvastatin, being a highly lipophilic agent, acts predominantly at the liver and therefore has a higher influence on systemic Cholesterol levels. Compared to the other two statins, which

react more strongly to intracellular cholesterol metabolism and in accordance with GGPP. FGF2 regained its full potential in endothelial cells costimulated with GGPP indicating a logic connectivity with GGPPs g-protein RhoA.

In addition to these results I outlined a theoretical background of all the pleiotropic effects of statins and their suspected biokinetics. Furthermore I gave an overview of future perspectives in scientific and pharmacological research.

## 7. ANHANG

### 7.1. Stichwortverzeichnis

- HBSS	=	Hank's Balanced Salt Solution
-ATP	=	Adenosintriphosphat
-bFGF	=	basic Fibroblastic Growth Factor = FGF2
-Cdc42	=	Cell division controlprotein 42
-DRM	=	Detergent Resistant Membranes
-EBM	=	Endothelial Basal Medium
-EDTA	=	Ethylendiamintetraacetat
-eNOS	=	endothelial NO-Synthase
-EPC	=	Endothelial Progenitor Cell
-FCS	=	Fetal Calfserum
-FGF2	=	Fibroblastic Growth Factor 2 = bFGF
-FGFR	=	Fibroblastic Growth Factor - Receptor
-FPP	=	Farnesyl Pyrophosphat
-GGPP	=	Geranylgeranyl Pyrophosphat
-GPI	=	Glykosylphosphatidylinositol
-G-Protein	=	Guanosintriphosphat bindende Proteasen
-HDL	=	High Density Lipoprotein
-HEPES	=	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
-HMG-CoA	=	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
-HMVEC	=	human adult dermal microvascular Endothelial Cell
-HSPG	=	Heparansulfat Proteoglycan
-HUVEC	=	Human Venole Endothelial Cell
-IL-2	=	Interleuking-2
-kDa	=	kilo Dalton
-LDL-ox	=	Low Density Lipoprotein - oxidiert

-MAPK	=	Mitogen-Aktivated Protein-Kinase
-MCD	=	Methyl Cyclodextrin
-MLC-Kinase	=	Myosinleichtketten-Kinase
-MLCP	=	Myosin Light Chain Phosphatase
-NO	=	Stickstoffmonoxid
-PDGF	=	Platelet Derived Growth Factor
-PGI	=	Prostaglandin
-PI3-Akt-Kaskade	=	Wachstum , Differenzierung, Proliferation
-PI3-Kinase	=	Phosphoinositid-3-Kinase
-Rab	=	"Ras related in brain", kleines G-Protein
-Ral	=	kleines G-Protein
-Ras	=	Rat sarcoma, kleines G-Protein
-Rho	=	kleines G-Protein, Aktinzytoskelett, Migration
-ROCK	=	Rho-Kinase
-SEM	=	Standard Error of the Mean
-SMC	=	smooth muscle cell
-TGF	=	Tumor Growth Factor
-TNF-alpha	=	Tumor Necrose Factor - alpha
-VEGF	=	Vascular Endothelial Growth Factor
-vLDL	=	very Low Density Lipoprotein

## 7.2. Abbildungsverzeichniss

- 1. Schematischer Aufbau der Gefäßwand.;Seite 7.
- 2. Plaquentstehung im Modell.; Seite 11
- 3. FGF-Effekte an Endothelzellen.(Presta et al., 2005); Seite 13
- 4. Pleiotrope Effekte der Statine (Buhaescu & Izzedine, 2007); Seite 16
- 5. Aktivierung kleiner G-Proteine durch Isoprenoide.(Wang et al., 2008); Seite 47
- 6. Dosisabhängige Statineffekte. (Ii & Losordo, 2007); Seite 49

### 7.3. Tabellenverzeichnis.

- 1.: Proliferation, Statine und FGF2; Seite 22,
- 2.: Proliferation mit Mevalonat; Seite 23
- 3.: Proliferation mit MCD; Seite 23
- 4.: Proliferation mit FPP/GGPP; Seite 24
- 5.: FGF2 Messreihe; Seite 27
- 6.: Kontrolle Basalzellmedium mit FGF2 (1ng/ml), ohne FGF2 (1ng/ml) und ohne FCS; Seite 28
- 7.: Ergebnisse Proliferation Statine und FGF2; Seite 29
- 8.: Ergebnisse Proliferation Mevalonat; Seite 30
- 9.: Ergebnisse Proliferation MCD; Seite 31
- 10.: Ergebnisse Proliferation FFP; Seite 32
- 11.: Ergebnisse Proliferation GGPP; Seite 33
- 12.: Migration Statine und FGF2; Seite 35
- 13.: Ergebnisse Migration Mevalonat; Seite 36
- 14.: Ergebnisse Migration MCD; Seite 37
- 15.: Ergebnisse Migration FFP; Seite 38
- 16.: Ergebnisse Migration GGPP; Seite 39

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Asakage, M., Tsuno, N. H., Kitayama, J., Kawai, K., Okaji, Y., Yazawa, K., et al. (2004). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor (pravastatin) inhibits endothelial cell proliferation dependent on G1 cell cycle arrest. *Anticancer Drugs*, 15(6), 625-632.
2. Blankenhorn, D. H., & Hodis, H. N. (1993). Atherosclerosis--reversal with therapy. *West J Med*, 159(2), 172-179.
3. Buhaescu, I., & Izzedine, H. (2007). Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clin Biochem*, 40(9-10), 575-584.
4. Chen, J., Chen, L., Wang, G., & Tang, H. (2007). Cholesterol-dependent and -independent CD40 internalization and signaling activation in cardiovascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(9), 2005-2013.
5. Cheung, D. T., & Nimni, M. E. (1982). Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen. *Connect Tissue Res*, 10(2), 201-216.
6. Chopra V., e. a. (2007). Beyond lipid lowering: the anti-hypertensive role of statins. *Cardiovasc Drugs Ther.*, 21(3):161-9.
7. Chu, C. L., Buczek-Thomas, J. A., & Nugent, M. A. (2004). Heparan sulphate proteoglycans modulate fibroblast growth factor-2 binding through a lipid raft-mediated mechanism. *Biochem J*, 379(Pt 2), 331-341.
8. Dainese, E., Oddi, S., Bari, M., & Maccarrone, M. (2007). Modulation of the endocannabinoid system by lipid rafts. *Curr Med Chem*, 14(25), 2702-2715.
9. Endres, M., & Laufs, U. (2004). Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke*, 35(11 Suppl 1), 2708-2711.
10. Fan, J., & Watanabe, T. (2003). Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 10(2), 63-71.
11. Faust, J. R., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1980). Synthesis of delta 2-isopentenyl tRNA from mevalonate in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem*, 255(14), 6546-6548.
12. Gelosa, P., Cimino, M., Pignieri, A., Tremoli, E., Guerrini, U., & Sironi, L. (2007). The role of HMG-CoA reductase inhibition in endothelial dysfunction and inflammation. *Vasc Health Risk Manag*, 3(5), 567-577.
13. Gillies, R. J., Didier, N., & Denton, M. (1986). Determination of cell number

- in monolayer cultures. *Anal Biochem*, 159(1), 109-113.
14. Hansson, G. K. (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 352(16), 1685-1695.
  15. Hanzal-Bayer, M. F., & Hancock, J. F. (2007). Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett*, 581(11), 2098-2104.
  16. Harris MB, e. a. (2004). Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004 Aug;287(2):H560-6. Epub 2004 Apr 15.
  17. Hillyard, D. Z., Nutt, C. D., Thomson, J., McDonald, K. J., Wan, R. K., Cameron, A. J., et al. (2007). Statins inhibit NK cell cytotoxicity by membrane raft depletion rather than inhibition of isoprenylation. *Atherosclerosis*, 191(2), 319-325.
  18. Ii, M., & Losordo, D. W. (2007). Statins and the endothelium. *Vascul Pharmacol*, 46(1), 1-9.
  19. Insull, W., Jr. (2009). The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med*, 122(1 Suppl), S3-S14.
  20. Jaffe, E. A. e. a. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins-indentification by morphological and immunological criteria. *Journal of clinical Investigation*, 52(2745-2756;).
  21. Javerzat, S., Auguste, P., & Bikfalvi, A. (2002). The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol Med*, 8(10), 483-489.
  22. Kueng, W., Silber, E., & Eppenberger, U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem*, 182(1), 16-19.
  23. Kuhlmann, C. R., Wu, Y., Li, F., Munz, B. M., Tillmanns, H., Waldecker, B., et al. (2004). bFGF activates endothelial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels involving G-proteins and tyrosine kinases. *Vascul Pharmacol*, 41(6), 181-186.
  24. Kureishi, Y., Luo, Z., Shiojima, I., Bialik, A., Fulton, D., Lefler, D. J., et al. (2000). The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*, 6(9), 1004-1010.
  25. Laufs U, E. M., Custodis F, Gertz K, Nickenig G, Liao JK, Böhm M. (2000). Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation*. , 2000 Dec 19;102(25):3104-10.

26. Laufs U, L. F. V., Plutzky J, Liao JK. (1998). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation.*, 1998 Mar 31;97(12):1129-35.
27. Li, P. L., Zhang, Y., & Yi, F. (2007). Lipid raft redox signaling platforms in endothelial dysfunction. *Antioxid Redox Signal*, 9(9), 1457-1470.
28. Li, X., Liu, L., Tupper, J. C., Bannerman, D. D., Winn, R. K., Sebt, S. M., et al. (2002). Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 277(18), 15309-15316.
29. Liao, J. K. (2002). Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol*, 86(1), 5-18.
30. Liao, J. K. (2005). Clinical implications for statin pleiotropy. *Curr Opin Lipidol*, 16(6), 624-629.
31. Liao, J. K., & Laufs, U. (2005). Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45, 89-118.
32. Lingwood, D., Kaiser, H. J., Levental, I., & Simons, K. (2009). Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 5), 955-960.
33. Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961), 46-50.
34. Löffler, P. Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage. *Springer Verlag; Heidelberg; (1998)*.
35. Lüllman-Rauch, R. 20, Histologie, Verstehen-Lernen-Nachschriften. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003*.
36. Mallat Z., et al. (2003). Rho-associated protein kinase contributes to early atherosclerotic lesion formation in mice. *Circ Res.*, 2003 Oct 31;93(9):884-8. *Epub 2003 Oct 2*.
37. Maseri, A., & Fuster, V. (2003). Is there a vulnerable plaque? *Circulation*, 107(16), 2068-2071.
38. Massy, Z. A., Keane, W. F., & Kasiske, B. L. (1996). Inhibition of the mevalonate pathway: benefits beyond cholesterol reduction? *Lancet*, 347(8994), 102-103.
39. Matsumoto, T., Turesson, I., Book, M., Gerwins, P., & Claesson-Welsh, L. (2002). p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *J Cell Biol*, 156(1), 149-160.

40. Melkonian, K. A., Ostermeyer, A. G., Chen, J. Z., Roth, M. G., & Brown, D. A. (1999). Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem*, 274(6), 3910-3917.
41. Mohammadi, M., Olsen, S. K., & Ibrahimi, O. A. (2005). Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16(2), 107-137.
42. Murakami, M., Elfenbein, A., & Simons, M. (2008). Non-canonical fibroblast growth factor signalling in angiogenesis. *Cardiovasc Res*, 78(2), 223-231.
43. Park, H. J., Kong, D., Iruela-Arispe, L., Begley, U., Tang, D., & Galper, J. B. (2002). 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA. *Circ Res*, 91(2), 143-150.
44. Park, H. J., Zhang, Y., Georgescu, S. P., Johnson, K. L., Kong, D., & Galper, J. B. (2006). Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Rev*, 2(2), 93-102.
45. Pedersen, T. R., & Tobert, J. A. (2004). Simvastatin: a review. *Expert Opin Pharmacother*, 5(12), 2583-2596.
46. Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res*, 47(7), 1597-1598.
47. Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., & Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16(2), 159-178.
48. Ribatti, D., Vacca, A., Rusnati, M., & Presta, M. (2007). The discovery of basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-2 and its role in haematological malignancies. *Cytokine Growth Factor Rev*, 18(3-4), 327-334.
49. Rikitake, Y., & Liao, J. K. (2005). Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res*, 97(12), 1232-1235.
50. Robinson, J. G., Smith, B., Maheshwari, N., & Schrott, H. (2005). Pleiotropic effects of statins: benefit beyond cholesterol reduction? A meta-regression analysis. *J Am Coll Cardiol*, 46(10), 1855-1862.
51. Ross, R. (1995). Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*, 57:791-804.

52. Ross, R., Glomset, J., & Harker, L. (1977). Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*, 86(3), 675-684.
53. Sawada N, e. a. (2000). Inhibition of rho-associated kinase results in suppression of neointimal formation of balloon-injured arteries. *Circulation.*, 2000 May 2;101(17):2030-3.
54. Schaefer, C. A., Kuhlmann, C. R., Gast, C., Weiterer, S., Li, F., Most, A. K., et al. (2004). Statins prevent oxidized low-density lipoprotein- and lysophosphatidylcholine-induced proliferation of human endothelial cells. *Vascul Pharmacol*, 41(2), 67-73.
55. Schaefer, C. A., Kuhlmann, C. R., Weiterer, S., Fehsecke, A., Abdallah, Y., Schaefer, C., et al. (2006). Statins inhibit hypoxia-induced endothelial proliferation by preventing calcium-induced ROS formation. *Atherosclerosis*, 185(2), 290-296.
56. Seelenmeyer, C., Stegmayer, C., & Nickel, W. (2008). Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 and galectin-1 does not require shedding of plasma membrane-derived vesicles. *FEBS Lett*, 582(9), 1362-1368.
57. Shing, Y. W., & Klagsbrun, M. (1984). Human and bovine milk contain different sets of growth factors. *Endocrinology*, 115(1), 273-282.
58. Skaletz-Rorowski A, K. Y., Shiojima I, Walsh K. (2004). The pro- and antiangiogenic effects of statins. *Semin Vasc Med.*, 4(4):395-400.
59. Somlyo, e. a. (2002). RhoA-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization in erectile function. *J Biol. Chem.*, 2002 Aug 23;277(34):30614-21. Epub 2002 Jun 11.
60. Tang, D., Park, H. J., Georgescu, S. P., Sebti, S. M., Hamilton, A. D., & Galper, J. B. (2006). Simvastatin potentiates tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of human vascular endothelial cells via the inhibition of the geranylgeranylation of RhoA. *Life Sci*, 79(15), 1484-1492.
61. Urbich C, D. E., Zeiher AM, Dimmeler S. (2002). Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circ Res.*, 90(6):737-44.
62. Vincent, L., Chen, W., Hong, L., Mirshahi, F., Mishal, Z., Mirshahi-Khorassani, T., et al. (2001). Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect. *FEBS Lett*, 495(3), 159-166.
63. Vincent, L., Soria, C., Mirshahi, F., Opolon, P., Mishal, Z., Vannier, J. P., et al. (2002). Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase, inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in in vivo models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(4), 623-629.

64. Wang, C. Y., Liu, P. Y., & Liao, J. K. (2008). Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med*, *14*(1), 37-44.
65. Weis, M., Heeschen, C., Glassford, A. J., & Cooke, J. P. (2002). Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation*, *105*(6), 739-745.

## **DANKSAGUNG**

Ich möchte die Gelegenheit nutzen mich bei all denen zu bedanken die mir bei der Entstehung dieser Arbeit geholfen haben.

Zuerst gilt mein Dank Dr. med. Prof. Ali Erdogan, für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Arbeitskreis durchführen zu dürfen.

Als nächstes möchte ich den Laborassistenten Dr. Christian Schaefer, Dr. Utz Benschaid und Dr. Amir Rafiq für die theoretische und praktische Unterstützung danken.

Hervorzuheben ist die langjährige Motivation und alltägliche Hilfestellung im Labor durch Frau Christina Frey-Krug.

Ohne die Freundschaft mit Kirsten und Johannes Bui und deren liebevolles und überaus produktives Feedback wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meinem Freund Wolfgang Wiener, sowie meiner Mutter und meinem Bruder möchte ich danken für die zusätzliche Unterstützung.

Die Kraft und Ausdauer, diese Arbeit über die Jahre hinweg zum Abschluss zu bringen, verdanke ich der unendlichen Liebe meiner Frau Kim und meines Sohnes Sem. Danke.