Bedeutung des uPA/uPAR- Systems für die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

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

vorgelegt von Tanja Arendholz
aus Leinefelde

Gießen 2011

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik I
Abteilung für Kardiologie und Angiologie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg
am Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. H. H. Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. Voss

Gutachter: Prof. Dr. Schlüter

Tag der Disputation: 18.04.2012

Erklärung

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

Weilerbach, den 17.02.2011 Tanja Arendholz

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1
1.1 Molekulare Mechanismen der Atherosklerose ... 2
1.2 Die Rolle des uPA/uPAR- Systems bei der Entstehung von Restenose und Atherosklerose ... 4
1.3 Der PI(3)-K/Akt- Signalweg ... 5
2 Fragestellung ... 7
3 Material und Methoden ... 8
3.1 Geräte ... 8
3.2 Chemikalien ... 10
3.3 Antikörper ... 12
3.4 Inhibitoren ... 13
3.5 Zellkultur ... 14
3.6 Western Blot ... 15
3.7 PI(3)- Kinase Assay ... 22
3.8 3H- Thymidin Einbau als Proliferationskontrolle ... 24
3.9 Statistische Analyse ... 25
4 Ergebnisse ... 26
4.1 uPA aktiviert die Zellproliferation in glatten Gefäßmuskelzellen ... 26
4.2 uPA aktiviert die PI(3)- Kinase ... 29
4.3 Die Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt) wird durch uPA stimuliert ... 30
4.4 uPA interagiert über einen spezifischen Rezeptor (uPAR) ... 31
4.5 uPAR ist in den Caveolae lokalisiert ... 32
4.6 uPAR ist über einen G- Protein gekoppelt ... 34
4.7 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die uPA vermittelte Akt-Aktivierung ... 36
4.8 Die gewonnen Ergebnisse sind auf humane Zellen übertragbar ... 40
5 Diskussion ... 47
5.1 Die Rolle von uPA/uPAR bei der Zellproliferation ... 50
5.2 Urokinase aktiviert den PI(3)- Kinase/Akt- Signalweg ... 52
6 Zusammenfassung/Summary ... 56
6.1 Zusammenfassung ... 56
6.2 Summary ... 58
7 Literaturangaben ... 60
8 Publikationen ... 77
8.1 Abstrakts ... 77
9 Danksagung ... 78

1 Einleitung

In unserer westlichen Gesellschaft stellen atherosklerotische Herzkreislauferkrankungen weiterhin eine Haupttodesursache dar.[1] Ein wesentlicher Pathomechanismus dieser vasoproliferativen Gefäßerkrankungen ist die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Media in die Intima des Blutgefäßes. Als wichtige präventive Funktion wird die Reduktion von Risikofaktoren wie: Hypercholesterinämie, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Übergewicht und Zigarettenkonsum angesehen. Therapeutische Möglichkeiten zur Revaskularisierung und Wiederherstellung des Blutflusses beinhalten chirurgische Intervention (z.B. Bypass) oder Angioplastie des betroffenen Gefäßes. Bei der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) wird mittels eines, meist transfemoral, eingeführten Ballonkatheters die verengte Stelle des Gefäßes passiert. Anschließend wird dieser Ballon für 30-120 Sekunden mit einem Druck von 6-10 Atmosphären entfaltet um so die Stenose aufzuweiten oder eine Rekanalisation zu erzielen.
Die Rate der Rezidivstenosen der dilatierten Gefäße liegt heute zwischen 30 % und 50 %.[2] [3] Die zur Restenose führenden Prozesse beginnen sofort nach der PTCA und sind in der Regel nach ungefähr 6 Monaten weitgehend abgeschlossen.[4] Pathoanatomisch werden verschiedene Mechanismen im Betracht gezogen. Dazu gehört der Lumenverlust durch Zusammenziehen des Gefäßes direkt nach der PTCA, das elastische Recoil. Eine weitere Rolle spielt die Thrombusbildung und die Reorganisation an der Stelle der Dilatation sowie die Intimahyperplasie durch die Einwanderung der glatten Muskelzellen. Auch das veränderte Remodeling-Verhalten des Gefäßes muss berücksichtigt werden.[5] [6] [7] Trotz neuerer interventioneller Verfahren, wie zum Beispiel der Hochfrequenzrotablation (Abfräsen des Plaques bei 160000-200000 Umdrehungen/Minute) oder auch Laserangioplastie besteht die Problematik des Gefäßwiederverschlusses weiterhin fort.

Therapeutisch konnte die Restenoserate durch die Implantation von Gefäßprothesen (Stents) gesenkt werden, ist aber dennoch mit bis zu 30 % deutlich zu hoch.[8] Der

Wirkmechanismus, der Stents, beruht sowohl auf der akuten Verhinderung des Recoils als auch auf die Erzielung eines größeren initialen Gefäßlumens. Langfristig wird eine Beeinflussung des Remodelings durch eine verminderte Gefäßschrumpfung erreicht. Die entscheidend zur Restenose beitragende Intimahyperplasie wird durch diese Gefäßprothesen nicht beeinflusst oder sogar verstärkt.[9] [10]

Eine aktuelle Untersuchung konnte allerdings keinen statistisch signifikanten Langzeiteffekt zwischen der alleinigen Angioplastie im Vergleich zur primären Stentimplantation zeigen.[11]

Etwa 20 % der von einer Restenose betroffenen Patienten benötigen eine Bypass Operation. Auch nach dieser operativen Therapie kommt es in 10 %- 30 % der Fälle zum Transplantatversagen durch die erneute Stenosierung der verpflanzten Gefäße.[12]

1.1 Molekulare Mechanismen der Atherosklerose

Unter der Atherosklerose versteht man eine Gruppe von Erkrankungen, die mit Intimaveränderungen der Arterien einhergehen. Diese Veränderungen sind mit Funktions- und Transportstörung des betroffenen Gefäßes verbunden. Epidemiologisch wurden bisher zahlreiche Risikofaktoren erkannt. Dazu gehören unter anderem Hypercholesterinämie, Hyperhomozystämie, Hypertonie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus.

Ihren Ausgangspunkt findet die Atherosklerose in der Schädigung und lokalen Aktivierung des Endothels. Es folgt die lokalisierte Infiltration von differenzierten Makrophagen, Plasmazellen und Lymphozyten sowie die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen. Weiterhin erfolgt die Aktivierung von Thrombozyten und somit die Thrombusbildung . Diese Aktivierten Zellen setzen multiple Wachstumsfaktoren und Zytokine frei und führen so zur Vermittlung von Chemotaxis, Proliferation, Migration und Matrix- Modulation.[13] Morphologisch können verschiedene Stadien unterschieden werden. Die initiale Läsion ist gekennzeichnet durch eine Ansammlung von Blutlipiden, die von Intimamonozyten phagozytiert oder zwischen diesen gelagert sind. Eine erste sichtbare Läsion zeigt sich als sogenannter Fettstreifen (fatty streak), der von lipidhaltigen Makrophagen (Schaumzellen) und

glatten Muskelzellen gebildet wird. Diese Fettstreifen können sich zu komplizierten atherosklerotische Läsionen weiterentwickeln, die aus einer Ansammlung von Zelltrümmern und Lipiden bestehen. Umgeben ist diese Läsion von einer Matrix aus Bindegewebe und einer sklerosierenden Zone proliferierender glatter Gefäßmuskelzellen. Der an Größe zunehmende Plaque wölbt sich in das Lumen vor und behindert so den Blutfluss. Nekrosenbildung , Verkalkung und Ulzeration können diese Läsion weiter verkomplizieren. Durch Ausdehnung der zentralen Nekrose und Einreißen der Endotheldecke entleert sich der atherosklerotische Plaque in das Blut. Durch die Freisetzung dieses thrombogenen Materials kommt es letztlich zum Lumenverschluß des Gefäßes durch Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung. Die Rupturgefahr ist von der Stabilität des Plaques abhängig. Besonders Plaques mit großem Lipidkern weisen ein hohes Rupturrisiko auf , da sie nur von einer dünnen Bindegewebskapsel bedeckt sind.[14] [15] Solange ein Gleichgewicht zwischen der Sekretion von lytischen Enzymen durch inflammatorische Zellen und Proliferation von Muskelzellen besteht, ist der atherosklerotische Plaque weitgehend stabil. Eine überwiegende Freisetzung lytischer Enzyme, zu denen Metalloproteinasen und Plasmin gehören, führen zum ausdünnen der Bindegewebskappe und so droht im weiteren Verlauf die Ruptur.[16] In den letzten Jahren wurden verschiedene Modelle entwickelt, um den komplexen Vorgang der Atheroskleroseentwicklung zu beschreiben. Aktuelle Studien stellen die Bedeutung von inflammatorischen Prozessen in den Vordergrund: Leukozyten wandern entlang eines chemotaktischen Gradienten in das atherosklerotische Gewebe ein und kumulieren in der Läsion.[17] [18] Durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wird die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen, sowie die Synthese von Matrixproteinen, induziert. Ein entscheinender Prozess, neben der Inflammation, ist die Proliferation der glatten Muskelzellen.[13] [19] Die proliferierenden Gefäßmuskelzellen differenzieren sich zu sekretorischen Zellen, die weitere Wachstumsfaktoren, Zytokine und extrazelluläre Matrixproteine synthetisieren und so den atherosklerotischen Prozess aufrechterhalten. Es besteht die Vorstellung, dass eine Akkumulation von glatten Gefäßmuskelzellen der Intima sich mit fortschreitendem Alter verdickt und so der Entstehung der atherosklerotischen Läsion vorausgeht.[15] [19] Über den Ursprung der

glatten Muskelzellen existieren unterschiedliche Theorien. So können die Muskelzellen durch Migration aus der Media oder sogar aus der Adventitia über die Lamina elastica interna in die Intima wandern, und so zur Entstehung der Neointima beitragen.[15] Andere Studien zeigen die Fähigkeit embryonaler Endothelzellen sich zu mesenchymalen Zellen zu entwickeln und das „smooth muscle cell actin" zu exprimieren.[20] Eine völlig neue Sicht auf die Herkunft dieser neointimalen glatten Gefäßmuskelzellen zeigen Untersuchungen über im Blut zirkulierenden Progenitorzellen, welche ihren Ursprung im Knochenmark finden.[21 22 23 24]

1.2 Die Rolle des uPA/uPAR- Systems bei der Entstehung von Restenose und Atherosklerose

Neben Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Matrixmetalloproteinasen greift auch das fibrinolytische System direkt in Zellmigration und Zellproliferationsprozesse ein. Insbesondere die Serinprotease Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und ihr spezifischer Rezeptor (uPAR/CD 87) nehmen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Restenose und Atherosklerose ein.[23] Neben der proteolytischen Funktion vermag das uPA/uPAR- System, durch die Aktivierung von Signalkaskaden, direkt in die Proliferation und Migration einzugreifen. Auch bei Prozessen der Wundheilung, Angiogenese und Tumorinvasion ist die Urokinase und ihr Rezeptor zu finden. Experimentell ist es möglich mittels Antisense- Techniken den uPAR zu blockieren und somit Tumorwachstum und- Invasion zu hemmen.[23] Kennzeichnend sowohl für migrierende als auch für proliferierende Zellen, ist eine erhöhte Expression von Urokinase und ihren Rezeptor.[25] So ist auch in der Intima von atherosklerotischen Läsionen eine Überexpression der Komponenten des Urokinasesystems zu finden.[26 27] Die Bestätigung des Einflusses von uPA/uPAR für die Pathogenese von Restenose und Atherosklerose findet sich in tierexperimentellen Studien. So konnte bei uPA- und plasmindefizieneten Mäusen eine verminderte Neointimabildung, nach Gefäßverletzung gefunden werden. Ebenfalls zeigte sich eine reduzierte Migration und Proliferationsrate bei in vitro Untersuchungen an diesen glatten „Knock- out" Gefäßmuskelzellen.[28 29]

1.3 Der PI(3)-K/Akt- Signalweg

Die Balance zwischen der Regulation von Zellwachstum und Zelltod ist entscheidend für die vaskuläre Integrität und die Formierung von Läsionen der Gefäßwand. So zeigen Zellen als Antwort auf verschiedene Stimuli Signalereignisse, welche Zellproliferation oder Apoptose bewirken. Das Gleichgewicht von Wachstum und kontrollierten Zelltod stellt einen wichtigen Angriffspunkt für die Behandlung von vaskulären Erkrankungen dar. Wachstumsfaktoren, wie PDGF, bFGF oder TGFb aktivieren die Map- Kinase über einen Erk1/2 abhängigen Weg und beeinflussen die Zelldifferenzierung und mitogene Zellantwort. Wachstumsfaktoren, wie IGF-1 oder FCS und Zytokine vermitteln auch über einen Erk1/2 unabhängigen Mechanismus ihre zelluläre Aktivität.[30] An dieser Stelle ist die Serine/Threonin- Kinase Akt (Proteinkinase B) zu nennen. Die Proteinkinase B spielt eine Schlüsselrolle in der Matrix- adhäsion, Integrin- Signalvermittlung und Suppression des apoptotischen Zelltodes.[31] Die Aktivierung von Akt ist von der Phosphoinosid 3-OH Kinase (PI(3)-K) abhängig. Die Phosphoinositid 3-OH Kinase gehört zu einer Enzymgruppe, welche die Phosphorylierung der 3. Position des Inositolringes vom Phosphatidylinositol vermittelt. Die PI(3)-K wird durch Tyrosinkinasen und G- Protein gebundene Rezeptoren aktiviert.[32] Nach ihrer Aktivierung generiert sie PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5 tri- Phosphat). Dieses phosphorylierte Lipidprodukt fungiert als „Second Messanger“ und rekrutiert die Proteinkinase B (Akt) über die Bindung der PH- Domäne, an die Plasmamembran. Dort erfolgt die Phosphorylierung der PKB, an Threonin 308 und Serin 473 durch die PDK1 bzw. PDK2. Inaktiviert wird die Proteinkinase B entweder durch direkte Dephosphorylierung mittels der Phosphatase PP2A oder durch den Abbau des Lipidproduktes, PIP3, über die Wirkung von PTEN.[33] In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von weiteren Liganden identifiziert, welche die Wirkung der Proteinkinase B hemmen. Dazu gehören beispielsweise das „Carboxyl Terminale Modulator Protein“ (CTMP) oder auch das Trb3, das die Akt Aktivierung in Hepatozyten hemmt.[34] In ihrer aktiven Form stellt die Proteinkinase B ein wichtiges Schlüsselprotein im Pathomechanismus des zellulären Überlebens dar. So hat sie einen direkten Einfluss auf die Apoptose, durch Inaktivierung von pro- apoptotisch

wirkenden Proteinen. Ebenso zeigt sich die Beteiligung durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, Proteinsynthese und über die Regulierung von zellmetabolische Prozessen.[35]

2 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung des uPA/uPAR- Systems für die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen untersucht werden. Im Einzelnen sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

- Welchen Einfluss hat uPA auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen?
- Wird die Wirkung über den uPA- Rezeptor (uPAR) vermittelt und gibt es Hinweise für Korezeptoren?
- Wo ist der uPAR lokalisiert?
- Welche Rolle spielen die intrazellulären Aktivierungs- und Signalwege über die Proteinkinasen A, B, C und G, die PI(3)- Kinase, Src- Kinase, p38 Map- Kinase und die Erk p42/44 Kinase?

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Akku Pipetierhilfe	HIRSCHMANN, Eberstadt
Beta Counter 2000 CA	PACKARD INSTRUMENTS, Downers Grove,USA
Biofuge Fresco	HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau
Blockthermostat 1302	HAEP LABOR CONSULT, Bovenden
Elektrophoresekammer	BIO- RAD, München
Feinwaage	SARTORIUS, Göttingen
Grobwaage	SARTORIUS ,Göttingen
High Voltage Power Pack P30	BIOMETRA, Göttingen
Hyperfilm ECL	AMERSHAMM PHARMACIA, Braunschweig
Inkubator 1000	HEIDOLPH, Kehlheim
Magnetrührer Ikamag	IKA LABORTECHNIK, Staufen
Mikroskop DMIL	LEICA, Wetzlar
Mikrotiterplatte	GREINER, Frickenhausen
Mini-Blot Gelapparatur	BIO-RAD, München
Nitrozellulose Blot Membran (Hybond ECL)	AMERSHAMM PHARMACIA, Braunschweig
PC Pentium 600	UNI-COMP, Giessen
pH- Meter 526	WTW, Weilheim
Photometer SLT Spectra	SLT LABINSTRUMENTS, Crailsheim
Pipetten	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Reaktionsgefäße 0,65/ 1,5/ 2ml	EPPENDORFF, Hamburg
Röntgenkassette	AMERSHAMM PHARMACIA, Braunschweig
Scanner (HP Scanjet 2300C)	ALTERNATE, Linden
Schüttler Duomax 1030	HEIDOLPH, Kehlheim

Szinillationsgefäße	GREINER, Frickenhausen
Serologische Einmalpipetten	BECKTON DICKINSON, Heidelberg
Sterile Zellkultur-Arbeitsbank	HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau
Whatman-Filterpapier	SCHLEICHER&SCHÜLL, Dassel
Zentrifuge	HETTICH, Tuttlingen
Zentrifugenröhrchen	GREINER, Frickenhausen
Zellkultur- Platten	GREINER, Frickenhausen

3.2 Chemikalien

Accutase	PAA LABOR, Linz, Österreich
30 % Acrylamidstammlösung	ROTH, Karlsruhe
8 % Bisacrylamid	ROTH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	SIGMA, Steinheim
Aprotinin	SIGMA, Steinheim
Aqua dest	BRAUN, Melsungen
BSA (Bovines Serum Albumin)	BIO-RAD, München
Bromphenolblau	ROTH, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA, Steinheim
Dulbecco's 1x PBS (Phosphat buffer saline)	PAA LABOR, Linz, Österreich
ECL Plus (Western blotting detection reagent)	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
Ethanol	RIEDEL-DE HAEN, Seelze
FBS (Foetal Bov. Serum)	PAA LABOR, Linz, Österreich
Forskolin	SIGMA, Steinheim
Glycerol	SIGMA, Steinheim
Glycin	ROTH, Karlsruhe
HCl 37,3 % (rauchend)	SIGMA, Steinheim
HCl (1N)	MERCK, Darmstadt
HMW – uPA (human Urokinase)	AMERICAN DIAGNOSTIC
Isopropanol	MERCK, Darmstadt
Leupeptin	SIGMA, Steinheim
L-Glutamin	PAA LABOR, Linz, Österreich
Methanol	RIEDEL-DE HAEN, Seelze

Methyl 3H-Thymidin	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
2-Mercaptomethanol	SIGMA, Steinheim
Milchpulver	BIO-RAD, München
NaCl	ROTH, Karlsruhe
NaOH (1N)	MERCK, Darmstadt
Natrium Deoxycholat	SIGMA, Steinheim
Natrium Orthovanadat	ACROS, Geel, Belgien
NP 40 (Igepal CA-630)	SIGMA, Steinheim
Ocadaic acid	SIGMA, Steinheim
PDGF-BB (human) (Human Platelet-Derived Growth Factor)	R&D Systems,
Penicillin/Streptomycin	PAA LABOR, Linz, Österreich
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	SIGMA, Steinheim
Protein Assay (A, B, C)	BIO-RAD, München
Rainbow marker	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
Szintillationsflüssigkeit	ROTH, Karlsruhe
SDS ultra pure (Sodium Dodecyl Sulfat)	ROTH, Karlsruhe
TCA (Trichloroacetic Acid)	SIGMA, Steinheim
TEMED (N,N,N,N, - Tetra-Methylthylenediamin)	BIO-RAD, München
Trizma Base	SIGMA, Steinheim
Trypsin EDTA	GIBCO
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaureat)	SIGMA, Steinheim

3.3 Antikörper

Primärantikörper

	Akt	**p-Akt (ser 473)**	**Cdk4**
Wirt	Kaninchen	Kaninchen	Kaninchen
Isotyp	IgG polyklonal	IgG polyklonal	IgG polyklonal
Konzentration	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml
Verwendete Konzentration	1:500	1:1000	1:1000
Lagertemperatur	4-8 °C	-20 °C	4-8 °C
Bezug	Upstate	New England	Santa Cruz

(alpha anti Aktin: IgG monoklonal: Maus monoklonaler Antikörper, verwendete Konzentration 1:500, Largertemp.-20 °C, Konzentration: 5 µg/ml, Bezug: Cymbus, Wirt: Maus)

Sekundärantikörper

	Anti-Maus	**Anti-Kaninchen**
Isotyp	IgG- HRP	IgG- HRP
Wirt	Ziege	Ziege
Konzentration	200 µg/500 µl	200 µg/500 µl
Verwendete Konzentration	1:2000	1:2000
Lagertemperatur	2-8 °C	2-8 °C
Bezug	Santa Cruz	Santa Cruz

3.4 Inhibitoren

Substanz	Hemmung	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Wortmannin	PI(3)- Kinase	100 nMol/l	Sigma, Deishofen, Deutschland
Ly 294002	PI(3)- Kinase	50 µMol/l	Biomol, Plymouth Meeting, Pennsylvania, USA
PD 98059	p42/44 Map-Kinase	5 µMol/l	Calbiochem, La Jolla, Californien, USA
SB 203580	p38 Map- Kinase	10 µMol/l	Calbiochem, La Jolla, Californien, USA
KT 5720	Protein- Kinase A	10 µMol/l	Calbiochem, La Jolla, Californien, USA
Staurosporin	Protein- Kinase C	2 nMol/l	Boehringer Mannheim, Biochem. Mannheim, Deutschland
KT 5823	Protein- Kinase G	1 µMol/l	Calbiochem, La Jolla, Californien, USA
ß- Cyclodextrin	Caveolin/Caveolae	10 mMol/l	Sigma, Deishofen, Deutschland

Substanz	Hemmung	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
PP-1	Src- Kinase (fyn, v-src)	10 µMol/l	Calbiochem, La Jolla, Californien, USA
H 89 Dihydrochlorid	Protein- Kinase A	20 µMol/l	Calbiochem, La Jolla, Californien, USA
Pertussis Toxin	Protein G	500 ng/ml	Sigma, Deishofen, Deutschland
CJ 435, CJ 463	Proteolytische uPA- Aktivität, Plasmin, tPA, Thrombin, Trypsin	CJ 435: 25 µMol/l CJ 463: 30 µMol/l	Dr. J.Stürzebecher, Zentrum für vaskuläre Biologie der Universität Jena, Deutschland

3.5 Zellkultur

Primärkulturen glatter vaskulärer Muskelzellen wurden mittels Explant (Outgrooth) Methode aus der Aorta von C 57/ BL 6 Mäusen isoliert.
Die humanen glatten koronararteriellen Gefäßmuskelzellen wurden von der Firma BioWhittaker Inc., Walkersville, USA bezogen und stammen von einem 58-jährigen männlichen Spender.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von ca. 3500 Zellen/cm^2 auf Sechsfach-Zellkulturplatten bzw. auf 24-fach- Zellkulturplatten (für den 3H Thymidin Einbau) ausgesät. Die Zellen wurden in 10 % -igem FBS/DMEM/F12- Medium (Zellen Maus) bzw. in SmGM- Medium, der Firma BioWhittaker Inc. (Humane Zellen), kultiviert. Die konfluenten Kulturen wurden weitere zwei Tage (Maus) bzw.

20 Stunden (Human) in serumfreiem Medium kultiviert, um sie zu synchronisieren und in den Ruhestand zu versetzten. Vor Beginn der Versuche wurde das serumfreie Medium erneut gewechselt. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Stimulatoren und Inhibitoren.
Für die Versuche wurden Zellen in den Passagen 5 bis 9 verwendet. Die Stimulation der Zellen mit Urokinase erfolgte in einer Konzentration von 50 nMol/l. PDGF wurde mit einer Konzentration von 20 ng/ml eingesetzt. Der Zeitraum der Behandlung erstreckte sich von 12 Minuten für die Western Blot Analyse bzw. über 24h für die 3H- Thymidin Einbau Proliferationskontrolle. Für den PI(3)- Kinase Assay wurden die Zellen über 30 Minuten und auch über 60 Minuten stimuliert. Die Vorinkubation der Zellen mit den unterschiedlichen Inhibitoren erfolgte über 60 Minuten für die Western Blot Analyse und für 2 Stunden für den 3H- Thymidin Einbau. Die verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren sind in der obenstehenden Tabelle aufgeführt.

3.6 Western Blot

Proteinbestimmung:

DC Protein Assay der Firma Bio-Rad

Reagent A	
1-5 %	Natriumhydroxid
<1 %	Natriumtartrat
< 1 %	Kupfersulfat in destilliertem Wasser

Reagent B	
<1 %	Lithiumsulfat
<1 %	Tungstische Säure
<1 %	Molybden Säure
<1 %	Salzsäure
<1 %	Phosphorische Säure in destilliertem Wasser

Reagent S

5-10 %	Natriumdodecylsulfat in destilliertem Wasser

RIPA Puffer:

1x	PBS ohne Calcium und Magnesium
1 %	NP 40
0,5 %	Natriumdeoxycholat
0,1 %	SDS ad 500 ml H_2O, Lagerung bei 4 °C

Inhibitoren (bei jedem Ansatz frisch hinzugeben)

10 µl/ml	von 10 mg/ml PMSF in Isopropanol
30 µl/ml	Aprotinin
10 µl/ml	100 mM Natrium Orthovanadat
1 µg/µl	Leupeptin in H_2O
10 mM	Ocadaic acid in H_2O

5 x Elektrophoresepuffer

15,1 g	Tris
94 g	Glycin
50 ml	10 % SDS zugeben, ad 1000 ml Aqua dest.

10 x Probepuffer

625 mM	Tris pH 6,8
20 %	SDS
50 %	Glycerol
0,3 %	Bromphenol
9 %	Mercaptoethanol
(V/V)	

Transferpuffer

25 mM	Tris	3,03 g
192 mM	Glycin	14,4 g
20 %	Methanol	200 ml
0,1 %	SDS (optional)	10 ml 10 % SDS
	ad 1000 ml Aqua dest.	

Strippingpuffer

100 mM	Mercaptoethanol
62,5 mM	Tris pH 6,8
2 %	SDS

Waschpuffer

1 x	PBS
0,1 %	Tween 20 (vor Gebrauch zugeben)
	pH 7,6
	ad 1000 ml Aqua dest.

Blocklösung

1 x	PBS
0,1 %	Tween 20
7,5 %	Magermilchpulver

Polyacrylamidgel

Sammelgeld (5 %)

Aqua dest.	3,5 ml
30 % Acrylamid Stammlösung	830 µl
1M Tris (pH 6,8)	635 µl
10 % Natrium (Sodium) Dodecylsulfat (SDS)	50 µl
10 % Ammoniumpersulfat	25 µl
Temed	7,5 µl

Trenngel: (10 %)	
Aqua dest.	4,0 ml
30 % Acrylamid Stammlösung	5,0 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	5,6 ml
10 % Natrium (Sodium) Dodecylsulfat (SDS)	150 µl
10 % Ammoniumpersulfat	150 µl
Temed	15 µl

Präparation der Zellysate

Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde der DC Protein Assay der Firma Bio-Rad verwendet, der auf der nach *Lowry* modifizierten Methode beruht.
Als interner Standard zur Proteingehaltbestimmung in µg/µl wurde BSA (Bovines Serum Albumin 0,17 µg; 0,35 µg, 0,7 µg; 1,4 µg) verwendet.
Von den Proben wurden jeweils 5 µl in eine Küvette gegeben und anschließend mit Aqua dest. auf 10 µl aufgefüllt. In jede Küvette wurde dann 25 µl Reagenz A` (1000 µl Reagenz A, 20 µl Reagenz S) und 200 µl Reagenz B gegeben.
Der RIPA Lysepuffer wurde als extra Probe gemessen und das Ergebnis vom Proteingehalt der jeweiligen Probe abgezogen.
Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten konnte die maximale Absorption bei 750 nm mittels Photometer bestimmt werden.
Jede Proteinbestimmung erfolgte doppelt, um so über die Bildung des Mittelwertes Pipettierungenauigkeiten zu minimieren.

Proteinaufbereitung

Die folgenden Schritte fanden auf Eis statt. Pro Probe wurden 20 µg Gesamtprotein eingesetzt.
Das der Proteinmenge entsprechende Lysat- Volumen wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, ein zweifach konzentrierter Ladepuffer zugegeben und bis auf das gewünschte Endvolumen mit Aqua dest. aufgefüllt Das im Ladepuffer enthaltene SDS umhüllt bei diesem Schritt die Proteine und versieht sie so mit einer negativen Ladung.
Ein Gewichtsstandard aus Proteinen unterschiedlicher Größe, die auf dem Gel sichtbare Farbbanden bilden, wurde wie die Lysate aufbereitet.
Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben und ebenso der Gewichtsstandard 5 Minuten gekocht.

Herstellung eines zweischichtigen Polyacrylamidgels (SDS- Page)
nach *Laemmli* (1970)

Das System nach *Laemmli* besteht aus einem oberen Sammelgel und einem sich darunter anschließenden Trenngel. Im Sammelgel werden die Proteine während der Elektrophorese zunächst konzentriert, um dann im Trenngel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt zu werden.
Sammel- und Trenngel wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen und anschließend in die Minigelapparatur eingespannt.
Die zu untersuchenden Moleküle wandern in einem elektrischen Feld durch die Gelmatrix, welche aus einem Gemisch von Acrylamid und Bisacrylamid besteht.
Acrylamid bildet in Anwesenheit freier Radikale in einer Kettenreaktion lange Polymere, Bisacrylamid dient dazu, diese Polymere zu vernetzten. Somit entstehen Gele unterschiedlicher Porengröße zur Separation unterschiedlich großer Proteine.
Als Katalysator dient hierbei TEMED (N, N, N, N - Tetramethylethylendiamid), als Radikalbildner wird Ammoniumperoxodisulfat eingesetzt.
Die Zutaten für das Trenngel wurden in einem Polypropylen - Röhrchen gemischt. Nach dem Start der Polymerisation durch die Zugabe von 10 % APS und TEMED

wurde das Gel sofort zwischen zwei vorbereitete Glasplatten gegossen. Nach einer halben Stunde wurde das Sammelgel auf die gleiche Weise hergestellt, das Trenngel damit überschichtet und ein Kunststoffkamm zur Formung der Ladetaschen eingesetzt. Nach der Auspolymerisierung des Gels, wurde es in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte Minigelapparatur eingespannt.

Elektrophorese und Blot

Während der Elektrophorese wandern Moleküle entsprechend ihrer Ladung und ihrer Größe in einem elektrischen Feld unterschiedlich schnell in Richtung der angelegten Spannung.
Die Elektrophorese dient so der Separation unterschiedlicher Moleküle, um deren spezifischen Nachweis zu erleichtern.
Die Porengröße des Polyacrylamidgels ist hierbei für die unterschiedliche Laufgeschwindigkeit der Proteine je nach ihrer Größe verantwortlich.
Die Elektrophoresekammer des verwendeten vertikalen Systems besteht aus einer oberen und einer unteren Kammer. Das zwischen den beiden Glasplatten befindliche Gel bildet die einzige Verbindung zwischen den beiden Kammern und gewährt den Stromfluss von Kathode zu Anode.
Nach Befüllung der Kammern mit Elektrophoresepuffer wurden die aufbereiteten Proteinlysate und der Gewichtstandard in die entsprechenden Geltaschen geladen. Die Elektrophorese lief mit 90 Volt über einen Zeitraum von einer Stunde. Die sichtbaren Banden des Gewichtsstandards zeigten hier die ausreichende Laufweite der Proteine an.
Für den weiteren Nachweis wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer genommen und auf eine etwa gleich große Nitrozellulosemembran gelegt. Nach 15 minütigem Equilibrieren in Transferpuffer wurden Gel und Membran in einer Klemmvorrichtung in der Blotkammer fixiert. Die Proteine wurden unter einer Spannung von 100 Volt über eine Stunde aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Die nach dem Blot auf der Membran erkennbaren farbigen Gewichtsstandards dienten als Kontrolle für einen effektiven Transfer. Die Membran wurde nun für die weitere Immundetektion verwendet.

Immundetektion

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch Inkubieren in 7,5 % fettfreiem Milchpulver in einfachem (1x) Waschpuffer über eine Stunde geblockt.
Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper in der entsprechenden Konzentration in Milchpulverlösung verdünnt für eine Stunde auf die Membran gegeben.
Um nichtbebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran anschließend für 3x10 Minuten in Waschpuffer geschwenkt und der Überstand verworfen. Nun wurde der Sekundärantikörper in der entsprechenden Konzentration nach den Angaben des Herstellers für eine Stunde auf die Membran gegeben. Anschließend erfolgte ein neuer Waschgang.
Die Detektion der spezifischen Proteine erfolgte mittels eines verstärkten Chemilumineszens- Systems (ECL+) der Firma Amersham. Die Membran wurde für 5 Minuten in der ECL+ Lösung inkubiert, wobei die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase; HRP) die chemilumineszierende Lösung aktiviert.
Anschließend wurde die Membran in einer Dunkelkammer auf einem Röntgenfilm exponiert und der Film entwickelt.

3.7 PI(3)- Kinase Assay

Verwendete Puffer

Lyse Puffer:	50 mM Hepes pH 7,4 100 mM NaCl 50 mM NaF 5 mM Glycerolphosphat 2 mM EDTA 2 mM EGTA 1 mM Vanadat 1 % Igepal (NP- 40) (alternativ 0,5 % Octyglucopyranoside) + PMSF / Aprotinin (frisch dazugeben)
Kinasepuffer:	20 mM Tris/Cl pH 7,4 100 mM NaCl 0,5 mM EGTA
Starterlösung:	200 mM MgCl2 200 µM ATP

Stopplösung:	Chloroform	:	Methanol	:	11,6 N HCl rauchend	
	100	:	200	:	2	
Trennpuffer:	Chloroform	:	Methanol	:	Ammonium-hydroxid	: H_2O
	43	:	38	:	5	: 7

Die Zellen wurden mit kaltem 1x PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml kaltem Lysepuffer pro Petrischale lysiert. Das Lysat wurde mit einer 20G Kanüle geschert, für 30 Minuten auf Eis gelagert und danach für 15 Minuten in der auf 4 °C

gekühlten Eppifuge bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Abheben des Überstandes erfolgte die Proteinbestimmung und der anschließende Volumenausgleich mit Lysepuffer.

Immunpräzipitation

Pro Ansatz wurden 10 µl Protein G Dynabeads mit 2 µg PI(3)- Kinase Antikörper (Maus; Transductions lab) beladen und über 2 Stunden bei 4 °C unter Rotation inkubiert.

Vorbereitung des Substrats

100 µl Phosphatidylinositol (P57661; Firma Sigma, 10 mg/ml in Chloroform) wurden in einer Eppifuge bei 13000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, bis das Chloroform verdampft war (20-30 Minuten; Loch im Deckel).
Jetzt wurde das Phosphatidylinositol in 1 ml des PI(3)- Kinasepuffers aufgenommen, sonifiziert und auf Eis gelagert, bis die Lösung trüb wurde und anschließend mit Kinasepuffer auf ein Endvolumen von 3 ml aufgefüllt. Das Immunpräzipitat wurde zweimal mit Lysepuffer und einmal mit Kinasepuffer gewaschen und das Pellet in 50 µl des Substrats aufgenommen.
Nun erfolgte die Zugabe von 5 µl Starterlösung und 5 µCi Gamma 32 ATP pro Ansatz und die Proben wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 120 µl Stopplösung angehalten.
Mit Hilfe des Magnetständers wurden die Dynabeads präzipitiert und verworfen und der Überstand in ein neues Eppendorf- Röhrchen transferiert. Jetzt wurde Chloroform hinzugegeben, für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und somit eine Phasentrennung erreicht. Die organische (untere) Phase wurde entnommen, in ein frisches Eppendorf- Röhrchen transferiert und es wurden 120 µl Methanol – 1 N HCl (1 : 1) dazugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren wurde die organische Phase (ca. 110 µl) in einer Eppifuge bei 13000 rpm zentrifugiert, bis das Chloroform verdampft (Loch im Deckel) war. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl Chloroform gelöst.

Die Proben wurden auf eine Kieselgelplatte (20 x 20, Fa. Merck 413894) aufgetragen und die Platte wurde für ca. 1 Stunde in die Trennkammer (Trennpuffer s.o.) gestellt.
Hiernach wurde die Platte auf einem Röntgenfilm exponiert und dieser dann anschließen entwickelt.

3.8 3H- Thymidin Einbau als Proliferationskontrolle

Für die kurzfristige Beobachtung der Stoffwechselaktivität der Zelle, wird bei dieser Methode das radioaktiv markierte Nucleosid Thymidin in die DNA eingebaut.

Verwendete Materialien:	Szintillationszählgerät (Beta Counter 2000 CA)
	Szintillationsflüssigkeit (Fa. ROTH, Karlsruhe)
	3H – Thymidin spezifische Aktivität (1 mCi/ml)
	1x PBS
	0,3 N Trichloressigsäure
	95 % Ethanol
	0,25 M NaOH

3H Thymidin Inkorporation:

Das radioaktiv markierte Thymidin wurde bis zu einer Endkonzentration von 10 µCi/ml mit dem Zellkulturmedium (Serumfrei) verdünnt und auf die vorbereiteten Zellen gegeben.
Anschließend erfolgte die Inkubation über 4 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 6 % CO_2.
Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Thymidin Mediumgemisch von den Zellen abgesaugt und es folgten zwei Waschgänge mit 1x PBS. Anschließend wurden die Zellen mit kalter 10 % Trichloressigsäure (TCA) gewaschen und danach mit der TCA für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die TCA abgesaugt und es erfolgten nun zur Membranlyse der Zellen zwei

Waschschritte mit 95 % Ethanol. Anschließend wurden die Zellkulturplatten 10 Minuten getrocknet, mit 250 µl/well der 0,25 M NaOH versetzt. Die weitere Auswertung mittels Beta Counter erfolgte, nach einer Ruhezeit von etwa 12 Stunden bei 4 °C, am nächsten Tag.

Auswertung mittels Szintillationszählgerät:

150 µl Lysat jeder Probe wurden in ein entsprechendes Szintillationsgefäß mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit überführt. Anschließend erfolgte die Auswertung der Proben im Beta Counter

3.9 Statistische Analyse

Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte +/- der mittleren Standardabweichung dargestellt. Alle Experimente einschließlich der Western Blots wurden mindestens 3x durchgeführt.

Die Statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (Microsoft Exel).

Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 uPA aktiviert die Zellproliferation in glatten Gefäßmuskelzellen

Zunächst untersuchten wir, welchen Einfluss uPA auf die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen hat. Die Verwendung des radioaktiv markierten Nucleosids Thymidin ermöglicht die kurzfristige Beobachtung der Stoffwechselaktivität der Zelle. Dazu verglichen wir den Thymidineinbau bei stimulierten (24 h uPA bzw. PDGF) und nicht stimulierten Zellen. Dabei konnten wir einen deutlichen Anstieg des Thymidineinbaus bei den stimulierten Zellen beobachten (Abbildung 1).

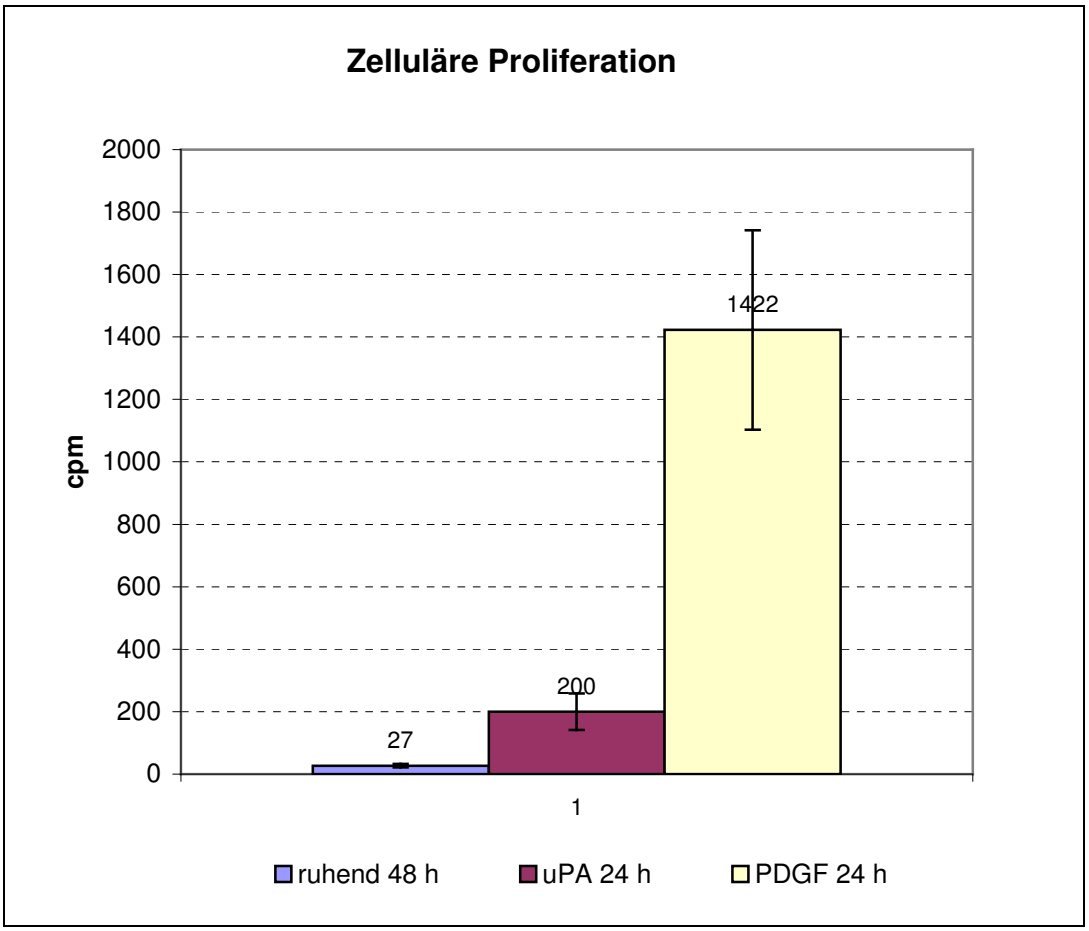

Abbildung 1 Glatte Gefäßmuskelzellen der Maus in den Passagen 7-9 wurden für 20 Stunden mit uPA (50 nMol/l) bzw. PDGF-BB (20 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden jeweils 10 µl/ml 3H Thymidin dazu gegeben und es

erfolgte die weitere Inkubation für 4 Stunden. Als Vergleich dienten Zellen die für 48 Stunden im serumfreien Medium kultiviert wurden (44 Stunden serumfrei und weitere 4 Stunden Inkubation mit 3H Thymidin). Die Auswertung erfolgte nach Aufarbeitung der Proben im Beta Counter. Die Angaben sind in Counts per minute gemacht. Bei der Datendarstellung handelt es sich um Mittelwerte +/- Standardabweichung eines repräsentativen Versuches mit n = 5.

Statistische Auswertung:

ruhend 48 h zu uPA 24 h: p = 0,001299

ruhend 48 h zu PDFG 24 h: p = 0,000307

PDGF 24 h zu uPA 24 h: p = 0,000409

Im nächsten Schritt testeten wir, welchen Einfluss verschiedene pharmakologische Inhibitoren, von an der Signaltransduktion beteiligten Proteine, auf die Proliferation der uPA stimulierten Zellen haben. Dazu erfolgte vor der uPA- Stimulation (50 nMol/l) eine Vorinkubation mit den entsprechenden Inhibitoren für 2 Stunden. Dabei wurden die Inhibitoren der PI(3)- Kinase Wortmannin und Ly 294002 mit einer Konzentration von 100 nMol/l bzw. 50 µMol/l eingesetzt. Auch die Inhibitoren der Src- Kinase (PP-1) sowie der Proteinkinase A (KT 5720) wurden in den Konzentrationen von jeweils 10 µMol/l getestet. Wir stellten fest, dass die Inhibitoren der PI(3)- Kinase (Wortmannin und Ly 294002), der Src- Kinase (PP-1), sowie der Proteinkinase A (KT 5720) die uPA induzierte Zellproliferation deutlich hemmen (Abbildung 2). Unsere Ergebnisse zeigen, dass uPA die Zellproliferation stimuliert und das die PI(3)- Kinase, die Src- Kinase und auch die Proteinkinase A einen Einfluss auf diese Aktivierung haben.

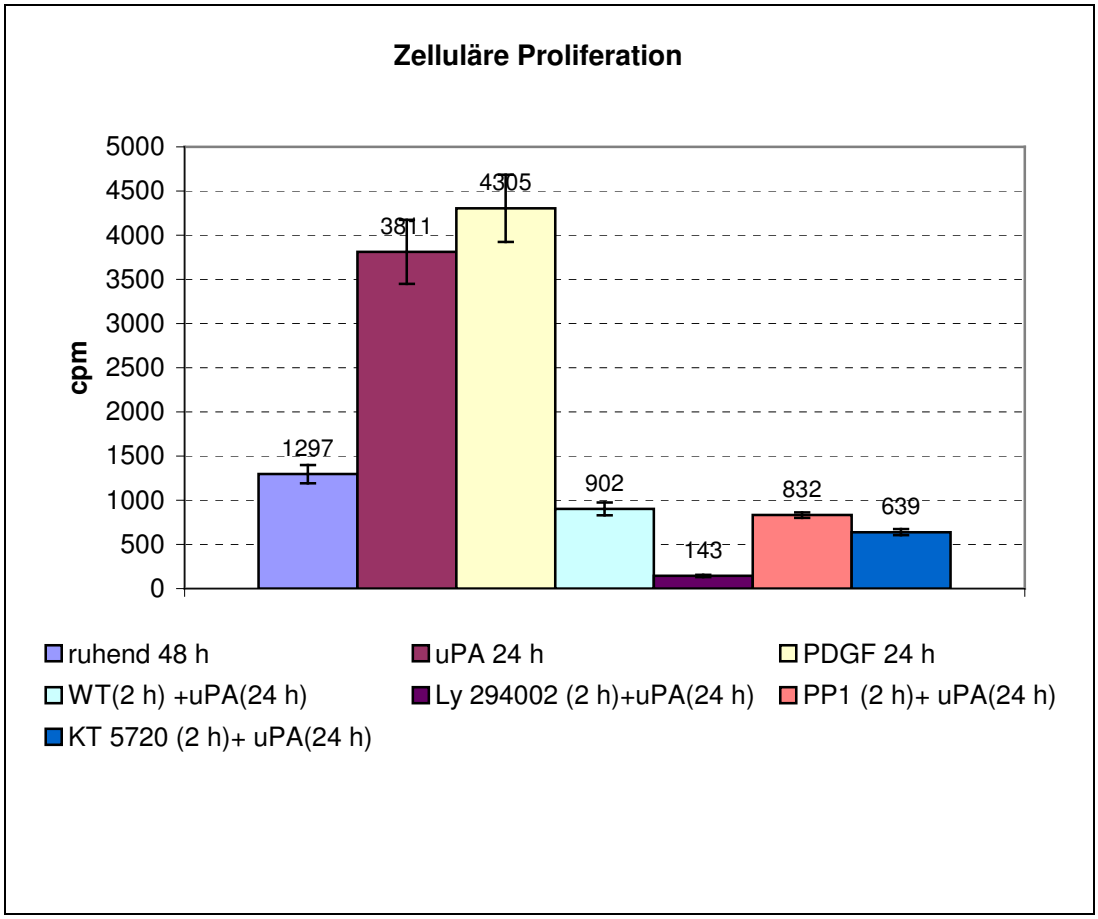

Abbildung 2 Die zelluläre Proliferation von VSMC wurde nach Stimulation mit uPA (50 nMol/l) unter Zugabe von spezifischen Inhibitoren untersucht. Dazu wurden die Zellen, in den Passagen 7-8, mit den Inhibitoren für 2 Stunden vorinkubiert anschließend mit uPA über 20 Stunden behandelt und unter Zugabe von 10 µl/ml 3H Thymidin für weitere 4 Stunden inkubiert. Die Auswertung erfolgte im Beta Counter. Dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung mit n = 4. Als Kontrolle dienten ruhende Zellen (48 h serumfrei) sowie Zellen die mit PDGF (20 ng/ml) behandelt wurden. Es zeigt sich, dass die Inhibitoren von PI(3)- Kinase, Src- Kinase und Proteinkinase A die durch uPA stimulierte Zellproliferation deutlich hemmen.

4.2 uPA aktiviert die PI(3)- Kinase

Im Proliferationsversuch zeigte sich, dass die Inhibitoren der PI(3)- Kinase den Thymidineinbau in die Zelle und somit die DNA- Synthese nach uPA Stimulation hemmen. Wir untersuchten nun im nächsten Schritt, ob die PI(3)- Kinase mittels uPA direkt aktiviert wird. Dazu wurde ein PI(3)- Kinase Aktivitätsassay durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Aktivität der PI(3)- Kinase 30 Minuten nach uPA Stimulation deutlich Anstieg. Als Vergleich dienten nicht stimulierte Zellen, sowie Zellen, die mit PDGF (12 Minuten) behandelt wurden (Abbildung 3).
Wir konnten somit zeigen, dass die PI(3)- Kinase durch uPA stimulierbar ist.

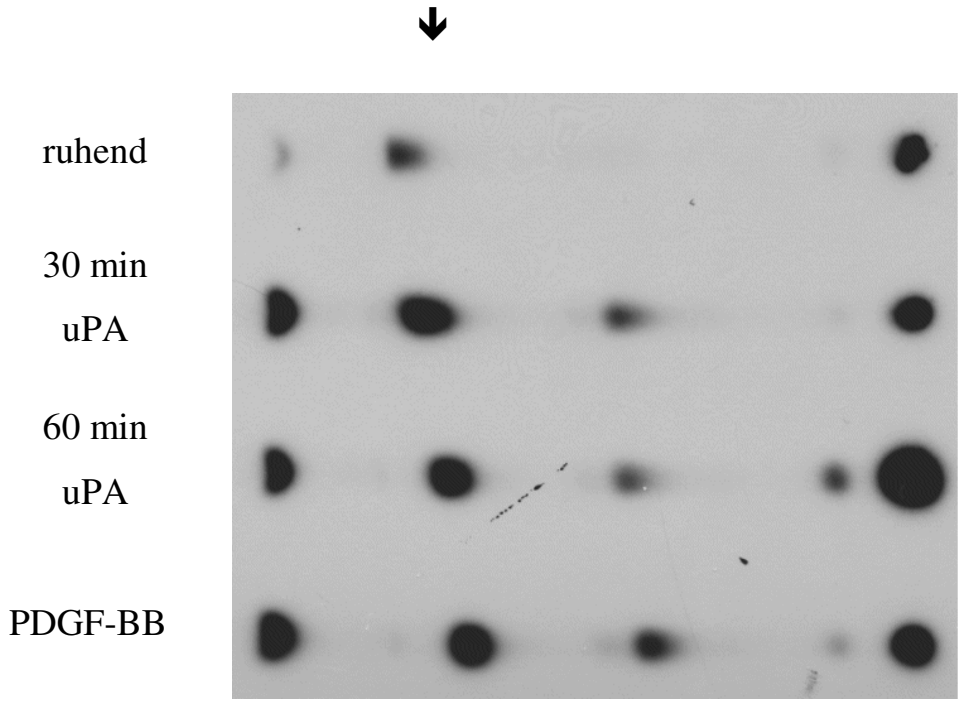

Abbildung 3 Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden über 30 bzw. über 60 Minuten mit uPA (50 nMol/l) stimuliert. Als Vergleich dienten VSMC, die für 12 Minuten mit PDGF-BB (20 ng/ml) behandelt wurden, sowie unbehandelte Zellen. Nach ihrer Lyse wurde mittels Phosphataseassay die PI(3)- Kinase Aktivität bestimmt. Der Blot zeigt eine deutliche Zunahme der PI(3)- Kinase Aktivität (Pfeil) nach Stimulation mit uPA.

4.3 Die Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt) wird durch uPA stimuliert

In der Signalkaskade erfolgt nach der Aktivierung der PI(3)- Kinase die Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt). Der PI(3)-K/Akt- Signalweg ist verantwortlich für eine Reihe von Ereignissen, die der Zelldifferenzierung und dem Zellüberleben dienen. Wir untersuchten nun, ob Akt durch uPA aktiviert wird. Dabei richtete sich unsere Aufmerksamkeit auf die Phosphorylierung des Akt an der Ser 473 Domäne. Wir stimulierten die Zellen für jeweils 12 Minuten mit uPA und verglichen sie mit PDGF (12 Minuten) behandelten, sowie unstimulierten Zellen. Die Auswertung erfolgte mittels Western Blot (Abbildung 4). Man sieht, dass uPA die Proteinkinase B phosphorylieren und somit aktivieren kann.

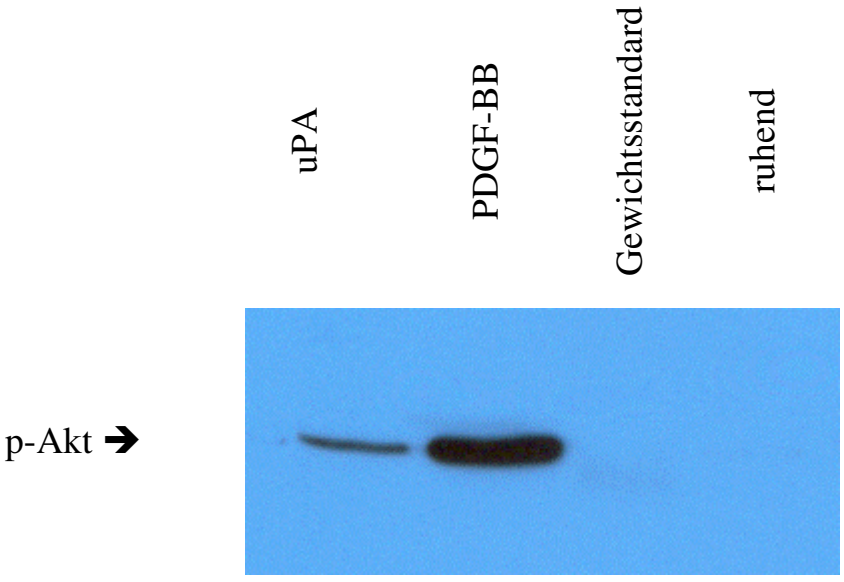

Abbildung 4 zeigt die Aktivierung der Proteinkinase B(Akt) nach Behandlung der Zellen für 12 Minuten mit uPA (50 nMol/l). Die mitogene Stimulation mit PDGF-BB (12 Minuten) diente als positiver Vergleich und wurde mit einer Konzentration von 20 ng/ml eingesetzt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Zur Auswertung im Western Blot wurde ein Antikörper benutzt, der die Phosphorylierung des Akt an der Ser 473 Domäne anzeigt. Der Versuch wurde 4 mal durchgeführt.

4.4 uPA interagiert über einen spezifischen Rezeptor (uPAR)

Da die uPA auch über ihre proteolytische Funktion Matrixmetalloproteinasen und Wachstumsfaktoren freisetzen kann, stellte sich die Frage, ob die Aktivierung des Akt durch diesen Effekt hervorgerufen wird oder ob die Interaktion von uPA/uPAR zu einer Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) führt.

Mit Hilfe hochspezifischer pharmakologischer Inhibitoren (CJ 435 und CJ 463) konnten wir die proteolytische Aktivität der uPA hemmen. CJ 435 und CJ 463 wirken ebenfalls inhibitorisch auf Plasmin, Trypsin, tPA und Thrombin. In der eingesetzten Konzentration ist die Inhibition dieser Enzyme allerdings nur minimal.[36] Für diesen Versuch wurden die Zellen 1 Stunde mit dem jeweiligen Inhibitor präinkubiert und anschließend mit uPA (50 nMol/l) für weitere 12 Minuten behandelt. Als Vergleich dienten unbehandelte Zellen, sowie Zellen, die mit uPA (ohne Inhibitor) bzw. mit PDGF (20 ng/ml) stimuliert wurden. Zur Versuchsauswertung diente der Western Blot.

Es zeigte sich, dass auch in den mit den entsprechenden Inhibitoren behandelten Zellen, das p-Akt deutlich hochreguliert wurde. (Abbildung 5)

Dies lässt vermuten, dass die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) durch uPA über die Interaktion mit dem uPAR erfolgt.

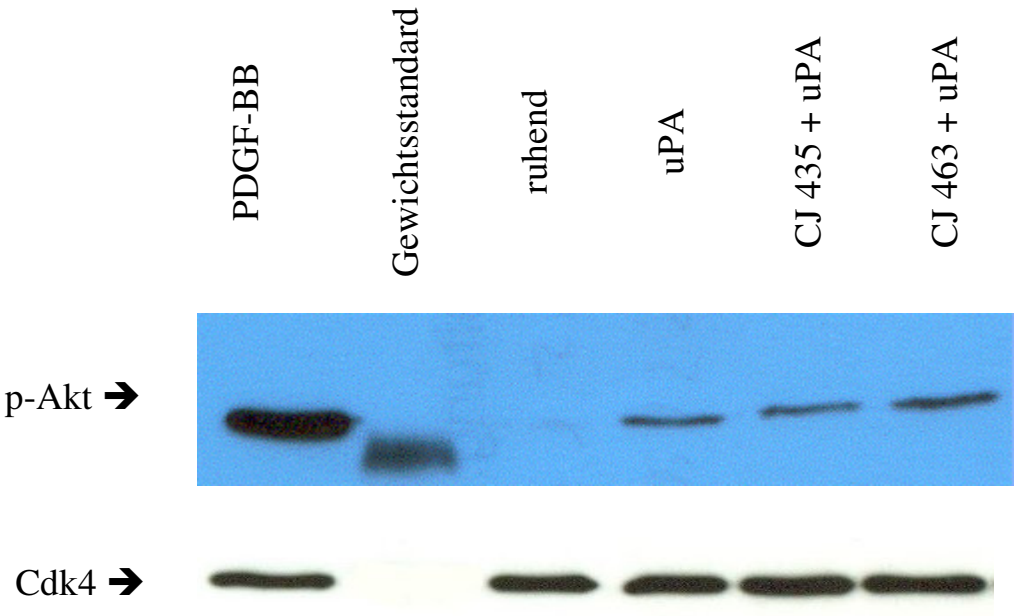

Abbildung 5 Die Zellen wurden mit Inhibitoren der uPA vorinkubiert (1 Stunde) und dann mit uPA (12 Minuten) stimuliert. CJ 435 wurde mit einer Konzentration von 25 µMol/l eingesetzt. Der Inhibitor CJ 463 wurde mit 30 µMol/l konzentriert. Der Proteingehalt von p-Akt wurde im Western Blot bestimmt, n = 3. Zum Nachweis gleicher Proteinbeladung der Proben diente Cdk4 als „housekeeping protein“ Trotz Einsatz von Hemmstoffen der proteolytischen uPA Aktivität konnte p-Akt hochreguliert werden.

4.5 uPAR ist in den Caveolae lokalisiert

In verschiedenen Zellarten gibt es die als Caveolae bezeichneten Einstülpungen der Plasmamembran. In diesen cholesterinreichen Signalzentren wird auch die Lokalisation des uPAR vermutet. Wir untersuchten welchen Einfluss die Zerstörung der Caveolae durch den Einsatz von Cyclodextrin auf die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) mittels uPA hat. Cyclodextrin vermag, durch die Herauslösung von Cholesterin aus der Plasmamembran, die Funktionseinheit dieser Mikrodomänen zu unterbrechen.

Dazu erfolgte über 1 Stunde die Vorinkubation der Zellen mit Cyclodextrin (10 mMol/l) und anschließend die Stimulation mit uPA (12 Minuten) mit einer Konzentration von 50 nMol/l. Als Vergleich dienten unbehandelte Zellen sowie Zellen die nur für 12 Minuten mit uPA stimuliert wurden ebenso wie Zellen

die mit PDGF (20 ng/ml für 12 Minuten) behandelt wurden (Abbildung 6). Zur Darstellung der Ergebnisse erfolgte die Auswertung durch den Western Blot. Die Versuche wurden 3 mal durchgeführt. Man sieht, dass durch die Behandlung der Zellen mit Cyclodextrin eine deutlich verminderte Aktivierung des Akt erfolgt. Dieses Ergebnis erlaubt die Schlussfolgerung, dass der uPAR in den als Caveolae bezeichneten Mikrodomänen der Plasmamembran lokalisiert sein kann.

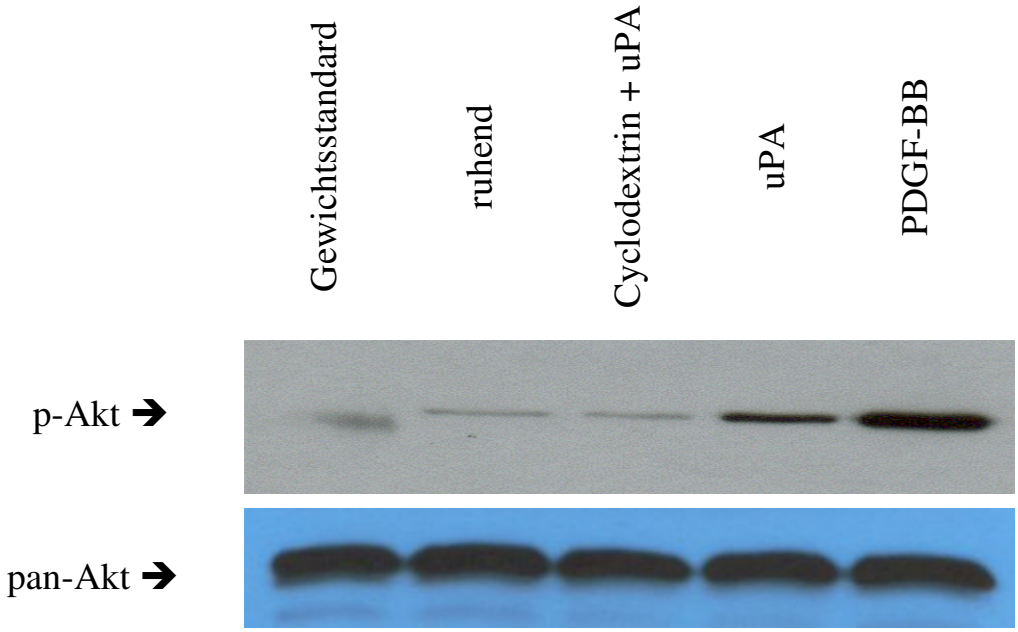

Abbildung 6 Der Proteingehalt an phosphorylierten Akt der mit Cyclodextrin behandelten Zellen weist im Western Blot deutlich geringere Werte auf, als die nur mit uPA stimulierten Zellen. Pan- Akt diente zum Nachweis gleicher Proteinbeladung der Proben.

4.6 uPAR ist über einen G- Protein gekoppelt

Der uPAR besteht aus 3 homologen Domänen und ist durch ein Glykosylphosphatidylinositol- Anker an der Zellmembran angeheftet. Um die intrazelluläre Signalvermittlung zu ermöglichen benötigt der uPAR ein Adapter. Als mögliche Adaptermoleküle werden u.a. Integrine, Caveolin und G- Proteine diskutiert.[27] [28] Wir untersuchten nun in diesem Zusammenhang, ob die uPA/uPAR abhängige Akt- Aktivierung an ein G- Protein gekoppelt ist. Dazu behandelten wir die Zellen mit Pertussis- Toxin, das bekanntlich eine hemmende Wirkung auf G-Proteine (Giα) hat. Die Zellen wurden 1 Stunde mit Pertussis- Toxin (500 ng/ml) vorinkubiert und anschließend 12 Minuten mit uPA (50 nMol/l) behandelt. Als Kontrolle dienten wiederum unbehandelte Zellen und mit PDGF (12 Minuten in einer Konzentration von 20 ng/ml) stimulierte Zellen. Die Auswertung mittels Western Blot zeigte, dass Pertussis- Toxin die uPA vermittelte Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) deutlich vermindert (Abbildung 7). Daher ist bei der uPA/uPAR vermittelten Hochregulation des Akt ein G- Protein als Adaptermolekül zur intrazellulären Signalübertragung anzunehmen.

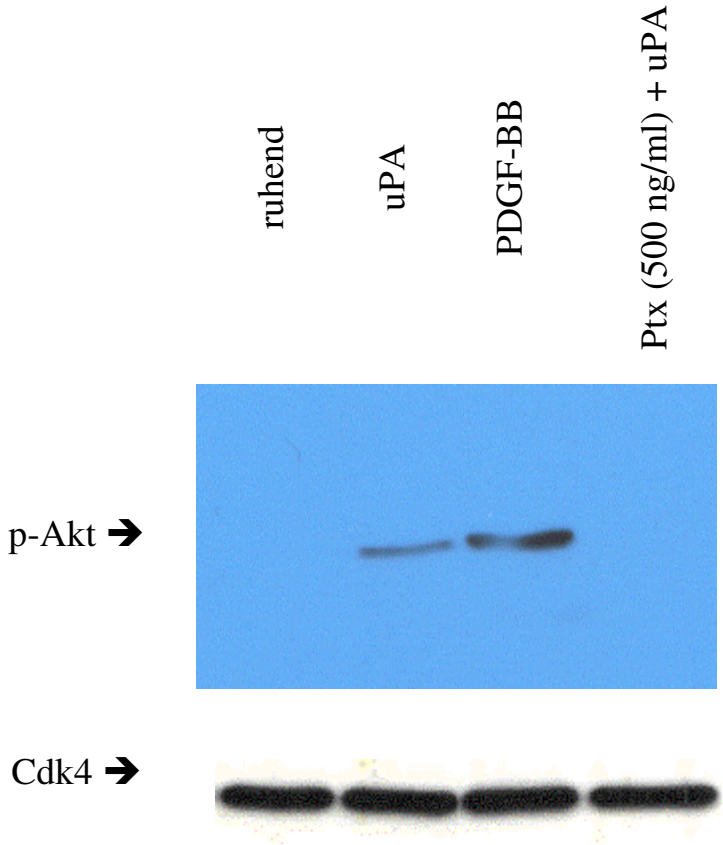

Abbildung 7 Die VSMC wurden über 1 Stunde mit dem G- Proteininhibitor Pertussis Toxin vorinkubiert und anschließend 12 Minuten mit uPA stimuliert. Die uPA vermittelte p-Akt Aktivierung konnte durch Ptx gehemmt werden. Cdk4 diente als „housekeeping- protein“ Der Versuch wurde 3 mal durchgeführt.

4.7 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die uPA vermittelte Akt- Aktivierung

Unser Fokus richtete sich nun darauf, welche Signalwege die uPA induzierte Akt-Phosphorylierung beeinflussen. Aus den unter 4.2. schon beschriebenen Versuchen geht hervor, dass uPA die PI(3)- Kinase hochreguliert. Unsere Fragestellung richtete sich nun darauf, ob diese uPA abhängige PI(3)- Kinase Stimulation zu einer Aktivierung des Akt führt, d.h., ob die Akt- Phosphorylierung von der PI(3)-Kinase abhängig ist. Die VSMC wurden dazu mit den PI(3)- Kinase Inhibitoren Wortmannin (100 nMol/l) und Ly 294002 (50 µMol/l) für 1 Stunde vorinkubiert und anschließend über 12 Minuten mit uPA (50 nMol/l) behandelt. Als Vergleich dienten ruhende (unbehandelte) und mit PDGF (20 ng/ml) stimulierte Zellen (Abbildung 8). Im Western Blot zeigt sich eine deutliche Hemmung der uPA induzierten Akt- Hochregulierung. Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass durch uPA der PI(3)- Kinase/Akt Signaltransduktionsweg aktiviert wird und das uPA/uPAR vermittelte Zellreaktionen über diese Signalkaskade stattfinden können. Neben den PI(3)- Kinase Inhibitoren testeten wir auch andere pharmakologische Hemmstoffe, um den Einfluss weiterer Signalwege zu untersuchen. Es erfolgte dazu die Präinkubation der Zellen mit den Inhibitoren der Src- Kinase (PP1) und der Proteinkinase A (KT 5720) in einer Konzentration von 10 µMol/l, der Erk p42/44- Kinase (PD 98059 mit 5 µMol/l), der p38 Map- Kinase (SB 203580 mit 10 µMol/l), der Proteinkinase C (Staurosporin mit einer Konzentration von 2 nMol/l) und der Proteinkinase G (KT 5823 mit 1 µMol/l).

Man sieht, dass sowohl der Inhibitor der Src- Kinase, als auch der Inhibitor der Proteinkinase A zu einer deutlich verminderten Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) führt (Abbildung 8 und Abbildung 10).

Dies zeigt, dass die uPA induzierte Akt Aktivierung durch die Src- Kinase und auch durch die Proteinkinase A beeinflusst wird. Die Hemmstoffe der anderen untersuchten Kinasen zeigten dagegen keine negative Beeinflussung (Abbildung 8 und Abbildung 10). Somit scheinen sie nicht in die uPA abhängige Akt Phosphorylierung involviert zu sein.

Um den Einfluss der Proteinkinase A noch einmal zu bestätigen, testeten wir noch einen anderen Hemmstoff dieser Proteinkinase (H 89-Dihydrochlorid mit 20 µMol/l). Auch in diesem Versuch zeigte sich, dass die uPA vermittelte Akt Hochregulierung durch die Proteinkinase A beeinflusst wird (Abbildung 10).

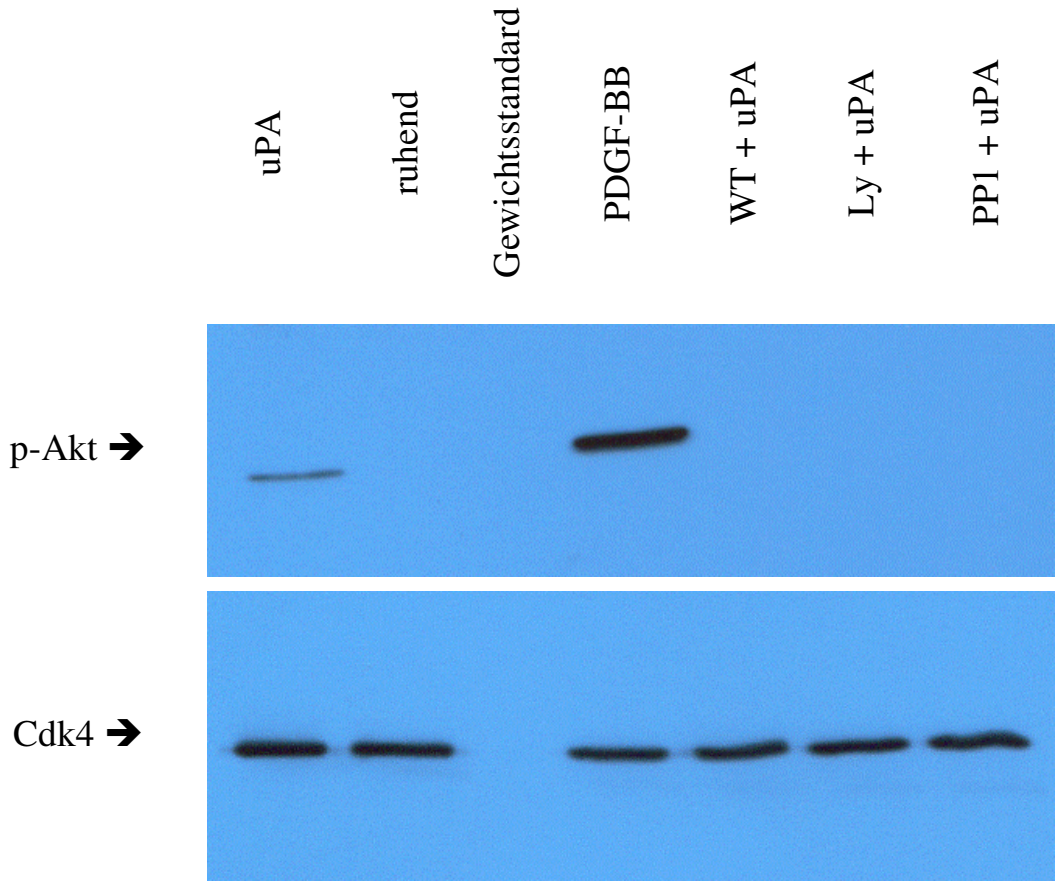

Abbildung 8 Die Vorinkubation der VSMC mit spezifischen pharmakologischen Inhibitoren der PI(3)- Kinase (Wortmannin und Ly 294002) und der Src-Kinase (PP1) konnten die uPA induzierte Akt Phosphorylierung deutlich hemmen. Der Nachweis von Cdk4 diente als „housekeeping protein“ und als Nachweis für eine gleiche Proteinbeladung der einzelnen Proben. n = 3

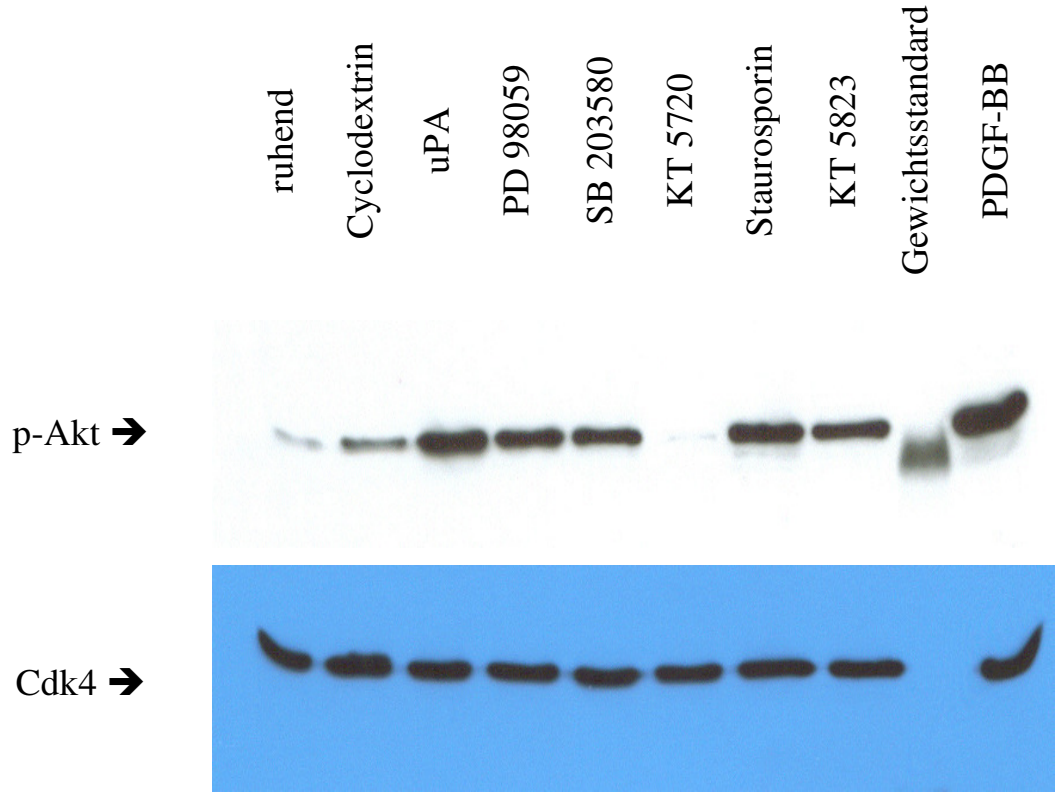

Abbildung 9 Der Inhibitor der Proteinkinase A (KT 5720) konnte die Akt Phosphorylierung vermindern. Die anderen noch untersuchten Signalwege, zeigten keinen Einfluss auf die uPA abhängige Aktivierung der Proteinkinase B (Akt). Der Antikörper gegen Cdk4 dient zum Nachweis gleicher Proteinbeladung in den einzelnen Proben. n = 3

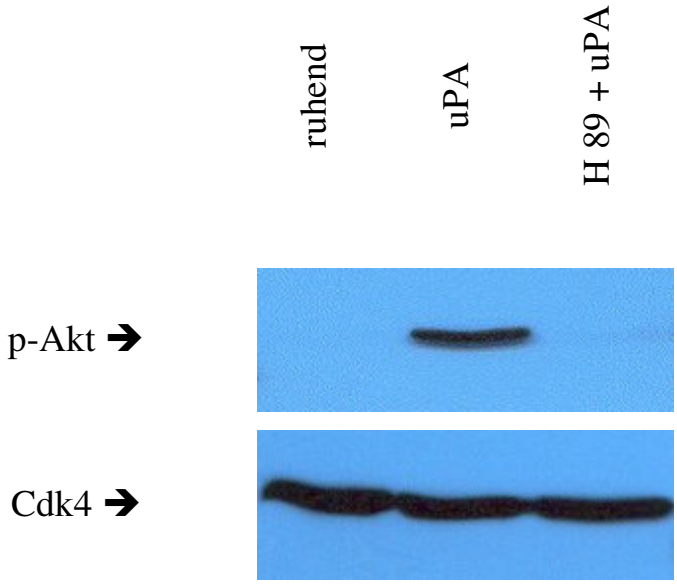

Abbildung 10 Auch ein anderer Hemmstoff der Proteinkinase A (H 89) bestätigte uns den Einfluss dieses Signaltransduktionsweges auf uPA vermittelte p-Akt Expression. Dieser Versuch wurde 3 mal durchgeführt. Cdk4 diente zum Nachweis gleicher Proteinbeladung der Proben.

4.8 Die gewonnen Ergebnisse sind auf humane Zellen übertragbar

Die oben beschriebenen Untersuchungen erfolgten mit glatten Gefäßmuskelzellen der Maus. Unser Fokus richtete sich nun darauf, in wie weit diese Ergebnisse auf humane Zellen übertragbar sind. Dazu überprüften wir unsere gewonnenen Aussagen an humanen, glatten koronararteriellen Gefäßmuskelzellen. Die Zellen wurden in 6-well Platten subkultiviert und nach 20 Stunden im serumfreien Medium erfolgte die Versuchsdurchführung.

Zunächst testeten wir ob uPA in den humanen Zellen die Proteinkinase B aktivieren kann. Dazu wurden die Zellen für 12 Minuten mit humaner high molecular weight urokinase (HMW -uPA) in einer Konzentration von 50 nMol/l stimuliert. Als Vergleich dienten ruhende Zellen (20 h im serumfreien Medium) und Zellen, die mit PDGF für 12 Minuten mit 20 ng/ml behandelt wurden. Wir konnten feststellen, dass auch in den humanen Zellen die Proteinkinase B durch uPA deutlich aktiviert wird (siehe Abbildung 11).

Im nächsten Schritt untersuchten wir den Einfluss der PI(3)- Kinase Inhibitoren Wortmannin und Ly 294002 auf die uPA abhängige Akt- Phosphorylierung. Nach Präinkubation der Zellen mit den entsprechenden PI(3)- Kinase Inhibitoren Wortmannin (100 nMol/l) und Ly 294002 (50 µMol/l) erfolgte die Stimulation mit uPA (12 Minuten in einer Konzentration von 50 nMol/l). Im Western Blot zeigt sich eine deutliche Hemmung der uPA Induzierten Akt- Hochregulierung (siehe Abbildung 11). Es lässt sich somit schlussfolgern, dass auch in denn humanen Zellen durch uPA der PI(3)- Kinase/Akt Signaltransduktionsweg aktiviert wird und das somit über die Urokinase vermittelte Zellreaktionen über diese Signalkaskade stattfinden können. In unseren Untersuchungen an murinen VSMC stellten wir fest, dass verschiedene Signalwege die uPA abhängige Akt Aktivierung beeinflussen. So konnten die Inhibitoren der Src- Kinase und auch der Proteinkinase A die uPA induzierte Akt- Phosphorylierung suppremieren. Um zu testen ob diese Regulationsmechanismen auch auf humane Zellen übertragbar sind erfolgte nun die Behandlung der humanen glatten Gefäßmuskelzellen mit den Inhibitoren der Src-Kinase (PP1 mit 10 µMol/l für 1 h) und der Proteinkinase A (KT 5720 mit 10 µMol/l und H 89 Dihydrochlorid mit 20 µMol/l für 1 h). Anschließend wurden die so vorbehandelten Zellen für 12 Minuten mit uPA in einer Konzentration von

50 nMol/l stimuliert. Es zeigte sich in diesem Versuch das die Inhibitoren der Src-Kinase und auch der Proteinkinase A zu einer deutlich verminderten Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) führen (Abbildung 11 und 13).
Man sieht das die uPA induzierte Akt- Aktivierung durch die Src- Kinase und auch durch die Proteinkinase A beeinflusst wird.
Um zu untersuchen ob die uPA induzierte Proteinkinase B Aktivierung über die Interaktion von uPA und dem Urokinaserezeptor (uPAR) stattfindet erfolgte nun die Behandlung der humanen glatten Gefäßmuskelzellen mit hochspezifischen Inhibitoren der proteolytischen uPA Aktivität. Mit Hilfe der pharmakologischen Inhibitoren (CJ 435 und CJ 463) konnten wir die proteolytische Aktivität der Urokinase hemmen.[36] Dazu wurden die Zellen für 1 Stunde mit CJ 435 (25 µMol/l) bzw. mit CJ 463 (30 µMol/l) vorinkubiert und anschließend mit uPA (50 nMol/l) für 12 Minuten stimuliert. Als Vergleich dienten wiederum unbehandelte Zellen, sowie Zellen, die mit uPA (ohne Inhibitor) bzw. mit PDGF (20 ng/ml für 12 Minuten) stimuliert wurden. Im Western Blot zeigt sich, wie auch schon bei den murinen VSMC beobachtet, dass auch in den Zellen, die mit den Inhibitoren behandelt wurden das p-Akt deutlich hochreguliert wurde. Dies bestätigt, dass auch in den humanen Zellen die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) durch uPA über die Interaktion mit dem uPAR erfolgt (siehe Abbildung 12).
Der uPAR (CD 87) benötigt zur intrazellulären Signalvermittlung ein Adaptermolekül. Als möglicher Adapter werden u.a. G- Proteine, Caveolin und Integrine angenommen.[28] [29] Um den Nachweis eine G- Protein vermittelten Signalübertragung zu erbringen, behandelten wir die Zellen mit Pertussis- Toxin, welches eine hemmende Wirkung auf G- Proteine aufweist. Die Zellen wurden über 1 Stunde mit Pertussis- Toxin in einer Konzentration von 500 ng/ml vorbehandelt und im Anschluss mit uPA stimuliert (12 Minuten mit einer Konzentration von 50 nMol/l). Die Auswertung zeigt, dass Pertussis- Toxin die uPA vermittelte Akt-Aktivierung deutlich vermindert (siehe Abbildung 12). So ist auch in den humanen Zellen bei der uPA/uPAR vermittelten Hochregulierung der Proteinkinase B ein G-Protein als Adaptermolekül zur intrazellulären Signalübertragung anzunehmen.
Die Lokalisation des uPAR wird in den als Caveolae bezeichneten cholesterinreichen Signalzentren der Plasmamembran vermutet. Diese

Membraneinstülpungen sind in verschiedenen Zellarten vorhanden. Der Wirkstoff Cyclodextrin kann durch Herauslösen von Cholesterin aus der Plasmamembran die Caveolae zerstören. Wir untersuchten nun den Einfluss der Zerstörung dieser Signalzentren auf die uPA vermittelte Akt- Aktivierung. Dazu wurden die humanen glatten Gefäßmuskelzellen über 1 Stunde mit 10 mMol/l Cyclodextrin vorinkubiert und dann mit uPA (50 nMol/l für 12 Minuten) behandelt. Es zeigt sich, dass durch die Behandlung der Zellen mit Cyclodextrin eine deutlich verminderte Aktivierung der Proteinkinase B erfolgt (Abbildung 14). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der uPAR in den als Caveolae bezeichneten Mikrodomänen der Plasmamembran lokalisiert sein kann.

Die Auswertung der Versuche erfolgte nach Proteolyse und Aufarbeitung der Lysate im Western Blot. Die Ergebnisse entsprechen denen, der in den vorrangegangenen Untersuchungen, an Zellen der Maus gewonnenen Aussagen. Daraus lässt sich schlussfolgern das die uPA abhängige PI(3)-K/Akt Signalkaskade in humanen Zellen den gleichen Regulationsmechanismen unterliegt, wie in den VSMC der Maus. Die Aktivierung des Akt durch uPA kann über den G- Protein gekoppelten uPA- Rezeptor vermittelt werden, der in den Caveolae zu finden ist. Die Inhibierung der proteolytischen uPA Komponente zeigte keinen negativen Einfluss auf die uPA vermittelte Phosphorylierung der Proteinkinase B. Die Signaltransduktion der uPA induzierten Akt- Aktivierung wird durch die Src- Kinase und auch durch die Proteinkinase A beeinflusst.

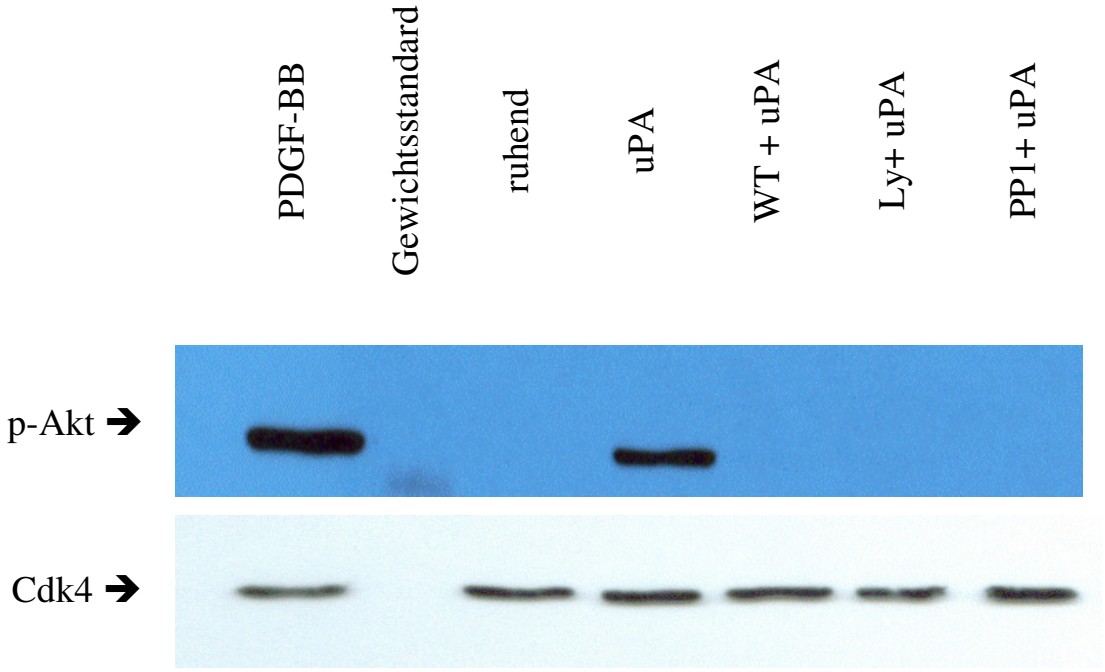

Abbildung 11 Die humanen glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit spezifischen pharmakologischen Inhibitoren der PI(3)- Kinase (Wortmannin, Ly 294002) und der Src- Kinase (PP1) für 1 Stunde präinkubiert und anschließend über 12 Minuten mit uPA stimuliert. Die Auswertung erfolgte im Western Blot. Der Antikörper gegen Cdk4 zeigt die gleiche Proteinbeladung in den einzelnen Proben. n = 4.

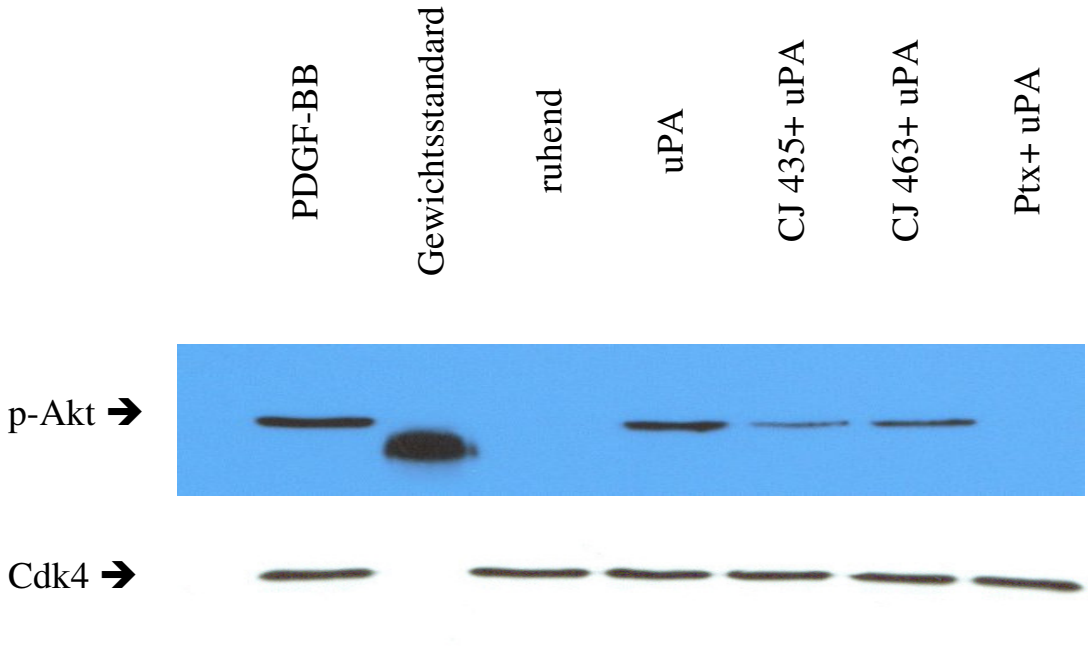

Abbildung 12 zeigt den Einsatz der uPA Inhibitoren (CJ 435 und CJ 463) sowie des G- Protein Inhibitors (Ptx mit 500 ng/ml). Im Western Blot zeigt sich das die uPA-Inhibitoren die Akt- Aktivierung nicht beeinflusst, wogegen der Einsatz des Pertussis- Toxin die uPA vermittelte Proteinkinase B Hochregulierung deutlich hemmt. Cdk4 diente als „housekeeping- protein“ und zeigt die gleiche Proteinbeladung der Proben an. Der Versuch wurde 3 mal durchgeführt.

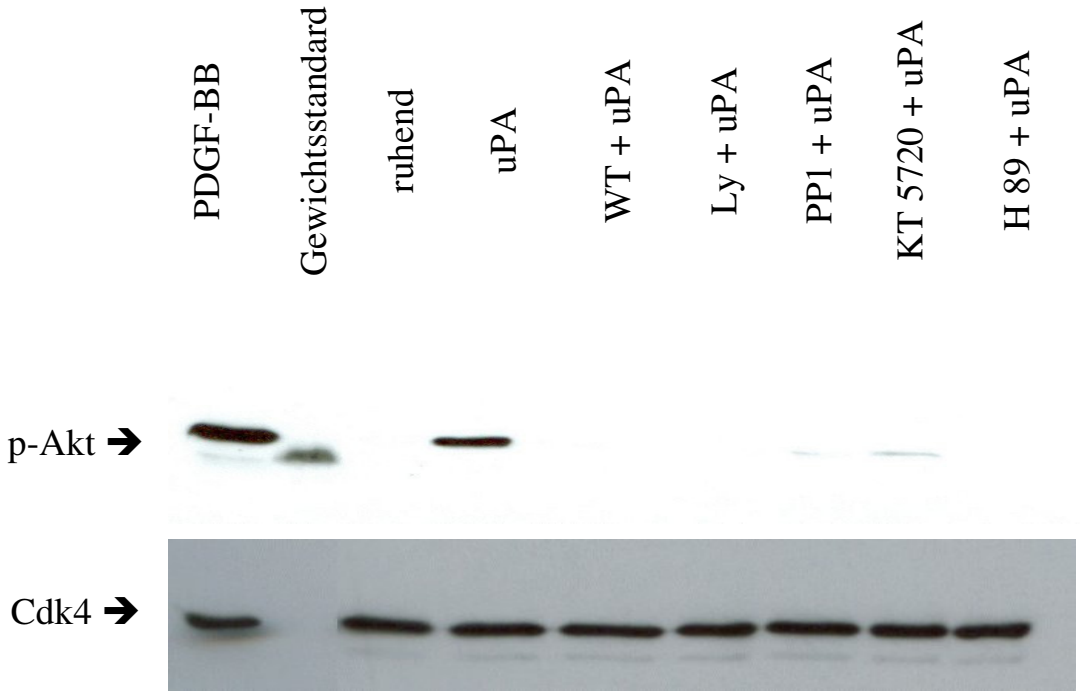

Abbildung 13 Die humanen glatten Gefäßmuskelzellen wurden neben spezifischen Inhibitoren der PI(3)- Kinase und der Src- Kinase auch mit zwei pharmakologischen Inhibitoren der Proteinkinase A (KT 5720 und H 89) vorinkubiert. Im Western Blot zeigt sich das auch die Proteinkinase A in den uPA/Akt- Signalweg involviert ist. Cdk4 zeigt die gleiche Proteinbeladung der Proben an. n = 4

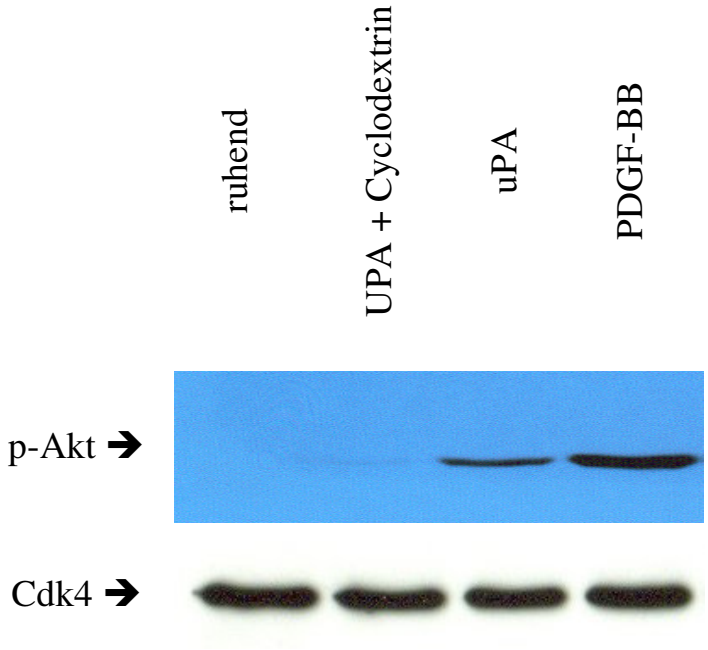

Abbildung 14 Zeigt die Zerstörung der zellulären Mikrodomänen (Caveolae) durch Cyclodextrin. Die so behandelten Zellen exprimierten deutlich weniger p-Akt, so dass als uPAR – Lokalisation die cholesterinreichen Signalzentren (Caveolae) in der Plasmamembran anzunehmen ist. Der Versuch wurde 3 mal durchgeführt. Cdk4 dient als „housekeeping- protein".

5 Diskussion

Als kritisches Ereignis sowohl bei der Atherosklerose, wie auch bei der Entstehung von Restenosen nach PTCA oder PTA, wird die Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen angesehen.[37] Diese spielen sowohl bei der Pathogenese der Atherosklerose wie auch bei der Entwicklung von Restenosen nach Angioplastie und Bypass Verpflanzung eine Rolle.[3 4] Durch ihre Umformung und Einwanderung von der Media in die Intima leisten sie bei der Restenosierung einen entscheidenden Beitrag.[38]

Es ist heutzutage gut etabliert, dass neben Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen auch Faktoren des fibrinolytischen Systems, dabei eine Rolle spielen.

So werden normalerweise weder das „vascular cell adhesion molecule-1" (VCAM-1) noch das „intercellular adhesion molecule-1" (ICAM-1) in der Media von ruhenden, kontraktilen VSMCs exprimiert. Diese Moleküle wurden im Tiermodel im Zusammenhang mit Atherosklerose, Restenosierung und Transplantatvaskulopathie, in der Neointima der glatten Gefäßmuskelzellen, entdeckt, [39 40 41] und können sowohl bei der Vermittlung einer stabilen Entzündungsreaktion wie auch bei der Proliferation und Migration in VSMCs beteiligt sein. [3 42] Da in neointimalen Läsionen aktivierte und auch proliferierende glatte Gefäßmuskelzellen zu finden sind, wird angenommen, dass proliferierende Zellen aktive Zellen sind.[43] Verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine sind bei der Aktivierung, der Migration und Proliferation von VSMCs beteiligt. Eine besondere Rolle nimmt dabei das uPA/uPAR- System ein, [44 45 46] auf das sich der Fokus unserer Arbeit richtet.

Es zeigte sich der Einfluss der uPA bei der Entwicklung von atherosklerotischen Veränderungen, sowie bei der Entstehung von Restenosen, denn sowohl in atherosklerotischen Plaques, wie auch in restenosierten Gefäßen, ist eine erhöhte Konzentration der Urokinase nachweisbar.[47 48 49] Auch konnte eine erhöhte uPA Aktivität nach Ballonangioplastie im Kaninchenmodel eruiert werden.[50] Dagegen entwickelten „uPA- knock out Mäuse" geringere atherosklerotische Läsionen nach einer arteriellen Gefäßverletzung.[10 11 51] Die Überexpression von uPA führte zu

einem beschleunigten Wachstum von Läsionen und so zu einer schnelleren Einengung des Gefäßlumens.[52] In anderen Tiermodelstudien konnte nach der perivaskulären Applikation von uPA eine erhöhte neointimale Formation in den arteriellen Gefäßen nach Ballondilatation dargestellt werden.[53] Während durch die perivaskuläre Applikation von uPA neutralisierenden Antikörpern die Entwicklung der Neointima und auch die Zahl der neointimalen SMCs deutlich reduziert werden konnte.[38] Die Urokinase ist eine Serinprotease, welche die Konversion von Plasminogen in Plasmin katalysiert.[54] Die Serinprotease: Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und ihr spezifischer Rezeptor (uPAR/CD 87) spielen so eine bedeutende Rolle bei Zellproliferation, Zellmigration sowie bei der intrazellulären Aktivierung von Signalkaskaden. Die Wirkung der uPA wird über die hochaffine Bindung an ihren Rezeptor entfaltet und verstärkt.[25]

Die uPA wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen synthetisiert. Dazu gehören u.a. Fibroblasten, Monozyten, glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen.[55] [56] Die uPA ist aus drei funktionell autonomen Domänen zusammengesetzt. Diese beinhalten das amino terminale Fragment (ATF), das für die Bindung an den uPAR benötigt wird, die „kringle"- Domäne und die Serin Protease Einheit, die für die proteolytische Funktion der uPA verantwortlich ist.[57] [58] Ihr spezifischer Rezeptor, der sich ebenfalls aus 3 Untereinheiten aufbaut, kann intrazelluläre Signale übermitteln, besitzt allerdings weder eine intrazelluläre, noch eine transmembran Domäne. Er ist über ein Glykosylphosphatidylinositol mit der Zellmembran verankert. Als mögliche Korezeptoren für die intrazelluläre Signalübertragung werden u.a. Caveolin, Integrine und G- Proteine postuliert.[59] [60] [61] [62]

Der uPAR vermag, über verschiedene intrazelluläre Signalwege die Genexpression zu modulieren. Verschiedene Arbeiten beschreiben die Induktion der Genexpression über einen Jak- Kinasen abhängigen Weg, indem die Stat- Proteine: Stat1, Stat2 und Stat4 phosphoryliert werden und in dieser aktiven Form an die DNA binden.[63] [64] Einen weiteren Mechanismus zur Modulation von Genexpression und Zellproliferation, stellt der MAP- Kinase Signalweg dar.[65]

Unsere Arbeit untersuchte weitere Signalkaskaden, die für eine uPA abhängige Proliferation in glatten Gefäßmuskelzellen eine Rolle spielen. Wir konnten erstmals

zeigen, dass durch Urokinase die Serin/Threonin- Kinase, Akt, direkt aktiviert werden kann. Diese Aktivierung erfolgte über einen PI(3)- Kinase abhängigen Weg. Da die Proteinkinase B (Akt) als Schlüsselenzym der zellulären Proliferation fungiert und durch die Regulation nachfolgender Signalmoleküle in den Zellmetabolismus eingreift, scheint dieser Signalweg bei der Urokinase bedingten Zellproliferation eine Rolle zu spielen.[66]

5.1 Die Rolle von uPA/uPAR bei der Zellproliferation

Wie im vorangegangenen Abschnitt schon dargelegt, kann das fibrinolytische System von uPA/uPAR direkt in Zellmigrations- und Proliferationsprozesse eingreifen. Unsere Thymidininkoorperationsstudien bestätigen die proliferative Wirkung der Urokinase auf glatte Gefäßmuskelzellen. Die DNA Synthese, in den uPA behandelten Zellen, zeigte einen deutlichen Anstieg. Die mit dem Wachstumsfaktor PDGF-BB stimulierten Zellen dienten als positiver Vergleich.

Über die Signalprozesse, die bei der uPA induzierten Zellproliferation beteiligt sind, ist noch wenig bekannt. So werden unterschiedliche Wege zur Aktivierung der Proliferation diskutiert. Durch die Bindung von uPA an den Rezeptor, können indirekt, über die Spaltung von Plasminogen zu Plasmin, andere Proteasen aktiviert werden. Zu diesen Proteasen gehören u.a. die Matrixmetalloproteinasen. Diese können über den direkten Matrixabbau hinaus, auch die Freisetzung von Zellgebundenen Wachstumsfaktoren, wie bFGF oder TGFβ, bewirken.[67] [68]

Über die Wirkung ihrer Protease- Domäne, kann uPA auch direkt Matrixproteine spalten und Wachstumsfaktoren freisetzen. Zusammenfassend kann man sagen, dass über die proteolytische Komponente der Urokinase, DNA- Synthese und Zellproliferation vermittelt werden kann. Andere Autoren betonen die Bedeutung des uPA Rezeptors, CD 87, für die zelluläre Vermittlung.[69] [70] [71] [72] [73]

In anderen Untersuchungen wurde aber die Unabhängigkeit der DNA- Synthese und somit der Zellproliferation, sowohl von der proteolytischen uPA Funktion als auch von der Rezeptorbindung beschrieben.[74] [75] [76]

Bei unseren Versuchen zur Proliferation nutzten wir zunächst VSMC der Maus und behandelten diese mit einer humanen HMW- Urokinase. Bei dieser Konstellation stellt sich die Frage nach der Spezies spezifischen Bindung der uPA an ihren Rezeptor, daher überprüften wir unserer Ergebnisse an humanen VSMC .[77] [78]

Prinzipiell könnte die uPA induzierte Proliferation der Zellen auch von der uPA/uPAR Bindung unabhängig sein. Da die proteolytische Domäne in unseren Proliferationsstudien nicht inhibiert wurde, ist auch über diese Wirkungsweise und durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren eine Stimulation der DNA- Synthese möglich. Auch wird die Wirkungsmöglichkeit der Urokinase auf Zellprozesse über die Interaktion mit einen anderen, noch nicht identifizierten, Rezeptor diskutiert.[79]

In humanen Melanomzellen konnte eine uPA- induzierte mitogene Antwort aufgenommen werden, die sowohl unabhängig von der proteolytischen Komponente, als auch von der Rezeptorbindung war. Es zeigte sich die Bindung der Urokinase an ein bis dahin noch nicht identifiziertes, Membran assoziiertes Protein, das an den uPA- induzierten Signaltransduktionsweg beteiligt sein kann.[80] Ähnliche Beobachtungen konnten in VSMCs gemacht werden. Auch hier zeigte sich eine, vom klassischen uPAR unabhängige, mitogene Antwort auf eine uPA Stimulation.[42]

Als ein möglicher Rezeptor für die Urokinasebindung wird das LDL receptor-related protein (LRP) diskutiert.[81] LRP beeinflusst zum Beispiel die Migration von humanen glatten Gefäßmuskelzellen indem er bei der Bereitstellung von freien uPAR hilft.[82] Andere Untersuchungen zeigen einen direkten Einfluss von uPA auf LRP bei der Modulation und Regulation des Gefäßtonus von VSMC der Maus.[81] Studien mit Nierenfibroblasten weisen dagegen darauf hin, dass in uPAR defizienten Zellen auch der Co- Rezeptor (LRP) in deutlich geringerer Höhe exprimiert wird und das die uPA vermittelte Proliferation in diesen uPAR negativen Zellen über einen alternativen Rezeptor laufen, in den der Erk- Signalweg beteiligt ist.[83]

Das neben den klassischen uPA- Rezeptor (CD 87) noch alternative Bindungsmöglichkeiten für die Urokinase und so weitere Signaltransduktionswege in Frage kommen, können die erwähnten Arbeiten aufzeigen. Die genaue Identifizierung und Lokalisation dieser alternativen Rezeptoren muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5.2 Urokinase aktiviert den PI(3)- Kinase/Akt- Signalweg

Zur Vermittlung von Zellproliferation und Zellmigration über uPA/uPAR wurden verschiedene Signalwege identifiziert. Wie schon beschrieben scheinen in VSMCs verschiedene Mechanismen beteiligt zu sein. Zum einen der Jak/Stat- Signalweg, bei dem über die Janus Kinasen Jak1 und Tyk2 die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Stat1, Stat2 und Stat4) erfolgt und andererseits der „Src non- receptor protein- tyrosin kinases (PTK)" Signalweg. Neben der Aktivierung der Transkription ist Tyk2 auch in eine Signalkaskade involviert, in der nachgeordnet die PI(3)- Kinase aktiviert wird. An dieser Tyk2 vermittelten PI(3)-Kinase Aktivierung, als Antwort auf eine uPA Stimulation, sind durch direkte Assoziation mit dem Tyk 2/PI(3)- Kinase Signalweg, auch die GTPasen: Rho A und Rac beteiligt. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Migration von VSMCs.[84 85] Src- Kinasen zeigen ihren Einfluss in VSMCs der Ratte bei der Chemotaxis und der Zytoskelettreorganisation. Die Src- Kinase abhängigen Effekte können über ein G-Protein vermittelt werden, da sie sensitiv auf das Pertussis Toxin reagieren.[86] In unseren Studien fokussierten wir den Einfluss des PI(3)-K/Akt- Signalweges bei der uPA induzierten Proliferation in VSMCs.

Wir konnte die direkte Aktivierung der PI(3)- Kinase schon nach 30 Minuten uPA Stimulation und nachfolgend die Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt) zeigen. Die Untersuchungen wurden sowohl an murinen VSMC als auch an humanen glatten Gefäßmuskelzellen durchgeführt. Die gewonnenen Ergebnisse lassen vermuten, dass die Regulation der uPA induzierten Proliferation über den PI(3)-K/Akt- Signaltransduktionsweg bei beiden Zellarten in gleicher Weise verlaufen. Auch der Einsatz von hoch spezifischen Inhibitoren der proteolytische uPA Funktion (CJ 435 und CJ 463) konnte die uPA vermittelte Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) nicht beeinflussen. Dies lässt vermuten, dass für diesen Signalweg der uPAR benötigt wird. In wieweit andere Rezeptoren die uPA als Liganden benutzt eine Rolle spielen, ist momentan noch nicht geklärt.

Der Einfluss der PI(3)- Kinase verdeutlicht sich durch die Verwendung ihrer Inhibitoren (Wortmannin und Ly 294002), welche die Hochregulierung des p-Akt verhinderten. Somit scheint die PI(3)- Kinase für die Phosphorylierung des Akt nach uPA Stimulation verantwortlich zu sein.

Auch zeigen Untersuchungen an Tumorzellen den direkten Einfluss der Urokinase bei der Migration und die Abhängigkeit dieser Regulationsprozesse von PI(3)-K/Akt- Signalweg.[87]

Der PI(3)-K/Akt- Signaltransduktionsweg ist von Drosophila melanogaster über Caenorhabditis elegans bis hin zur Säugetierzelle zu finden und stellt somit einen der ältesten Signaltransduktions- und Zellzyklusregulationswege dar.[88 89 90]

Akt ist in eine Vielzahl von nachgeordneten Signalprozessen, wie dem Zellmetabolismus, der Proteinsynthese, der Proliferation und auch der Apoptose involviert.[91 92]

Es wurde gezeigt, dass der uPAR mit Caveolin co-lokalisiert ist. Caveolin ist ein Transmembranprotein, dessen Einfluss bei der uPAR Signalvermittlung diskutiert wird.[93 94 95] Weiterhin ist es ein wichtiges Protein in den zellulären Caveolae und stellt somit den wahrscheinlichen Ort der mit uPAR zusammenhängenden Signaltransduktion dar. Die Caveolae sind Cholesterinreiche Mikrodomänen in der Zellmembran, deren Zerstörung die uPAR abhängigen Signalwege unterbindet. Nach Behandlung der VSMCs mit Cyclodextrin, das durch die Herauslösung von Cholesterin die Intaktheit und somit die Funktionsfähigkeit der Caveolae zerstört, wurde die Aktivierung der Proteinkinase B inhibiert. Diese Beobachtung legt nah, dass der uPA assoziierte PI(3)-K/Akt- Signalweg seinen zellvermittelten Ausgang in diesen Mikrodomänen der Zellmembran findet und so an den uPAR gebunden ist.

Wie schon erwähnt, werden verschiedene Korezeptoren für die intrazelluläre Signalvermittlung des uPAR in Betracht gezogen, zu denen unter anderen die G-Proteine gehören. Die Phosphorylierung des Akt zeigte sich in unseren Untersuchungen sensitiv auf Pertussis Toxin und somit abhängig von der Übertragung durch ein G- Protein.

Auch konnten wir den Einfluss sowohl der Src- Kinase, als auch der Proteinkinase A feststellen. Die Inhibitoren der Src- Kinase (PP1) und auch der Proteinkinase A (KT 5720 und H 89 Dihydrochlorid) konnten die uPA induzierte p-Akt Aktivierung deutlich suppremieren und so die wichtige Rolle dieser Proteine in der übergeordneten Regulation aufzeigen.

Die Beteiligung der Src- Kinase in den uPA induzierten Zell Signalprozessen wurde schon in MCF- 7 Zellen demonstriert[96], bei denen die Src- Kinasen benötigt werden,

um nach der Stimulation der Zelle mit uPA den ERK- Signalweg zu aktivieren, und somit bei der Migration dieser Zellen eine bedeutende Rolle einzunehmen. Andere Untersuchungen zeigen den Einfluss von Src- Kinasen in humanen Monozyten. Sie stellen einen Rezeptorkomplex dar, der sich aus uPAR, Src- Kinasen und β 2 Integrinen zusammenfügt.[97]

In VSMCs ist dieser Zusammenhang beim uPA induzierten PI(3)-K/Akt-Signalweg noch nicht ausreichend untersucht. Des weiteren stellt sich die Frage, an welcher Stelle sowohl die Src- Kinase, als auch die Proteinkinase A in diesen Transduktionsweg eingreift.

Auch konnten wir für andere Signalwege, durch die Untersuchung bestimmter Schlüsselproteine, keinen Einfluss auf die uPA vermittelte Phosphorylierung der Proteinkinase B nachweisen. So konnten weder die Inhibitoren der Erk p42/44-Kinase (PD 98059) noch der p38 Map- Kinase (SB 203580) die Hochregulierung des p-Akt unterbinden. Andere Autoren demonstrierten sowohl den Einfluss der p38 Map- Kinase, als auch von Erk p42/44 bei der uPA induzierten Proliferation von Tumorzellen.[98 99]

Ebenfalls wiesen die Inhibitoren der Proteinkinase C (Staurosporin) und der Proteinkinase G (KT 5823) keinen signifikanten Effekt auf die uPA induzierte Phosphorylierung der Proteinkinase B auf.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass in Situationen mit erhöhter uPA Expression (wie z.B. nach PTA oder PTCA), über die Aktivierung der PI(3)- Kinase und nachfolgend die Phosphorylierung der Proteinkinase B, eine Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen stattfindet. Diese Zellproliferation wird direkt durch uPA induziert und konnte durch Inhibitoren sowohl der PI(3)- Kinase, als auch der Proteinkinase A und der Src- Kinase deutlich vermindert werden. Die Abhängigkeit vom PI(3)-K/Akt- Signaltransduktionsweg, der eine entscheidende Rolle in Zellmetabolismus und Zellzyklusregulation einnimmt, wurde gezeigt. Diese Mechanismen könnten einen Beitrag bei der Entstehung und Formierung der Neointima und so bei der Entwicklung von Restenosen nach einer Angioplastie leisten.

Die Unterbindung dieses Prozesses könnte sich als wertvolle Therapieoption erweisen und zeigt so mögliche Angriffspunkte für eine pharmakologische Intervention auf.

Zusammenfassend zeigt sich, dass es kontrovers zu diskutieren ist, ob der Einfluss von uPA auf die Zellproliferation abhängig ist von der proteolytischen Aktivität der Urokinase oder durch ihre Bindung an den Rezeptor CD 87.

Die Fragestellung unserer Untersuchungen richtete sich auf die Beeinflussung der Proteinkinase B, ein Schlüsselenzym der Zellproliferation, durch uPA. Wir konnten zeigen, dass durch uPA Stimulation innerhalb von 30 Minuten die PI(3)- Kinase aktiviert werden kann und das daraus folgend die Phosphorylierung des Akt stattfindet. Auch die Blockade mit den hochspezifischen Inhibitoren der proteolytischen uPA Aktivität (CJ 435 und CJ 463) konnte die Urokinase vermittelte Akt Aktivierung nicht verhindern.

Als vermutlichen Ort dieser Aktivierung in der Zelle konnten wir die zellulären Caveolae wahrscheinlich machen.

Inhibitoren der PI(3)- Kinase, Src- Kinase und Proteinkinase A führten zur Suppression der uPA induzierten Akt Aktivierung. Somit spielen diese Enzyme offenbar eine Rolle bei der upstream- Regulierung der Signalprozesse. Während die Inhibitoren von Erk p42/44 und p38 Map- Kinase keinen Einfluss auf die uPA vermittelte Akt Regulierung zeigen. Bei der Tumorproliferation ist allerdings eine Bedeutung dieser Enzyme im Hinblick auf uPA beschrieben.[98]

Die Beteiligung von PKA, Src- Kinase und G- Proteinen in der uPA gesteuerten Akt Aktivierung und folgender Zellproliferation in den glatten Gefäßmuskelzellen konnten wir in unseren Versuchen erstmalig beschreiben.

6 Zusammenfassung/Summary

6.1 Zusammenfassung

Die Entstehung von Atherosklerose sowie die Entwicklung von Restenose nach Ballonangioplastie oder Stentimplantation, stellen trotz neuer therapeutischer Möglichkeiten weiterhin ein schwerwiegendes klinisches Problem dar.[100] Die übermäßige Beanspruchung und Verletzung der Gefäßwand führt durch einen chronischen Umbau der Gefäße zur Verengung des Gefäßlumens. Die Folgen der Mangeldurchblutung, für das gefäßversorgende Organ, äußern sich beispielsweise in Angina pectoris Beschwerden bis hin zum Myokardinfarkt, bei veränderten Herzkranzgefäßen.

Als Hauptursache dieser Verengung ist die Vermehrung der glatten Gefäßmuskelzellen in der Gefäßwand anzusehen. Ein wesentlicher Pathomechanismus für die Stenosierung ist die Proliferation und Migration dieser glatten Muskelzellen von der Media in die Intima der Gefäßwand. Die Migration der Zellen folgt einem komplexen und geordneten Ablauf vieler Prozesse, an der Chemotaxis, Zelladhäsion und -deadhäsion, Umbau von extrazellulärer Matrix sowie Veränderung des Zellphänotyps beteiligt sind.

Ein Kennzeichen proliferierender und migrierender Zellen ist die erhöhte Expression von Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und seinem spezifischen Rezeptor (uPAR). Das uPA/uPAR- System induziert die Zellproliferation und fördert die Migration über die Vermittlung von begrenzter extrazellulärer Proteolyse, Aktivierung der Genexpression, Veränderung der Zellhaftung und Einfluss auf chemotaktische Geschehen. Die intrazelluläre Signalvermittlung ist an einen Korezeptor gekoppelt. Als Korezeptoren werden Integrine, Caveolin und auch G- Proteine diskutiert.[100]

In unseren Untersuchungen konnten wir erstmals die uPA induzierte Aktivierung der Proteinkinase B, ein Schlüsselenzym der zellulären Proliferation, zeigen. Wir stimulierten dazu, sich in Zellkultur befindende, glatte Gefäßmuskelzellen mit Urokinase. Dabei konnte sowohl ein Anstieg der Zellproliferation als auch die direkte Aktivierung der Proteinkinase B gezeigt werden. Die aktivierte Proteinkinase B (p-Akt) hat wesentlichen Einfluss auf die Regulation des

Zellzykluses, Zellmetabolismus und Zellüberlebens. Die Phosphorylierung der Proteinkinase B ist Abhängig von der Aktivität der PI(3)- Kinase und kann über den Urokinase Rezeptor vermittelt werden. Die Aktivierung des PI(3)-K/Akt-Signalweges ist an ein G- Protein als Korezeptor gekoppelt.

Somit scheint dieser Signalweg seine intrazelluläre Weiterleitung über den uPAR zu finden. Die Lokalisation des Urokinase Rezeptors ist in den Mikrodomänen der Zellmembran, den sogenannten Caveolae, zu vermuten.

Auch konnten wir die Abhängigkeit der p-Akt Aktivierung von Signalwegen, in welche die Src- Kinase und die Proteinkinase A involviert sind, aufzeigen. Keinen Einfluss auf den Signaltransduktionsweg wiesen die Proteinkinase C, die Proteinkinase G, die p38 Map- Kinase und die Erk p42/44 Kinase auf.

Das Verständnis dieser Pathomechanismen könnte in Situationen mit erhöhter uPA/uPAR Expression und nachfolgender Aktivierung der Proteinkinase B zur weiteren Entwicklung von präventiven und therapeutischen Strategien beitragen, um so die Entstehung von Restenosen nach arteriellen Interventionen zu verhindern.

6.2 Summary

The formation of atherosclerosis as well as the development of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty or stent implantation represent a serious clinical problem in spite of the new therapeutical possibilities.[100] The excessive vascular wall strain and injury leads to vascular lumen contraction by chronic vascular reconstruction. The consequences of insufficient circulation (ischaemia) for the providing vascular organ, manifest themselves for instance in angina pectoris complaints or even myocardial infarction, at altered coronary arteries.

The main cause of this contraction is smooth muscle cells increase in the vascular wall. An essential pathomechanism for the stenosis is the proliferation and migration of these smooth muscle cells from media to the intima of the vascular wall. The cell migration follows a complex and sorted process of many procedures, in which chemotaxis, cell adhesion and cell deadhesion, extracellular matrix reconstruction, as well as cell phenotype alteration are involved.

A symptom of proliferated and migrated cells is the enhanced urokinase plasminogen activator (uPA) expression and its specific receptor (uPAR). The uPA/uPAR- system induces the cell proliferation and supports the migration by mediation of limited extracellular proteolysis, gene expression activation, cell attachment altering and influence on the chemotactic happenings. The intracellular signal mediation is linked to a co-receptor. Integrins, caveolin and also G-proteins are discussed as co-receptors.[100]

For the first time our investigations could show the uPA protein kinase B induced activation, a key enzyme of the cellular proliferation. For this we stimulated the in the cell culture smooth muscle cells with urokinase. With this procedure a cell proliferation increase as well as an immediate protein kinase B gain was displayed. The activated protein kinase B (p-Akt) has a crucial influence on the cell cycle regulation, cell metabolism and cell survival. The phosphorylation of the protein kinase B is dependant on the PI(3) kinase activity and can be mediated by the urokinase receptor. The PI(3)-K/Akt- signal path activation is linked to a G-protein co-receptor.

Therefore it seems as if the signal path finds its intracellular transmission through the uPAR. The urokinase' receptor localization is to be assumed in the cell membranes micro domains.

Also we could display the dependency of the signal paths' p-Akt activation in which the Src-kinase and the protein kinase A are involved. The protein kinase C, protein kinase G, the p38 Map-kinase and the Erk p42/44 kinase show no influence on the signal transduction path ways.

The understanding of this pathomechanism could contribute, in situations with increased uPA/uPAR expression and following protein kinase B activation to further development of preventive and therapeutical strategies to prevent the development of restenosis after arterial interventions.

7 Literaturangaben

[1] Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease.

Lancet. 1999; 353: 1547-57

[2] Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H, Ohishi H. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients.

J Am Coll Cardiol. 1988; 12: 616-23

[3] Serruys PW, Luijten HE, Beatt KJ, Geuskens R, de Feyter PJ, van den Brand M, Reiber JH, ten Katen HJ, van Es GA, Hugenholtz PG. Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2, 3, and 4 months. *Circulation*. 1988; 77: 361-71

[4] Grüntzig A, Spencer K, Schlumpf M, Siegenthaler W. Longterm follow –up after percutaneous transluminal coronary angioplastie

N Engl J Med. 1987; 316: 1127

[5] Ardissio D, Di Somma S, Kubica J. Influence of elastic recoil on restenosis after successful coronary angioplasty in unstable angina pectoris

Am. J. Cardiol. 1993; 71: 659- 663

[6] Currier JW, Faxon DP. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: have we been aiming at the wrong target.

J. Am. Coll Cardiol. 1995; 25: 516- 520

[7] Liu MW, Roubin GS, King SB. Restenosis after coronary angioplasty: potential biological determinants and role of intimal hyperplasia

Circulation. 1989; 79: 1374- 1387

[8] Kuntz RE, Baim DS. Prevention of coronary restenosis : the evolving evidence base for radiation therapy.

Circulation. 2000; 101: 2130-3

[9] Mintz G, Kovach J, Javier S, Ditrano C, Leon M. Geometric remodelling is the predominant of late lumen loss after coronary angioplasty

Circulation. 1993; 88: 642-654

[10] Roncalli J, Galinier M, Fourcade J, Carrie D, Puel J, Fauvel JM. Long-term follow-up after primary angioplasty: is stenting beneficial?

Ann Cardiol Angeiol. 2005; 54 (2): 80-5

[11] Piana RN, Moscucci M, Cohen DJ. Palmaz- Schatz stenting for treatment of focal vein graft stenosis:Immediate results and long- term outcome

J. Am. Coll. Cardiol. 1994; 23: 1296

[12] Mangi AA, Dzau VJ. Gene therapy for human bypass grafts.

Ann Med. 2001; 33: 153-5

[13] Ross R. Cell biology of atherosclerosis.

Annu Rev Physiol. 1995; 57: 791-804

[14] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis.

Circulation. 2002; 105: 1135-43

[15] Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. The good smooth muscle cells in atherosclerosis.

Curr Atheroscler Rep. 2000; 2: 422-9

[16] Lendon CL, Davies MJ, Born GV, Richardson PD. Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophages density is increased.

Atherosclerosis. 1991; 87: 87-90

[17] Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease.

Am Heart J. 1999; 138: 419-20

[18] Mullenix PS, Andersen CA, Starnes BW. Atherosclerosis as inflammation.

Ann Vasc Surg. 2005; 19 (1): 130-8

[19] Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies.

Nat Med. 2002; 8: 1249-56

[20] DeRuiter MC, Poelmann RE, VanMunsteren JC, Mironov V, Markwald RR, Gittenberger-de Groot AC. Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro.

Circ Res. 1997; 80: 444-51

[21] Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH, Simonet L, Wilcox JN. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries.

Circulation. 1996; 93: 2178-87

[22] Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis.

J Clin Invest. 2001; 107: 1411-22

[23] Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood.

Circulation. 2002; 106: 1199-204

[24] Hillebrands JL, Onuta G, Rozing J. Role of progenitor cells in transplant arteriosclerosis.

Trends Cardiovasc Med. 2005; 15 (1): 1-8

[25] Blasi F, Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/ aotacrine system regulating cell migration and invasiveness

Bioassays. 1993; 15: 105- 111

[26] Pepper MS, Vassalli JD, Montesano R, Orci L; Urokinase- type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells.

J. Cell. Biol. 1984; 105: 2535-2541

[27] Raghunath PN, Tomaszewski JE, Brady ST, Caron RJ, Okada SS, Barnathan ES. Plasminogen activator system in human coronary atherosclerosis;

Arterioscl. Throm. Vasc. Biol. 1995; 15: 1432-1443

[28] Lupu F, Heim DA, Bachmann F, Hurni M, Kakkar VV, Kruithof EK. Plasminogen activator expression in human artherosclerotic lesion;

Arterioscl. Throm. Vasc. Biol. 1995; 15: 1444-1455

[29] Carmeliet P, Moons L, Ploplis V, Plow E, Collen D. Impaired arterial neointima formation in mice with disruption of the Plasminogen gene.

J. Clin. Invest. 1997; 99: 200-208

[30] Carmeliet P, Moons L, Herbert JM, Crawley J, Lupu F, Lijnen R, Collen D. Urokinase but not tissue plasminogen activator mediates arterial neointima formation in mice.

Circ. Res. 1997; 81: 829-839

[31] Jawien A, Bowen- Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickining in a rat model of balloon angioplasty.

J. Clin. Invest. 1992; 89: 507-511

[32] Jung F, Haendeler J, Goebel Ch, Zeiher A, Dimmeler S. Growth factor- induced phospoinositide 3- OH kinase/Akt phosphorylation in smooth muscle cells: induction of cell proliferation and inhibition of cell death.

Cardiovasc. Res. 2000; 48: 148-157

[33] Wymann MP ,Zvelebil M, Laffargue M. Phosphoinositide 3- kinase signaling-wich way to target?

Trend. Pharmacol. Sci. 2003; 24: 366-374

[34] Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: Ahard AKT to follow.

Trends Biochem. Sci. 2001; 26: 657-664

[35] Song G, Quyang G, Bao S. The Activation of AKT/PKB signaling pathway and cell survival.

J. Cell. Mol. Med. 2005; 9: 59-7

[36] Schweinitz A, Steinmetzer T, Banke IJ, Arit MJ, Stürzenbecher A, Schuster O, Geissler A, Giersiefen H, Zeslawska E, Jacob U, Krüger A, Stürzebecher J Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastic agents.

J. Biol Chem. 2004; 279 (32): 33613-22

[37] Casscells W; Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis.

Circulation. 1992; 86: 723-729

[38] Schwartz SM; Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis

J. Clin. Invest. 1997; 100: 87- 89

[39] Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR. Expression of intracellular adhesion molecule-1 in artherosclerotic plaque

Am J Patrol. 1992; 140: 665-673

[40] O'Brien KD, Allen MD, MacDonald TO, Chit A, Harlan JM, Fishbone D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD. Vascular cell adhesion molecule-1is expressed in human coronary artherosclerotic plaques. Implication for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis

J Clin Invest. 1993; 92: 945-951

[41] Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr, Libby P. Inducible expression of vascular cell adhesion molecole-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma

Am J Pathol. 1993; 143: 1551-1559

[42] O´Brien KD, MacDonaldTO, Chait A, Allen MD, Alpers CE Neovascular expression of E-selectin, intracellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1in human atherosclerosis and their relation to intimal leucocyte content

Circulation. 1996; 93: 627-682

[43] Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Sedding DG, Sherwood SW, von Leinen HE, Dzau VJ. Cell-cycle dependent regulation of smooth muscle cell activation

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24: 845-850

[44] Cameliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ,Cullen D, Mulligan RC. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice

Nature 1994; 368:419-424

[45] Carmeliet P, Collen D Development and Disease in proteinase-deficient mice: role of plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system

Thromb Res. 1998; 91: 255-286

[46] Carmeliet P, Collen D Role of the plasminogen/plasmin system in thrombosis, haemostasis, restenosis and atherosclerosis

Trends Cardiovasc Med. 1995; 5: 117-122

[47] Padró T, Emais JJ, Steins M, Schmid KW, Kienast J. Quantifikation of plasminogen activators and their inhibitors in aortic vessel wall in relation to the presence and severity of artherosclerotic disease

Arterioscl Thromb Vasc Biol. 1995; 15: 893-902

[48] Noda-Heiny H, Daugherty A, Sobel BE. Augmented urokinase receptor expression in Atheroma

Arterioscl Thromb Vasc Biol. 1995; 15: 37-43

[49] Kienast J, Padró T, Steins M, Li C-X, Schmid W, Hammel D, Scheld HH, van de Loo JCW Relation of Urokinase-Type Plasminogen Activator Expression to Presence and Severity of Atherosclerotic Lesions in Human Coronary Arteries

Thromb Haemost. 1998; 79: 579-586

[50] More RS, Underwood MJ, Brack MJ, de Bono DP, Gershlick AH. Changes in vessel wall plasminogen activator activity and smooth muscle cell proliferation and activation after arterial injury

Cardiovasc Res. 1995; 29: 22-26

[51] Cameliet P, Stassen JM, De Mol M, Declercq C, Bouché A, Cullen D. Arterial neointima formation after trauma in mice with inactivation of t-PA, u-PA or PAI-1 genes

Fibrinolysis 1994; 8 (suppl.1): 101 (Abst.280)

[52] Falkenberg M, Clifford T, DeYoung MB, Shan W, Linnemann R, Dickek DA Increased expression of urokinase during artherosclerotic lesion development causes arterial constriction and lumen loss and accelerates lesion growth

Proc Natl Accad Sci. 2002; 99: 10665-10670

[53] Plekhanova OS, Parfyonova YV, Bibilashvily RS, Stepanova VV, Erne P, Bobik A, Tkachuk VA: Urokinase plasminogen activator enhances neointimal growth and reduces lumen size in injured carotid arteries

J Hyperten. 2000; 18: 1065-1069

[54] Saksela O, Rifkin DB, Cell- associated plasminogen activation: regulation and physiological functions.

Annu. Rev. Cell Biol. 1988; 4: 93-126

[55] Clowes AW, Clowes MM. Au YP, Reidy MA, Belin; Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue- type plasminogen activator during migration in injured rat carotic artery

Circ. Res. 1990; 67: 61-67

[56] Eaton DL, Scott RW, Baker JB; Purification of human fibroblasts urokinase proenzyme and analysis of its regulation by proteases and protease nexin

J. Biol. Chem. 1984; 105: 2535-2541

[57] Blasi F, Vassalli JD, Dano K; Urokinase- type plasminogen activator: proenzyme, receptor and inhibitors

J. Cell Biol. 1987; 104: 801-804

[58] Behrendt N, Ronne E, Danno K; The structure and function of urokinase receptor, a membrane protein governing plasminogen activation on the cell surface

J. Biol. Chem. 1995; 376: 269-279

[59] Stahl A, Mueller BM; The urokinase- type plasminogen activator receptor, a GPI- linked protein, is localized in Caveolae.

J. Cell Biol. 1995; 129: 335-344

[60] Wie Y, Yang X, Liu Q, Wilkins JA, Chapman HA; A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin- mediated adhesion and signalling

J. Cell Biol. 1999; 144: 1285-1294

[61] Blasi F; The urokinase receptor. A cell surface, regulated chemokine

Apmis. 1999; 107: 96-101

[62] Chapman HA, Wei Y, Simon DI, Waltz DA, Role of urokinase receptor and caveolin in regulation of integrin signalling

Thromb. Haemost. 1999; 82 (2): 291-297

[63] Dumler I, Kopmann A, Weis A, Mayboroda OA, Wagner K, Gulba DC, Haller H; Urokinase activates the Jak/Stat signal transduction pathway in human vascular endothelial cells.

Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. 1999; 19: 290-297

[64] Dumler I, Weis A, Maybroda OA, Maasch C, Jerke U, Haller H, Gulba DC; The Jak/Stat pathway and urokinase receptor signaling in human aortic vascular smooth muscle cells

J. Biol. Chem. 1998; 273: 315-321

[65] Zhang F, Strand A, Robbins D, Cobb MH, Goldschmith EJ; Atomic structure of the MAP- Kinase ERK2

Nature. 1994; 367: 704-711

[66] Kandel E.S. Hay N; The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB

Exp. Cell Res. 1999; 253: 210-229

[67] Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S, Gavrilovic J; Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation.

Apmis. 1999; 107: 38-44

[68] Odekon LE, Sato Y; Rifkin DB; Urokinase- type plasminogen activator mediates basic fibroblast growth factor- induced bovine endothelial cell migration independent of its proteolytic activity

J. Cell Physiol. 1992; 150: 258-263

[69] Rabbani SA, Mazar AP, Bernier SM, Haq M, Bolivar I, Henkin J, Goltzman D; Structural requirements for the growth factor activity of the amino- terminal domain of urokinase.

J. Biol. Chem. 1992; 267: 14151-14156

[70] Plekhanova O, Parfyonova Y, Bibilashvily R, Domagatskii S, Stepanova V, Gulba DC, Agrotis A, Bobik A, Tkachuk V. Urokinase plasminogen activator augments cell proliferation and neointima formation in injured arteries via proteolytic mechanisms

Atheroscl. 2001; 159: 297-306

[71] Stepanova V, Mukhina S, Köhler E, Resink TJ, Erne P, Tkachuk VA. Urokinase plasminogen activator induces human smooth muscle cell migration and proliferation via distinct receptor dependent and proteolysis dependent mechanisms

Moll Cell Biochem. 1999; 195: 199-206

[72] Tanski WJ, Fegley AJ, Roctocil A, Davies MG. Domaine-dependent action of urokinase on smooth muscle cell responses

J Vasc Surg. 2004; 39: 214-222

[73] Kim KS, Hong Y-K, Lee Y, Shin J-Y, Chang S-C, Chung SI, Joe YA. Differential inhibition of endothelial cell proliferation and migration by urokinase subdomains: amino-terminal fragment and kringle domain

Exp Mol Med. 2003; 6: 578-585

[74] Sandip M. Kanse, Omar Benzakour, Chryso Kanthou, Christine Kost, H. Roger Lijnen, Klaus T. Preissner; Induction of vascular SMC proliferation by urokinase indicates a novel mechanism of action in vasoproliferative disorder

Arteriosclerosis, Thrombosis and vascular Biology. 1997; 17: 2848-2854

[75] Poliakov AA, Mukhina SA, Traktouev DO, Bibilashvily RS, Gursky YS, Minashkin MM, Stepanova VV, Tkachuk VA; Chemotactic effect of urokinase plasminogen activator: a major role of mechanisms independent of its proteolytic or growth factor domains

J. Recept. Signal Transduct. Res. 1999; 19: 939-951

[76] Carmeliet P, Moons L, Dewerchin M, Rosenberg S, Herbert IM, Lupu F, Collen D; Receptor- independent role of urokinase- type plasminogen activator in pericellular plasmin and matrix metalloproteinase proteolysis during vascular wound healing in mice

J. Cell Biol. 1998; 140: 233-245

[77] Paul HA Quax, Jos M Grimbergen, Mirian Lansink, Arjen HF Bakker, Marie-Claude Blatter, Dominique Belin, Victor WM van Hinsbergh, Jan H Verheijen; Binding of human urokinase- type plasminogen activator to its receptor: Residue involved in species specificity and binding

Arteioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1998; 18: 693-701

[78] Estreiche A, Wohlwend A, Belin D,Schleuning WD, Vassalli ID; Characterization of the cellular binding site for the urokinase- type plasminogen activator

J. Biol. Chem. 1989; 264: 1180-1189

[79] Dumler I, Petri T, Schleunuing WB. Induction of c- fos gene expression by urokinase- type plasminogen activator in human ovarian cancer cells

FEBS. 1994; 343 (2): 103-106

[80] Jaap L. Koopman, Jennichjen Slomp, Anton CW de Bart, Paul HA Quax, Jan H Verheijen; Mitogenic effects of urokinase on melanoma cells are independent of high affinity binding to the urokinase receptor

J. Biol. Chem. 1998; 273: 267-272

[81] Taher Nassar, Abdullah Haj- Yehias, Sa`ed Akkawi, Alice Kuo, Khalil Bdeir, Andrew Mazar, Douglas B. Cines, Abd Al- Roof Higazi: Binding of Urokinase to Low Density Lipoprotein- related Receptor (LRP) Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Contraction

J. Biol. Chem. 2002; 277: 40499-40504

[82] S. Steve Okada, Stephen R. Grobmyer, Elliot S. Barnathan: Contrasting Effects of Plasminogen Activators, Urokinase Receptor and LDL Receptor- Related Protein on Smooth Muscle Cell Migration and Invasion

Art. Thromb. and Vasc. Biol. 1996; 16: 1269-1276

[83] Zhang G, Cai X, Lopez- Guisa IM, Collins SJ, Eddy AA. Mitogenic signalling of Urokinase receptor- deficient kidney fibroblasts: actions of an alternative Urokinase receptor and LDL receptor- related protein

JASN. 2004; 15 (8): 2090-2102

[84] Kusch A, Tkachut S, Haller H, Dietz R, Gulba DC, Lipp M, Dumler I. Urokinase Stimulates Human Vascular Smooth Muscle Cell Migration via a Phosphatidylinositol 3- Kinase- Tyk2 Interaction

J. Biol. Chem. 2000; 275: 39466-39473

[85] Kiian I, Tkachuk N, Haller H, Dumler I. Urokinase-induced migration of human vascular smooth muscle cells requires coupling of the small GTPases RhoA and RacI to the Tyk2/PI3-K signalling pathway

Thromb Haemost. 2003; 89: 904-914

[86] Degryse B, Resnati M, Rabbani SA, Villa A, Fazioli F, Blasi F. Src-dependence and perussis-toxin sensitivity of urokinase receptor-dependent chemotaxis and cytoskleteon reorganisation in rat smooth muscle cells

Blood. 1999; 94: 649-662

[87] Chandrasekar N, Mohanam S, Gujrati M, Olivero WC, Dinh DH, Rao JS. Downregulation of uPA inhibits migration and PI3K/AKT signalling in glioblastoma cells

Oncogene. 2003; 22 (3): 392-400

[88] Coffer PJ, Woodgett JR, Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein- serine kinase related to the c- AMP dependent and protein kinase C families.

Eur. J. Biochem. 1991; 201: 475-481

[89] Frank TF, Tartof KD, Tsichlis PN, The SH2- like Akt homology (AH) domain of c- akt is present in multiple copies in the genome of vertebrate ant intervertebrate eucaryotes. Cloning and characterisation of the Drosophila melanogaster c- akt homology Dakt 1.

Oncogene. 1994; 9: 141-148

[90] Paradis S, Ruvkun G, Caenorhabtitis elegans AKT/PKB transduces insulin receptor- like signals from AGE-1 PI3- Kinase to the DAF- 16 transcription factor.

Genes Dev. 1998; 12: 2488-2498

[91] Kops GJ, Burgering BM. Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signalling

J. Mol. Med. 1999; 77: 656-665

[92] Cantrell D. Protein kinase B (Akt) regulation and function in T lymphocytes *Semmin Immunol.* 2002; 14: 19-26

[93] Schwab W, Gavlik JM, Beichler T, Funk RHW, Albrecht S, Magdolen V, Luther T, Kasper M, Shakibaei M. Expression of the urokinase-type plasminigen activator receptor in human articular chondrocytes: association with caveolin and β-integrin

Histochem Cell Biol. 2001; 115: 317-323

[94] Blasi F, Cameliet P. uPA: a versatile signalling orchestrator

Nature Rev Mol Cell Biol. 2002; 3: 932-943

[95] Warry KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG. A requirement for caveolin- 1 and associated kinase fyn in integrin signaling and anchorage- dependent cell growth

Cell. 1998; 94: 625-634

[96] Nguyen DHD, Webb DJ, Catling AD, Song Q, Dhakephalkar A, Weber MJ, Ravichandran KS, Gonias SL. Urokinase-type plasminogen activator stimulates the Ras/extracellular signalling-regulated kinase (ERK) signalling pathway and MCF-7 cell migration by a mechanism that requires focal adhesion kinase, Src, and Shc

J Biol Chem. 2000; 275: 19382-19388

[97] Bohuslav JB, Horejsi V, Hansmann C, Stöckl J, Weidle UH, Majdic O, Bartke I, Knapp W, Stockinger H. Urokinase plasminogen activator receptor, β2-Integrins, and Src-kinase within a single receptor complex in human monocytes

J Exp Med. 1995; 181: 1381-1390

[98] Aguirre Ghiso, J. A., Kovalski, K., Ossowski, L. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling.

J. Cell Biol. 1999; 147, 89-104

[99] Shuang Huang, Liguo New, Zhixing Pan, Jiahuai Han, Glen R. Nemerow Urokinase Plasminogen Activator/Urokinase- specific Surface Receptor Expression and Matrix Invasion by Breast Cancer Cells Requires Constitutive p38a mitogen- activated Protein Kinase Activity.

J. Biol. Chem. 2000; 275: 12266-12272

[100] Kusch A., Gulba DC. Die Bedeutung des uPA/uPAR-Systems für die Entwicklung von Arteriosklerose und Restenose.
Zeitschrift für Kardiologie. 2001; 90 (5): 307-318

8 Publikationen

8.1 Abstrakts

M. Grebe, T. Arendholz, U. Seay, S. Kanse, R. Braun- Dullaeus, H. Tillmanns, R. Voss (2003)

Urokinase (uPA) activates protein kinase B (Akt) on a phosphatidylinositol 3-kinase (PI(3)-kinase), Src- kinase and protein kinase A dependent pathway.

Ann Hematol 82 (Suppl): A32

M. Grebe, T. Arendholz, U. Seay, S. Kanse, H. Tillmanns, R. Voss, R. Braun-Dullaeus (2003)

Proteinkinase B (Akt) ist durch Urokinase (uPA) auf PI(3)- Kinase, Src- Kinase und Proteinkinase A- abhängigen Weg stimulierbar.

Z Kardiol 92 (Suppl 1): I 30

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. R. Voss danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die freundliche Unterstützung und Anregung während der Durchführung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. M. Grebe für die engagierte Betreuung während der experimentellen Phase sowie für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Frau Ulrike Seay danke ich für die hervorragende Unterstützung und Beratung bei der technischen Durchführung der Experimente. Durch ihre langjährige Erfahrung trug sie entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.
Weiterhin danken möchte ich Prof. Dr. med. R. Braun- Dullaeus für die bereitwillige Überlassung eines Laborplatzes in der molekularen Kardiologie sowie für seine freundliche Unterstützung in der experimentellen Phase der Durchführung.