

Aus der Medizinischen Klinik für Kardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle der Januskinasen Jak1 und Tyk2 bei der
monozyteninduzierten Proliferationshemmung glatter
Gefäßmuskelzellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Markus von Schaewen

aus Berlin

Gutachter/in: 1. PD Dr. med. Cemil Özcelik
 2. Prof. Dr. med. Vera Regitz-Zagrosek
 3. PD Dr. med. Oliver Ritter

Datum der Promotion: 03. September 2010

MEINEN LIEBEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Atherosklerose und Restenose.....	1
1.1.1 Störung der Endothelzellfunktion und Monozyteninvasion.....	1
1.1.3 Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen	2
1.1 Die Rolle des uPA/uPAR – Systems bei der Pathogenese der Atherosklerose	3
1.1.1 Molekülstruktur und biologische Bedeutung	3
1.2.3 Interaktionspartner des uPAR in VSMC	6
1.3 Der Signalweg Jak/Stat	8
1.3.1 Biologische Bedeutung der Januskinasen	8
1.3.2 Biologische Bedeutung der Stat-Proteine.....	10
1.4 Der uPA-induzierte Signalweg Jak/Stat in VSMC.....	11
1.5 Atherosklerose und das Monozyten- VSMC-Kokulturmodell.....	12
2. Ableitung einer Aufgabenstellung.....	13
3. Materialien und Methoden	14
3.1 Geräteliste.....	14
3.2 Puffer und Lösungen.....	14
3.3 Zellkulturmedien	16
3.4 Chemikalien und biochemische Substanzen	17
3.5 Antikörper	17
3.5.1 Primärantikörper	17
3.5.2 Sekundärantikörper	18
3.6 Allgemeine proteinchemische Arbeitsmethoden.....	18
3.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford	18
3.6.2 SDS-PAGE	19
3.6.3 Western-Blotting.....	19
3.6.3.1 Semi-dry Blotting.....	19
3.6.3.2 Immunologischer Proteinnachweis auf PVDF-Membranen.....	19
3.6.3.3 Reprobing von PVDF-Membranen	20
3.7 Molekularbiologische Arbeitsmethoden	20
3.7.1 Adenovirale Vektoren	20
3.7.2 Amplifizierung von Adenoviren.....	21
3.7.2.1 Infektion von HEK293-Zellen mit Adenoviren.....	21
3.7.2.2 Aufreinigung von Adenoviren aus HEK293-Zellen	22
3.7.3 Funktionstestung der adenoviralen Vektoren.....	24
3.8 Zellkultur.....	24
3.8.1 Humane glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC).....	24

Inhaltsverzeichnis

3.8.2 Infektion von VSMC mit Adenoviren.....	25
3.8.3 Monozytenisolation aus Vollblut.....	25
3.8.4 VSMC-/Monozytenkokultur.....	26
3.9 Immunfluoreszenzfärbungen und Konfokalmikroskopie	27
3.10 Proliferationsassay	27
3.10.1 Statistische Auswertung	28
4. Ergebnisse	29
4.1 Effektivität der in HEK 293 amplifizierten Adenoviren.....	29
4.1.1 Inhibition der Stat1-Phosphorylierung an Tyr ⁷⁰¹	29
4.1.2 Inhibition der zytosolisch-nukleären Stat1-Translokation	31
4.2 Evaluation der Methode zur Bestimmung der Proliferationsrate von VSMC in direkter Kokultur mit Monozyten.....	33
4.3 Die Rolle von Jak1 und Tyk2 bei der Aktivierung von Stat1 in mit Monozyten kokultivierten VSMC.....	35
4.4 Evaluation der Rolle der Januskinasen Jak1 und Tyk2 bei der monozyteninduzierten Proliferationshemmung von VSMC	37
4.4.1 Statistische Auswertung	41
5. Diskussion.....	42
6. Zusammenfassung	49
7. Literaturverzeichnis.....	51
8. Anhang.....	59
I Lebenslauf.....	59
II Publikationen	60
III Selbständigkeitserklärung	61
Danksagung.....	62

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
A	Ampere
Ad5	Adenovirus Typ 5
aqua dest.	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	bovine serum albumin
c	centi (10^{-2})
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
Da	Dalton
FACS	fluorescence activated cell sorting
FGF-1	fibroblast growth factor 1
FKS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Konstante für die Erdbeschleunigung
GAS/ISRE	interferon- γ -activation site/interferon stimulated response element
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
hEGF	human epidermal growth factor
HEKC	human embryonal kidney cell
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl-)-piperazin-1-ethansulfonsäure
hFGF	human fibroblast growth factor
HRPO	horseradish peroxidase

Abkürzungsverzeichnis

ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
k	kilo (10^3)
Jak	Januskinase
Jak1 Δ C	Kinasedomäne-defiziente Januskinase 1
l	Liter
LDL	low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli (10^{-3})
min	Minute
MW	Mittelwert
n	nano (10^{-9})
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin
pH	pondus hydrogenii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
pTyr	phosphorylierter Tyrosinrest
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	ribonucleic acid
ρ	Formelzeichen für Dichte
RT	Raumtemperatur
rpm	rounds per minute
RNAi	interference-ribonucleicacid
SA	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate

Abkürzungsverzeichnis

Stat	signal transducer and activator of transcription
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyk	Tyrosinkinase
Tyk2 Δ C	Kinasedomäne-defiziente Tyrosinkinase 2
Tyr	Tyrosinrest
uPA	Urokinase Plasminogenaktivator
uPAR	Urokinase Plasminogenaktivator Rezeptor
VCAM	Vascular adhesion molecule
VSMC	vascular smooth muscle cell (glatte Gefäßmuskelzellen)

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose und Restenose

Atherosklerose und Restenose sind die Hauptursachen für den akuten Myokardinfarkt, Schlaganfall und periphere arterielle Verschlusskrankheit und damit verantwortlich für 50% der Mortalität in Europa, den USA und Japan (1). Die derzeit bedeutendsten Therapieoptionen der Atherosklerose sind die chirurgische Bypassanlage oder die perkutan durchgeführte Ballondilatation (Perkutane Transluminale Angioplastie). Die Anwendung dieser Therapieoptionen ist jedoch durch das Auftreten erheblicher Restenoseraten limitiert. Dies macht deutlich, wie wichtig ein grundlegendes Verständnis der Pathogenese von Atherosklerose und Restenose ist. Das Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen auf molekularer Ebene bildet die Grundlage für eine ursächliche Therapie der Entstehung von Restenosen und der Progredienz der Atherosklerose. Zwar ist inzwischen anerkannt, dass es sich bei der Atherosklerose um eine systemische, inflammatorische Erkrankung handelt (2), doch die damit einhergehenden komplexen funktionellen Änderungen auf zellulärer und molekularer Ebene sind oft erst im Ansatz verstanden und Gegenstand aktueller Forschung.

1.1.1 Störung der Endothelzellfunktion und Monozyteninvasion

Anerkannte Modelle zur Atherogenese beschreiben eine gestörte Endothelzellfunktion als ersten Schritt für die im Weiteren ablaufenden Pathomechanismen (3). Ursächlich ist ein dauerhaftes Missverhältnis endothelabhängiger Vasokonstriktoren und Vasodilatoren wie Stickstoffmonoxid (NO). Vasokonstriktoren, die in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, sind vor allem Endothelin-1, Thromboxan A₂ und Prostaglandin H₂. Die Bildung von Endothelin-1 in Endothelzellen wird u. a. durch oxLDL, Thrombin, TGF-β1, Interleukin-1 und Angiotensin II stimuliert. Von diesen Faktoren ist bekannt, dass sie beim Vorliegen von

Atherosklerose erhöht sind. Die Bildung von NO wiederum wird durch oxLDL gehemmt (4). Eine physiologisch wichtige Gefäßrelaxation als Adaptation auf flussinduzierte Scherkräfte des Blutes wird so erschwert und begünstigt auf diesem Weg die Läsionsentstehung der Intima.

Bei gestörter Endothelzellfunktion sezernieren Endothelzellen unter anderem MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), wodurch Monozyten chemotaktisch angelockt werden. Zudem exprimieren sie verstärkt Proteine wie ICAM-1 oder VCAM-1, die erst zu einer Adhäsion, und schließlich zur Invasion der Monozyten in die Intima führen (5). In der Intima wandeln sich die Monozyten unter dem Einfluss von oxLDL und weiterer Substanzen in Makrophagen um. Unter Aufnahme von oxLDL über Scavenger-Rezeptoren entwickeln sich die Makrophagen zu Schaumzellen. Die Kumulation der Schaumzellen korreliert histologisch mit dem Auftreten von sogenannten fatty streaks in der Intima. Die Bildung von Schaumzellen ist deswegen bedeutsam für die Atherogenese, weil sie über die Sezernierung verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren maßgeblich zum weiteren Verlauf beitragen. So sezernieren aktivierte Makrophagen und Schaumzellen Botenstoffe wie IL-1, TNF α , TGF β und PDGF. Diese Botenstoffe nehmen entweder direkt oder im Zusammenspiel mit Endothelzellen, T-Lymphozyten und aktivierten Plättchen und Substanzen wie Angiotensin II sowie uPA Einfluss auf die Funktion und Syntheseleistung glatter Gefäßmuskelzellen. Glatte Gefäßmuskelzellen werden in die Lage versetzt, elastische und kollagene Fasern, sowie Proteoglykane zu sezernieren. Auf diese Weise tragen sie entscheidend zur Intimaverdickung und zur Fibrosierung der Läsionen und damit zur Entstehung atherosklerotischer Plaques bei (1).

1.1.3 Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

Glatte Gefäßmuskelzellen sind die in der Arterienwand vorherrschende Zellpopulation. Zeitgleich mit der unter 1.1.2. beschriebenen Monozyteninvasion kommt es unter dem Einfluss zahlreicher Signalmoleküle zur Entdifferenzierung und Migration glatter

Gefäßmuskelzellen von der Media in die Intima (6;7). Als promigratorisch wirksame Moleküle, die bei der Neointimabildung eine Rolle spielen, konnten neben PDGF und Angiotensin II auch die unter anderem monozytär sezernierte Protease uPA identifiziert werden (8-10).

In zahlreichen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen ein entscheidender Schritt für die Neointimaentstehung nach Restenose ist (11;12). Neben der Stimulation durch PDGF, FGF-1, aber auch durch Interleukine wie IL-1, TNF α und TGF β spielt die Serinprotease uPA bei diesem Prozess eine bedeutsame Rolle (13;14). In Studien an menschlichen Läsionen konnte jedoch im Gegensatz zu den Beobachtungen im Tiermodell, zumindest in der frühen Phase der Neointimaentstehung, nur ein geringer Teil proliferierender glatter Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden. Diese Befunde deuten darauf hin, dass in der frühen Phase der Neointimaentstehung proliferationshemmende Mechanismen überwiegen (7;15).

In vorangegangenen Arbeiten hat sich unsere Arbeitsgruppe mit Regulationsmechanismen beschäftigt, die Einfluss auf Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen bei der Entstehung von Atherosklerose und Restenose haben. Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem uPA/uPA-Rezeptorsystem zu.

1.1 Die Rolle des uPA/uPAR – Systems bei der Pathogenese der Atherosklerose

1.1.1 Molekülstruktur und biologische Bedeutung

Urokinase-type Plasminogen Aktivator (uPA) gehört zu den Serinproteasen. Es wurde primär aus menschlichem Urin isoliert, kommt jedoch auch im Blut und in der extrazellulären Matrix vor (16;17). Die zelluläre Sekretion von uPA erfolgt als pro-uPA mit einem Molekulargewicht von 55 kDa. Durch proteolytische Spaltung wird der inaktive pro-uPA in seine aktive zweikettige hochmolekulare Form überführt. Die beiden Ketten sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Hochmolekularer uPA besteht aus drei Domänen

unterschiedlicher Funktion. Die wachstumsfaktorähnliche Domäne (GFD) ist verantwortlich für die Bindung am uPAR. An die GFD schließt sich die sogenannte Kringle-Domäne an, über die eine Bindung an Polyanionen wie Proteoglykanen ermöglicht wird. Die Kringle-Domäne und GFD werden zusammen als aminoterminales Fragment (ATF) bezeichnet. Die C-terminale Domäne wird als Serinprotease-Domäne bezeichnet und ist für die proteolytische Aktivität von uPA verantwortlich. Das primäre physiologische Substrat ist Plasminogen, das zu aktivem Plasmin gespalten wird und eine proteolytische Kaskade triggert, die je nach Umgebung zur Thrombolysse, bzw. extrazellulärer Matrixdegradation führt. Durch Plasmin kann hochmolekulares uPA in das aminoterminalen Fragment und niedermolekulares uPA gespalten werden. Niedermolekulares uPA hat keine Affinität zum uPAR, besitzt jedoch vollständige proteolytische Aktivität. Entsprechend besitzen das ATF und hochmolekulares uPA eine hohe Bindungsaffinität zum uPAR (18-20).

Der uPAR, auch bekannt als CD 87, ist ein aus 283 Aminosäuren bestehendes 55 kDa Glycoprotein, das aus drei Domänen (D1-D3) besteht. Für das Verständnis der Funktion ist elementar, dass der uPAR keine Transmembrandomäne hat. Er ist lediglich über eine kovalente Bindung an einen Glycosyl-Phosphatidylinositol-(GPI)-Anker mit der Plasmamembran verbunden. Diese Eigenschaft verschafft dem uPAR eine hohe laterale Mobilität in der Zellmembran und erleichtert die gezielte funktionsgerechte Lokalisation des Rezeptors, z. Bsp. in Zellinvaginationen oder Kaveolen (21;22).

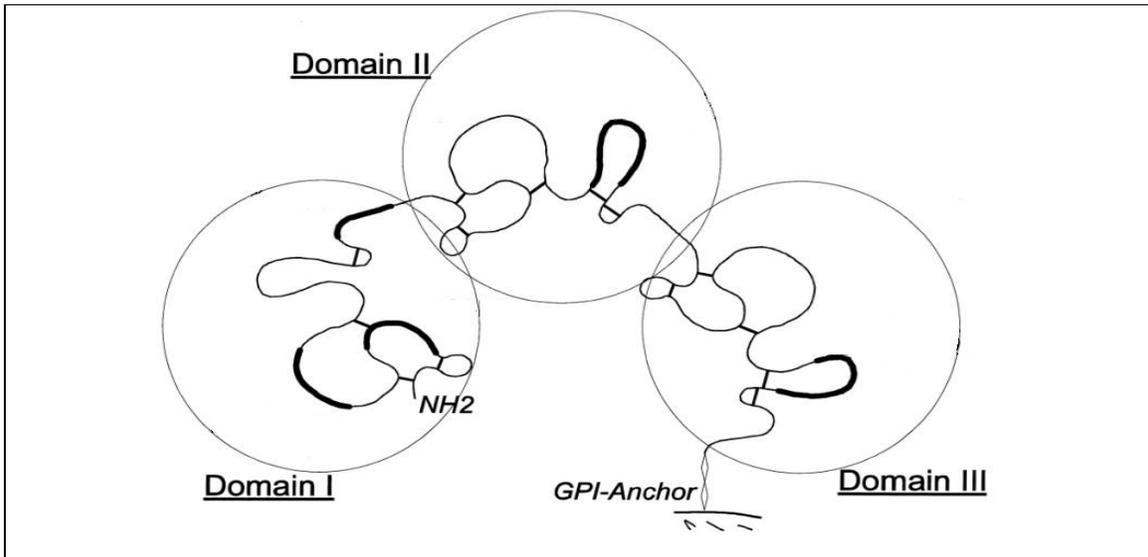


Abbildung 1: Molekülstruktur des uPAR mit Darstellung der 3 Domänen. Dick dargestellte Aminosäurekettenabschnitte zeigen mögliche uPA-Bindungsstellen (Abbildung modifiziert nach Liang, OD et al. J. Biol. Chem. 2001;276:28946-28953)

In Abhängigkeit ihres Funktionszustandes wird uPA in unterschiedlichem Maße von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten und entscheidenderweise auch von Monozyten sezerniert (23;24). Hervorzuheben ist dabei die Doppelfunktion von uPA. Zum einen entfaltet er vielfältige Wirkungen als Protease, zum anderen fungiert er als Ligand für den uPA-Rezeptor, der nach uPA-Bindung Konformationsänderungen erfährt und seinerseits intrazelluläre Signaltransduktionswege anstößt (25). Die Bindung von uPA an seinen Rezeptor verstärkt die Proteaseaktivität und steuert sie räumlich durch Rekrutierung des uPAR an bestimmte Regionen der Zelloberfläche. Ein Beispiel hierfür ist die Rezeptorpolarisation an die führende Front der Zelle, wie sie bei der Zellmigration beobachtet werden kann (26). Die Rezeptorpolarisation an die führende Front ist bei der Migration deswegen von Bedeutung, weil diese einen gezielten Abbau von extrazellulärer Matrix entweder direkt durch Proteolyse von Matrixproteinen wie Fibronectin und Laminin oder indirekt durch Aktivierung von Plasmin ermöglicht (27-29).

Endogen kommt es in Kokultur von Monozyten mit glatten Gefäßmuskelzellen zu einer verstärkten Freisetzung von uPA mit gleichzeitig erhöhter Expression des uPAR auf den

glatten Gefäßmuskelzellen, was zu deren Steigerung der Migration und Hemmung der Proliferation führt (30;31). Durch seinen potenten Einfluss auf Zelladhäsion, Zelldifferenzierung, Migration und Proliferation verschiedener Zelltypen (32) steht damit das uPA-uPAR-System in direktem Zusammenhang mit Prozessen der Gewebsumbildung und Wundheilung und stellt somit auch einen wichtigen Steuerungsmechanismus bei den Vorgängen der atherosklerotischen Gefäßumbildung dar (33). Es konnte z. Bsp. gezeigt werden, dass es nach Gefäßwandverletzung in uPA-defizienten Mäusen zu einer geringeren Neointimaausbildung, sowie signifikant gesenkten Migrationsraten von VSMC kam (34).

1.2.3 Interaktionspartner des uPAR in VSMC

Wie bereits weiter oben erwähnt besitzt der uPAR als GPI-gebundenes, extrazellulär membranständiges Protein keine Transmembrandomäne. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit einer Assoziation mit anderen Proteinen, um seine Funktionen ausüben zu können. Als Interaktionspartner wurden bereits verschiedene Integrine beschrieben. So konnte eine uPA-abhängige hochaffine Bindung von $\alpha_1\beta_3$ an den uPAR nachgewiesen werden (35). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der uPAR in der Lage ist, FLPR1, ein Protein aus der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, zu aktivieren (36).

An humanen VSMC wurde demonstriert, dass der uPAR uPA-abhängig mit PDGFR β assoziiert und diese Interaktion zu einer PDGF-unabhängigen Tyrosinphosphorylierung zytosolischer PDGFR β -Domänen und Rezeptordimerisation führt (37).

Unsere Arbeitsgruppe konnte an humanen VSMC den Nachweis erbringen, dass durch uPA aktivierter uPAR zu einer Assoziation und Tyrosinphosphorylierung von Januskinasen und src-Protein-Tyrosinkinasen (src-PTK) führt. Namentlich konnten Jak1, Tyk2 sowie p59^{fyn}, p53/56^{lyn}, p53/59^{hck} und p55^{fgr} identifiziert werden (38).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch uPA-Wirkung am uPAR eine Tyrosinphosphorylierung und nukleäre Translokation von Stat1, Stat2 und Stat4, nicht aber von Stat3, Stat5 oder Stat6 stattfindet. Es konnte demonstriert werden, dass ein Stat1-Stat2-

Heterodimer gebildet wird, das über GAS (interferon- γ -activation site) an der DNA bindet (39).

Die Assoziation des uPAR mit dem Jak-Stat-Signalweg ist keinesfalls auf VSMC beschränkt. Auch in Gefäßendothelzellen uPA-abhängig zu einer uPAR-Assoziation und Aktivierung von Jak1 und Tyk2 sowie des Transkriptionsfaktors Stat1, der an GAS/ISRE-Motive der DNA bindet (40). An anderer Stelle konnten ähnliche Befunde erhoben werden. So konnten Koshelnick et al. an Nierenepithel-Tumorzellen nachweisen, dass das Clustering von uPA/uPAR zu einer Assoziation von Jak1 mit dem uPAR und zur Phosphorylierung und Dimerisierung von Stat1 und konsekutiver nukleärer Translokation führt (41).

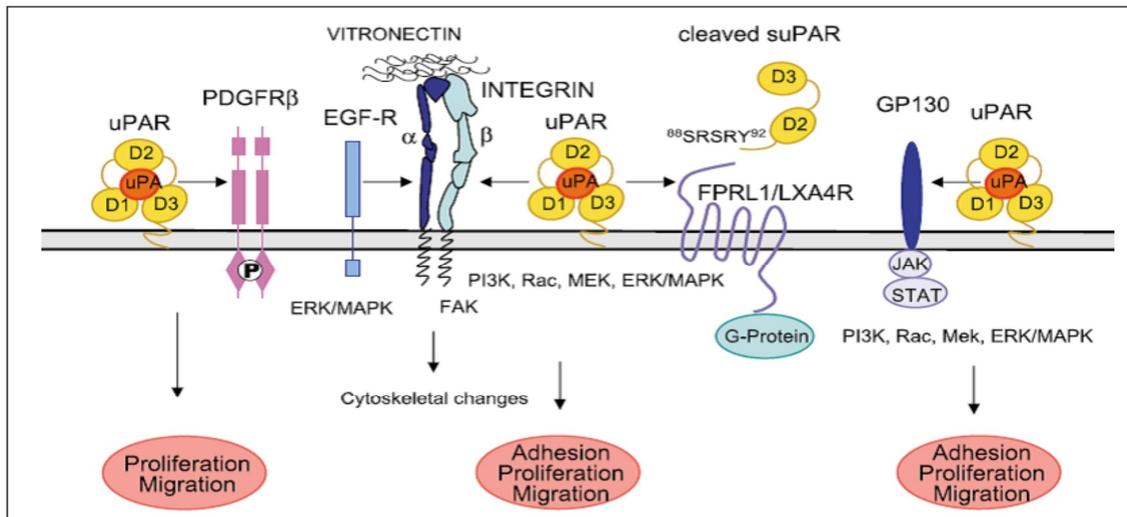


Abbildung 2: Interaktionspartner des uPA/uPAR-Systems (Abbildung modifiziert aus Binder BR et al., *Thromb Haemost* 2007; 97: 336-342)

1.3 Der Signalweg Jak/Stat

1.3.1 Biologische Bedeutung der Januskinasen

In Säugetierzellen konnten vier Vertreter aus der Gruppe der Januskinasen identifiziert werden. Dabei handelt es sich um Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2 (42). Diese Kinasen haben ein relativ großes Molekulargewicht von 120-140 kDa und weisen sieben strukturhomologe Segmente auf (JH1 – JH7) (siehe auch Abbildung 3). Allen Januskinasen ist das Vorhandensein einer Kinasedomäne (JH1) und einer Pseudokinasedomäne (JH2) gemein (43). Während JH1 das katalytische Zentrum der Kinasen darstellt, ist die Funktion von JH2 bis JH7 wenig verstanden. Für die Pseudokinasedomäne JH2 wird eine regulierende, die Kinaseaktivität inhibierende Funktion angenommen (44;45). Für die N-terminale Region der Januskinasen, im Bereich von JH6 - JH7, auch als FERM-Domäne bezeichnet, ist bekannt, dass er für die Bindung am Zytokinrezeptor verantwortlich ist (46-48).

Die Januskinasen sind wichtiger Bestandteil der durch ein weites Spektrum von Zytokinen, Lymphokinen, Wachstumsfaktoren wie IL-2, IL-6, GM-CSF, Prolaktin, Thrombopoetin, IFN α oder IFN β , aber auch der regulatorischen Protease uPA vermittelten intrazellulären Signalkaskaden. Für jeden dieser Mediatoren wurde die Aktivierung spezieller Muster von Januskinasen demonstriert, die wiederum zur Aktivierung bestimmter Muster von Stat-Proteinen führen (38;49).

Gut beschrieben ist die Assoziation von Januskinasen mit Rezeptoren, die selbst keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzen. Dies konnte zuerst für die Interaktion von Jak2 mit dem Erythropoetinrezeptor und dem Wachstumshormonrezeptor gezeigt werden (50;51). Diese Rezeptoren bilden nach Bindung ihres Liganden Homodimere, so dass in diesem Fall eine Homodimerisation und Aktivierung durch Transphosphorylierung von Jak2 resultiert. Rezeptoren, die nach Ligandenbindung Heterodimere aus verschiedenen Untereinheiten

bilden, wie das bei vielen Interferonrezeptoren der Fall ist, können dem zu Folge zur Bildung von Heterodimeren verschiedener Januskinasen führen (52).

Über die Substrate der Januskinasen ist bislang nur unzureichendes Wissen vorhanden. Neben den Zytokinrezeptoren selbst und, wie im nächsten Kapitel beschrieben, den Stat-Proteinen, ist die Interaktion mit dem Signaltransduktions-Adaptermolekül STAM1 und die Bindung der Proteine SH2B β und Aps, die Einfluss auf die Regulierung der Kinaseaktivität haben, bekannt (53;54).

Die klinische Bedeutung der Januskinasen lässt sich am Beispiel von Jak3 sehr gut illustrieren. Jak3 bindet spezifisch an der γ c-Zytokinrezeptoruntereinheit (CD132). Eine Mutation von γ c oder Jak3 führt zu einer Variante des Schwere Kombinierten Immundefekt (SCID), die durch einen Mangel von T- und NK-Zellen, nicht aber von B-Zellen (T^B⁺-SCID) charakterisiert ist (55).

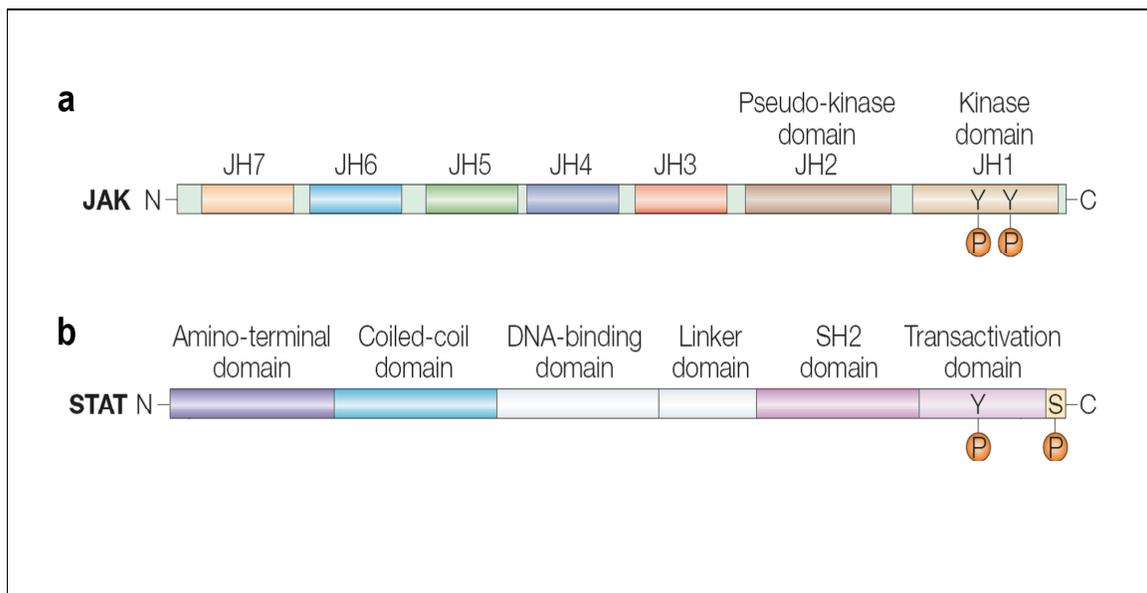


Abbildung 3: Strukturmerkmale von a) Januskinasen und b) Stats mit Darstellung der strukturhomologen Domänen JH1 bis JH7 (Abbildung modifiziert aus Shui K, Nature Immunol. Rev 2003; 3(11): 900-911)

1.3.2 Biologische Bedeutung der Stat-Proteine

Die Gruppe der Signal transducer and activator of transcription (Stat) wird in Säugetierzellen durch Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b und Stat6 repräsentiert. Die Vertreter dieser Proteinfamilie erfüllen charakteristische funktionelle Anforderungen. Sie sind in der Lage; an tyrosinphosphorylierten Rezeptoren zu binden, selbst phosphoryliert zu werden, zu dimerisieren, in den Zellkern zu translozieren, DNA zu binden und daraufhin die Genexpression zu modulieren. Charakteristisch ist die hohe Geschwindigkeit dieses Signalweges. Die Stat-DNA-Bindung ist bereits wenige Minuten nach Rezeptorstimulation nachweisbar (56).

Die Struktur der Stat-Proteine ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Sie bestehen aus 750 – 850 Aminosäuren und besitzen eine N-terminale-Domäne, eine „Coiled-coil“-Domäne, eine DNA-Bindungsdomäne, eine „Linker“-Domäne, eine SH-2-Domäne und eine Transkriptionsaktivierungs-Domäne (49).

Stats können mit ihrer hochkonservierten SH2-Domäne an phosphorylierten zellulären Domänen von Wachstumshormonrezeptoren und Interleukinrezeptoren binden. Voraussetzung ist die Phosphorylierung dieser Domänen durch Januskinasen, Erst hierdurch wird eine Bindungsstelle für Stats freigelegt. Neben der Bindung von Stat an intrazelluläre Rezeptordomänen sind aber auch direkte Interaktionen mit Januskinasen, wie z. Bsp. zwischen Stat5 und aktiviertem Jak3 möglich (57).

Nach Bindung von Stat-Proteinen an ihre spezifischen Rezeptordomänen erfolgt die Aktivierung von Stat durch Phosphorylierung eines Tyrosinrestes. Klassischerweise geschieht dies durch Januskinasen. Es wurde aber auch beschrieben, dass Rezeptoren mit intrinsischer Phosphorylierungsaktivität auch in Abwesenheit von Januskinasen oder anderer Protein-Tyrosinkinase Stat aktivieren können. So aktiviert EGFR direkt Stat-Proteine und die PDGF-Aktivierung von PDGFβR führt direkt zur Phosphorylierung von Stat5 (58;59).

Aktivierte Stats bilden in Abhängigkeit von ihrer SH2-Domäne und der Mikroumgebung des phosphorylierten Tyrosinrestes entweder Homodimere oder Heterodimere über reziproke Phosphotyrosin-SH2-Interaktion (60). Hierbei wird eine nukleäre Lokalisierungssequenz

(NLS) freigelegt. Daraufhin erfolgt der Transport der Stat-Dimere zum Zellkern zytoskelettunabhängig via Diffusion (61). Zur Translokation in den Kern wurde die Beteiligung von Importinen beschrieben. Die Passage der Kernmembran erfolgt über NPC's (Nuclear core complex) (62;63). Im Zellkern können die Stat-Dimere direkt an bestimmten semipalindromen DNA-Motiven, den GAS, binden. Eine Ausnahme bildet das von Typ-I-Interferonen gebildete Stat1-Stat2-Dimer. Dieses benötigt das DNA-Bindungsprotein p48 und bindet spezifisch an interferon stimulated response elements (ISRE) (42).

Eine Verstärkung der Transkriptionsaktivität wird durch Serinphosphorylierung der Stats erreicht. So können Stat1 und Stat3 an Ser⁷²⁷ phosphoryliert werden (64).

Die Regulation der Stat-Aktivität ist komplex und erst in Ansätzen verstanden. Bekannt ist eine negative Regulation der Stat-Aktivität durch suppressors of cytokine signaling (SOCS), Proteininhibitoren aktivierter Stats (PIAS) und Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) (65-67).

1.4 Der uPA-induzierte Signalweg Jak/Stat in VSMC

Weiter oben wurde bereits beschrieben, dass es in VSMC zu einer uPA-abhängigen Tyrosinphosphorylierung von Jak1, Tyk2 sowie von Stat1, Stat2 und Stat4 kommt. Diese Befunde legen nahe, dass dem Jak-Stat-System wichtige Funktionen im intrazellulärem uPA-Signaltransduktionsweg zukommen. In der Tat fand man, dass Tyk2 uPA-abhängig über eine Bindung an die p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) und deren Aktivierung zu einer Steigerung der Migration von VSMC führt. Eine solche p85-Bindung konnte für Jak1, Jak2 oder Jak3 nicht nachgewiesen werden (68). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser uPA-abhängige Tyk2/PI3-K-Signalweg an die Bindung von GTP-aktiviertem RhoA und Rac1 gekoppelt ist (69).

1.5 Atherosklerose und das Monozyten- VSMC-Kokulturmodell

Es wurde bereits darauf eingegangen, dass es bei der Entstehung von Atherosklerose zu einer Infiltration der Gefäßwand durch Monozyten kommt. Daraufhin treten Monozyten über eine Vielzahl von Mediatoren mit VSMC in Interaktion. In atherosklerotischen Läsionen findet sich eine auffällig erhöhte Expression von uPA/uPAR (70). Diese histomorphologischen Befunde weisen auf weitreichende funktionelle Zell-Zell-Interaktionen und Konsequenzen für das Zellverhalten mittels dieses Rezeptorsystems hin. Monozyten exprimieren uPA, was eine chemotaktische Wirkung auf VSMC hat (33). Interessanterweise besitzt der uPAR eine Proteaseangriffstelle zwischen D1 und D2, die spezifisch durch uPA gespalten wird. Für das auf diese Weise vom uPAR gespaltene Peptid konnte wiederum eine chemotaktische Wirkung auf monozytenähnliche Zelllinien wie THP-1 demonstriert werden (71).

Direkte Kokultur von Monozyten mit VSMC führt zu einer um das fünffache höheren uPA-Expression als Monozyten in Monokultur. Mit diesem Befund steht im Einklang, dass die uPAR-Expression durch VSMC ebenfalls signifikant erhöht ist (31). Dies führt zu einer deutlichen Steigerung der Migration VSMC in Kokultur mit Monozyten (31;68). Über eine Hemmung der uPA-Wirkung durch suPAR (löslichen uPA-Rezeptor) konnte der Nachweis erbracht werden, dass die monozyteninduzierte Migrationssteigerung allein durch den uPA-uPAR-Signalweg vermittelt wird (68). Parallel zu der gesteigerten Migration der VSMC kommt es zu einer uPA/uPAR/Stat1-vermittelten Hemmung der Proliferation, was klinisch in der Frühphase nach Gefäßverletzung beobachtet werden kann (30).

Somit erscheint dieses Kokulturmodell mit direkter Interaktion von VSMC mit Monozyten valide, intrazelluläre Mechanismen der komplexen Pathogenese der Atherosklerose weiter zu studieren und wichtige Targets möglicher neuer anti-atherosklerotischer oder anti-restenotischer Therapien zu identifizieren.

2. Ableitung einer Aufgabenstellung

In der Frühphase der Atherosklerose kommt es zu verschiedenen funktionellen Änderungen von VSMC, wie Steigerung der Migrationsrate und Hemmung der Proliferation (7;15). Dabei kommunizieren Monozyten, die nach Gefäßendothelläsionen die Intima infiltrieren, über eine Vielzahl von Mediatoren mit VSMC und tragen so zur Neointimaentstehung bei. Das uPA-uPAR-System ist ein potenter Signalweg, der funktionelle Veränderungen in VSMC induzieren kann.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Monozyten im VSMC-Monozytenkokulturmodell eine Steigerung der Migration und eine Hemmung der Proliferation induzieren und dass dieser Effekt über monozytär sezerniertes uPA vermittelt wird (30;31). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in VSMC die Januskinasen Jak1 und Tyk2 uPA-abhängig mit dem uPAR assoziieren (38). Dabei wird die Migration über eine Urokinase-induzierte Phosphatidylinositol-3-Kinase-Tyk2-Interaktion vermittelt (68).

Bisher war allerdings völlig unbekannt, ob die monozytär induzierte Proliferationshemmung auch durch Januskinasen vermittelt wird und ob eventuell gerade die zweite mit dem uPAR assoziierte Kinase Jak1 diese Funktion übernimmt. Die Identifikation einer Schlüsselkinase könnte von besonderer Bedeutung für neue Therapieansätze bei der Behandlung von Atherosklerose und Restenose sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Beteiligung der Januskinasen Jak1 und Tyk2 an zentralen Signalschritten der monozyteninduzierten Proliferationshemmung zu untersuchen. Insbesondere sollte dabei die Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors Stat1, sowie die funktionelle Bedeutung dieser beiden Kinasen im komplexen VSMC-Monozyten-Kokulturmodell beleuchtet werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Geräteliste

GERÄT	HERSTELLER
Mini-Protean II mit Power Supply 1000/500	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
MRC1024 Konfokalmikroskop	BioRad (Hercules, CA)
Trans-Blot-SD mit Power Supply 1000/500	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Thermomixer 5437	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
XL-Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter (Fullerton, CA)
Biofuge pico	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Sigma 3K10	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)

3.2 Puffer und Lösungen

BEZEICHNUNG	ZUSAMMENSETZUNG
Adenoviruspuffer	Aqua bi dest. 10 % Glycerol 135 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 3 mM KCl 1 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O pH 8,0
FACS-Puffer	PBS 5 mM EDTA 1 % (w/v) FKS

Material und Methoden

HEPES/NaCl-Puffer	10 mM HEPES 150 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 2 mM CaCl ₂ pH 7,4
Laufpuffer für SDS-PAGE	Aqua bi dest. 0,1 % (w/v) SDS 192 mM Glycin 25 mM Tris-HCl
Lysepuffer	Aqua bi dest. 1 % (v/v) Triton X 100 150 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 2 mM EDTA pH 7,5
MACS-Puffer	PBS 0,5 % (w/v) BSA 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes Serum 2 mM EDTA
PBS	150 mM NaCl 8 mM NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O 3 mM KCl pH 7,4
Strippingpuffer	2 % (w/v) SDS 200 mM β-Mercaptoethanol 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
TBS-T	TBS 0,1 % Tween 20

Material und Methoden

Transferpuffer	Aqua bi dest. 48 mM Tris 39 mM Glycin 10% SDS 20% Methano
Trypsin/EDTA	140 mM NaCl 7 mM NaHCO ₃ 5,6 mM Glucose 5,4 mM KCl 680 nM EDTA Glucose 21 nM Phenol 500 mg/l Trypsin

3.3 Zellkulturmedien

BEZEICHNUNG	ZUSAMMENSETZUNG
HEK-Medium	10 % (v/v) FKS in DMEM-Medium (HyClone, South Logan, UT)
VSMC-Vollmedium	0,5 ng/ml hEGF 5 ng/ml Insulin 2 ng/ml hFGF 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (5.000 U/ml Penicillin, 5.000 µg/ml Streptomycin) 5 % (v/v) FKS in SmBM-Medium (Lonza, Walkersville, MD)
VSMC- Mangelmedium	1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (5.000 U/ml Penicillin, 5.000 µg/ml Streptomycin) in SmBM-Medium (Lonza, Walkersville, MD)

3.4 Chemikalien und biochemische Substanzen

Alle verwendeten Chemikalien und Lösemittel waren von p. A. Qualität und wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Für die Monozytenisolation aus Vollblut und die Separation der VSMC-Monozyten-Kokultur wurden FcR-Blocking Reagent, Hapten-Antibody-Cocktail, Anti-Hapten-Microbeads aus dem Monozyten Isolation Kit I, CD14-Microbeads PreSeparation-Filter und LS-Separation-Columns sowie LC-Separation Columns in Verbindung mit einem VarioMacsSeparator von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) bezogen. Alle weiten Feinchemikalien und biochemischen Substanzen werden bei den jeweiligen Methoden mit ihren Bezugsquellen aufgeführt.

3.5 Antikörper

3.5.1 Primärantikörper

ANTIKÖRPER	HERSTELLER
PE- konjugierter Maus anti-CD14 monoklonaler Antikörper	Jackson Immuno Research (West Grove, PA)
anti-Stat1 monoklonaler Antikörper	Transduction Laboratories (San Jose, CA)
anti-Jak1 monoklonaler Antikörper	Transduction Laboratories (San Jose, CA)
anti-Tyk2 monoklonaler Antikörper	Transduction Laboratories (San Jose, CA)
anti-pTyr ⁷⁰¹ Stat1 polyklonaler Antikörper (C-Terminus)	New England Biolabs (Ipswich, MA)
FITC - konjugierter anti-BrdU monoklonaler Antikörper mit DNase A	BD Bioscience (San Jose, CA)
Maus anti - α -Aktin monoklonaler Antikörper	Dako (Glostrup, Dänemark)

3.5.2 Sekundärantikörper

ANTIKÖRPER	HERSTELLER
HRPO-konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper	Santa Cruz (Santa Cruz, CA)
HRPO-konjugierter Ziege anti-Hase Antikörper	Santa Cruz (Santa Cruz, CA)
Alexa-488-konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper	Molecular Probes (Eugene, CA)

3.6 Allgemeine proteinchemische Arbeitsmethoden

3.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte im Mikroassay in Anlehnung an Bradford (72) in 96-Loch Mikrotiterplatten (Macrowell Plate, Nunc, Roskilde, Dänemark). Die Standardkurve wurde mit BSA-Konzentrationen von 4 – 40 µg/ml erstellt. Das Ansatzvolumen für die Standardkurve und die Proben betrug 50 µl. Zu jedem Ansatz wurden 200 µl im Verhältnis 1 : 5 mit aqua dest. verdünnte Bradfordreagenz (Protein Assay Dye Concentrate, Bio Rad Laboratories, München, Deutschland) zupipettiert. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 bindet an aromatische und basische Aminosäuren. Die Absorption der entstehenden Komplexe bei 595 nm als Maß der Proteinkonzentration lässt sich photometrisch detektieren. Die Absorptionsmessung erfolgte im Mikrotiterplatten-Photometer (Thermomax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) in Verbindung mit der Software Softmax PRO P 1.12. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und das arithmetische Mittel gebildet.

3.6.2 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche, eindimensionale Gelelektrophorese in Anlehnung an Laemmli (73).

Zum Aufschließen der Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine wurden die Proben für 5 min in Anwesenheit von DTT bei 95 °C inkubiert. Die verwendeten Minigele (9 x 5,5 cm) bestanden aus 3 %-igem Sammelgel (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 3 % (v/v) Bisacrylamid/Acrylamid (37,5:1); 0,1 % SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,05 % (v/v) TEMED) und 10 %-igem Trenngel (375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 10 % (v/v) Bisacrylamid/Acrylamid (37,5:1); 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) SDS; 0,05 % (v/v) TEMED). Die Proteinauftrennung erfolgte in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoreseeinheit bei einer Spannung von 120 V bis die Bromphenolblaufront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

3.6.3 Western-Blotting

3.6.3.1 Semi-dry Blotting

Zum spezifischen immunologischen Nachweis der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgte der Transfer vom Gel auf eine PVDF-Trägermembran (Roche, Mannheim, Deutschland) mittels Semi-dry Blotting. Die PVDF-Membran wurde durch Benetzen mit Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer eingeweicht. Das Blotten erfolgte in der Apparatur Trans-Blot SD bei einer Stromstärke von 110mA für 50min pro Blot-Sandwich.

3.6.3.2 Immunologischer Proteinnachweis auf PVDF-Membranen

Der Nachweis der Proteine auf den PVDF-Membranen erfolgte durch Detektion mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Vor der Inkubation mit den Primärantikörpern (in 3 % (w/v) BSA in PBS) bei RT über 2 h oder bei 4 °C über Nacht erfolgte die Absättigung von freien Bindungsstellen mittels 3 % (w/v) BSA in PBS. Nicht gebundener, überschüssiger

Primärantikörper wurde in drei jeweils zehnminütigen Waschschritten mit TBS-T_{0,1%} entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Membranen mit Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrritte mit TBS-T. Die Detektion der Protein-Antikörperkomplexe erfolgte durch die Peroxidase-katalysierte Oxidation von Luminol (Chemilumineszenz-Signalverstärker Renaissance, DuPont NEN, Boston, MA). Das bei der Luminoloxidation frei werdende Licht führte zur Schwärzung eines Films (Kodak X-Omat Blue XB-1, Eastman Kodak Company, Rochester, NY).

3.6.3.3 Reprobing von PVDF-Membranen

Dieses Verfahren dient zum erneuten immunologischen Proteinnachweis auf PVDF-Membranen, nachdem diese bereits wie unter 3.5.3.2 behandelt wurden. Dazu wurden zunächst mittels Stripping-Puffer die gebundenen primären und sekundären Antikörper unter denaturierenden Bedingungen vollständig von der Membran entfernt. Anschließend wurde die Membran drei Mal für 10 min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit 3% BSA in PBS erneut abgesättigt. Danach wurde wie unter 3.5.3.2 beschrieben vorgegangen.

3.7 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

3.7.1 Adenovirale Vektoren

Zur Verwendung kamen die adenoviralen Vektoren Ad5Jak1 Δ C und Ad5Tyk2 Δ C, die von Sergey Tkachuk von der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt wurden, sie dienten als Vektor für die jeweils kinasedomänedefizienten (Δ) Proteine Jak1 und Tyk2. Für Kontrollexperimente wurde der adenovirale Vektor LacZ verwendet.

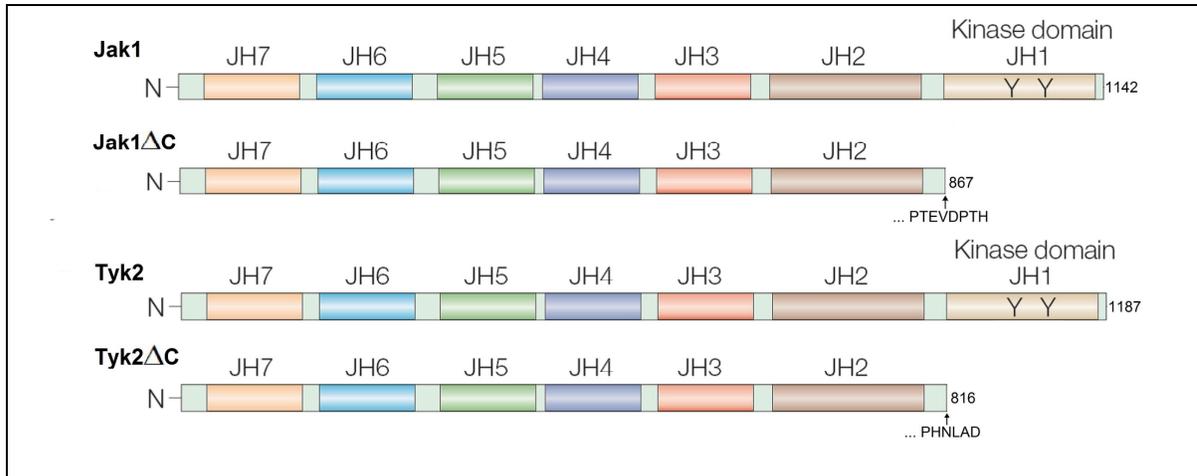


Abbildung 4: Im adenoviralen Vektor verwendete kinasedomänedefiziente (Δ C) Konstrukte von Jak1 und Tyk2 mit Darstellung der strukturhomologen Domänen JH1 bis JH7

3.7.2 Amplifizierung von Adenoviren

3.7.2.1 Infektion von HEK293-Zellen mit Adenoviren

Die Amplifizierung des adenoviralen Vektors erfolgte in humanen embryonale Nierenzellen (HEK293). Diese wurden in HEK-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellinkubator kultiviert. Dazu wurde zunächst eine 28,23 cm²-Zellkulturschale mit einer der beiden beschriebenen Adenovirusvarianten infiziert. Die HEK293-Zellen hatten dafür eine Konfluenz von 80-90 %. Vor der Infektion wurde das Medium vorsichtig komplett abgesaugt und daraufhin 10-20 μ l Viruskonzentrat und 2 ml Medium dazugegeben. Die Zellkulturschale wurde daraufhin für eine Stunde unter regelmäßigem Schwenken im Zellinkubator inkubiert. Daraufhin wurde mit weiteren 3 ml Medium aufgefüllt und weiter inkubiert. Nach ca. drei Tagen war eine deutliche Ausbildung des zytopathischen Effektes zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die „Virusernte“. Die HEK293-Zellen und der Zellüberstand wurden in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und zum Zellaufschluss drei Mal in flüssigem Stickstoff weggefroren und bei RT wieder aufgetaut. Ein spezielles Verfahren zum Ablösen der Zellen

war nicht notwendig, da die HEK293-Zellen kaum noch adhären waren. Mit 2,5 ml des so aufgeschlossenen Zellüberstandes wurde daraufhin eine 78,54 cm²-Zellkulturschale mit 80-90 % konfluenten HEK293-Zellen wie oben beschrieben infiziert und wieder bis zum deutlichen Einsetzen des zytopathischen Effektes mit 10 ml HEK-Medium inkubiert. Die resultierenden 10 ml Zellüberstand wurden nach dem Aufschließen benutzt, um zwei 176,71 cm²-Schalen zu infizieren. Dazu wurden je 5ml Virusüberstand auf die zu 80-90 % konfluenten HEK293-Zellen gegeben und nach oben beschriebenem Procedere mit 10 ml HEK-Medium pro Schale aufgefüllt. In einem letzten Vermehrungsschritt wurden nach Einsetzen des zytopathischen Effektes die 30 ml Virusüberstand aus beiden Schalen geerntet, wie beschrieben thermisch aufgeschlossen und 1:5 mit HEK-Medium verdünnt. Die resultierenden 150 ml verdünnter Virusüberstand wurden zu gleichen Teilen zur Infektion von 20 Zellkulturschalen (176,71 cm²) mit zu 80-90 % konfluenten HEK293-Zellen verwendet. Nach erfolgter Infektion wurde auf 15 ml HEK-Medium aufgefüllt.

Nach Einsetzen des zytopathischen Effektes wurden die gesammelten 300 ml Zellüberstand mit Zellen zunächst auf eine entsprechende Zahl 50 ml-Falcon-Röhrchen verteilt, zentrifugiert (200 g, 10 min, 4 °C) und die Zellpellets mit maximal 7 ml Restüberstand in einem 15 ml-Falcon-Röhrchen gesammelt, drei mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und zentrifugiert (1000 g, 30 min, 4°C). Der virusreiche Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C zur späteren Weiterverwendung tiefgefroren.

3.7.2.2 Aufreinigung von Adenoviren aus HEK293-Zellen

Zur Trennung der Adenoviren von zellulären Bestandteilen wurden die 7 ml Virusüberstand wie in Abbildung 5a gezeigt über einen Gradienten aus Cäsiumchlorid (CsCl) in aqua bidest geschichtet. Dazu wurden zuerst 2 ml CsCl ($\rho=1,25\text{g/cm}^3$) in ein SW40-Zentrifugenröhrchen gegeben und dann die CsCl-Lösungen mit den höheren Dichten daruntergeschichtet. Zum Schluss wurden die 7 ml Virusüberstand über den Gradienten geschichtet. Daraufhin wurde die so geschichtete Säule im SW40-Rotor (Sorvall) bei 30.000 rpm für 2 h bei 10 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation fand sich im unteren Drittel des Zentrifugenröhrchens eine virusreiche Bande (Abbildung 5b), die mit einer Insulinspritze abgenommen. Diese ca. 1

- 1,5 ml virusreiche Probe wurde wieder in ein SW40-Zentrifugenröhrchen gegeben und das Röhrchen mit ca. 10ml CsCl-Lösung ($\rho=1,35 \text{ g/cm}^3$) aufgefüllt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 30.000 rpm für 20 h bei 4 °C im SW40-Rotor. Die daraufhin sichtbare virusreiche Bande wurde wieder mit einer Insulinspritze abgenommen (ca. 2,5 ml).

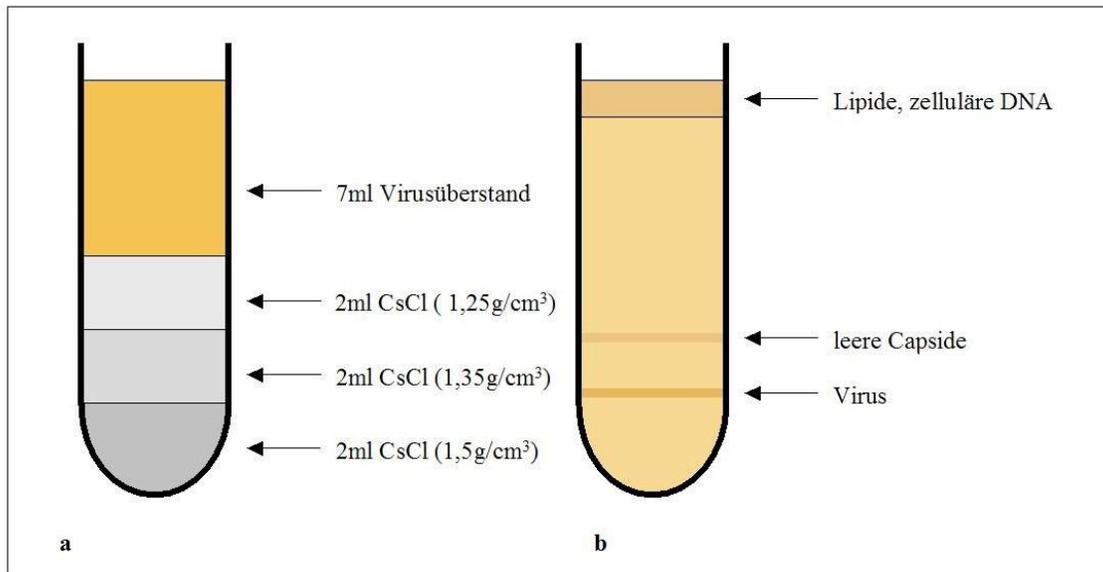


Abbildung 5: Schichtung des CsCl-Gradienten, a: vor Zentrifugation, b: CsCl-Gradient nach erstem Zentrifugationsschritt

In einem nächsten Schritt wurde die virusreiche Probe vom zytotoxischen CsCl getrennt. Dafür wurde eine NAP-25-Säule (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) mit 25 ml Adenoviruspuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Säule mit 2,5 ml Viruskonzentrat beschickt. Die ersten 1,5 ml Eluat wurden verworfen, der nächste ml Eluat wurde weiter verwendet. Daraufhin wurden weiter 3,5 ml Adenoviruspuffer auf die Säule gegeben und die folgenden 3 ml Eluat weiterverwendet. Die insgesamt 4,5 ml virusreiches Eluat wurden aliquotiert und für die Infektion mit VSMC bei -80 °C aufbewahrt.

3.7.3 Funktionstestung der adenoviralen Vektoren

Zur Bestimmung der optimalen Menge des virusreichen Eluats, welches für eine effektive Infektion von VSMC benötigt wird, wurden je zwei 28,3 cm² – Schalen mit zu 50% konfluenten VSMC mit 10 µl, 20 µl, 40 µl oder 50 µl virusreichen Eluats infiziert. Zur Infektion wurden die verschiedenen Mengen Viruseluat mit 1,5 ml VSMC-Mangelmedium pro Schale für eine Stunde unter regelmäßigem Schwenken der Schalen bei 37 °C inkubiert. Danach wurde mit VSMC-Vollmedium auf 5 ml aufgefüllt und für 48 h inkubiert. Daraufhin wurde je eine von zwei Schalen pro Wert mit VSMC-Mangelmedium und Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF; 10 µg/ml Aprotinin; 10 µg/ml Leupeptin) und Phosphataseinhibitor (300 µM NaVO₃) für 30 min mit 100 ng/ml IFN α von Biomol (Hamburg, Deutschland) stimuliert. Zur Kontrolle wurde bei der anderen Schale nur ein Mediumwechsel mit VSMC-Mangelmedium, Protease- und Phosphataseinhibitoren durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurde das Medium abgesaugt und die Schalen zwei Mal mit eiskaltem HEPES/NaCl gewaschen, für 5 min mit 50µl Lysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren je Schale auf Eis inkubiert. Durch anschließendes hochoberflächiges Zentrifugieren (15.000 x g, 8min, 4 °C) erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer von den löslichen Bestandteilen. Der Überstand mit den freigesetzten Proteinen wurde der Proteinbestimmung nach Bradford zugeführt. Anschließend erfolgte das Western Blotting.

3.8 Zellkultur

3.8.1 Humane glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Humane glatte Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien wurden von Lonza (Walkersville, MD) bezogen und wuchsen in VSMC-Vollmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellinkubator.

Die Zellen der primären Zellkultur wurde mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und im Verhältnis 1 : 6 passagiert. Für die Versuche wurden Zellen zwischen der 4. und 6. Passage verwendet, die eine Dichte von 60-80 % hatten. Für die Immunfärbungen wurden die VSMC auf Coverslips und für die Proliferationsassays in 28,3 cm²-Zellkulturschalen ausgesät.

3.8.2 Infektion von VSMC mit Adenoviren

Zur Infektion von VSMC wurden die nach Methode 3.6.2.3 ermittelten Mengen Viruseluat mit 1,5 ml VSMC-Mangelmedium (Lonza, Wakersville, MD) pro 28,3 cm²-Zellkulturschalen Schale für eine Stunde unter regelmäßigem Schwenken der Schalen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde mit VSMC-Vollmedium (Lonza, Wakersville, MD) auf 5 ml aufgefüllt und für 48 h inkubiert.

Im Anschluss wurden die so behandelten Zellen mit Monozyten kokultiviert und im Anschluss für Proliferationsassays oder Immunfluoreszenzstudien verwendet.

3.8.3 Monozytenisolation aus Vollblut

Monozyten wurden aus frischem peripher-venösem Blut gesunder, freiwilliger Spender gewonnen. Je 40 ml Blut wurden mit einer 50 ml-Spritze entnommen, in die 10 ml Natriumcitratlösung (3,1 % in aqua dest.) vorgelegt wurden. Das so gewonnene Blut wurde 1 : 2 mit sterilem PBS verdünnt, welches in 50 ml-Falcon-Röhrchen vorgelegt wurde.

Das verdünnte Blut wurde vorsichtig und langsam mit einer 10 ml-Pipette in 50 ml Falcon-Röhrchen über je 13 ml Biocoll (Dichte 1.077 g/ml, Biochrom KG L6115) geschichtet. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation für 30 min bei 400 g und RT, das Auslaufen der Zentrifuge erfolgte ungebremst. Nach dem Zentrifugieren wurde der größte Teil des Serumüberstandes abgenommen und 30 min bei 56 °C im Wasserbad hitzeinaktiviert und zur Herstellung des MACS-Puffers verwendet. Der nach der Zentrifugation über dem Biocoll sichtbare monozytenreiche Ring wurde vorsichtig abpipettiert und in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen gesammelt. Ab hier wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Das Falcon-Röhrchen wurde mit sterilem PBS aufgefüllt und zentrifugiert (300 g, 15 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 40 ml sterilem MACS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (200g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen wieder in 10 ml MACS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert (200g, 10 min, 4 °C) und das Pellet in 70 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 20 µl FcR Blocking Reagent und 20 µl Hapten-Antibody-Cocktail pro 10⁷ Zellen und Inkubation für 5 min bei 6-12 °C. Nach der Inkubation wurde das 10-20-fache

Labelingvolumen MACS-Puffer dazugegeben und nach Zentrifugation (200 g, 10 min, 4 °C) der Überstand abgenommen.

Nach Wiederholung des Waschschrilles wurde das Zellpellet in 60 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen resuspendiert und es erfolgte nacheinander die Zugabe von 20 µl FcR-Blocking Reagent und 20 µl Anti-Hapten-Microbeads pro 10⁷ Zellen. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 6-12 °C. Danach wurde das 10-fache Labelingvolumen MACS-Puffer zugegeben und erneut zentrifugiert (200 g, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und auf die mit 3 ml MACS-Puffer vorgespülte und mit PreSeparation-Filter bestückte LS-Column gegeben. Nach Entfernung des PreSeparation-Filter wurde mit 3x 1 ml MACS-Puffer nachgespült. Es erfolgte die Zellzahlbestimmung des Filtrates und daraufhin eine Bestimmung des Monozytenanteils durch Labeling mit Maus anti - CD14PE-Antikörper und anschließender FACS-Analyse. Für die weiteren Experimente wurden Proben verwendet, die einen Anteil von 90-98 % CD14 positiver Zellen hatten. Bevor die Monozyten mit VSMC in Kokultur gebracht wurden, wurden sie für 2-3 min mit 100 nM LPS stimuliert, erneut zentrifugiert und in entsprechender Menge VSMC-Mangelmedium resuspendiert.

3.8.4 VSMC-/Monozytenkokultur

Zur Verwendung kamen sowohl adenoviral infizierte VSMC als auch nicht infizierte VSMC. Zur Vereinheitlichung der Versuchsbedingungen wurden die VSMC 6 h vor der Kokultivierung mit Monozyten mit VSMC-Mangelmedium inkubiert. Unmittelbar vor Zugabe der Monozyten erfolgte wieder ein Medienwechsel mit VSMC-Vollmedium. Daraufhin wurden die mittels 10 nM LPS stimulierten Monozyten vorsichtig zu den VSMC pipettiert. Pro Quadratcentimeter Zellkulturschalenfläche wurden 1,9 x 10⁵ Monozyten dazugegeben. Die Inkubation mit Monozyten erfolgte für den Proliferationsassay für 42 h und für die Immunfärbungen für 24 - 36 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellinkubator.

3.9 Immunfluoreszenzfärbungen und Konfokalmikroskopie

VSMC wurden zunächst wie unter 3.7.1 kultiviert, dann wie unter 3.7.2 erläutert mit den entsprechenden adenoviralen Vektoren infiziert und 48 h nach Infektion für 24-36 h mit Monozyten kokultiviert.

Die so vorbereiteten VSMC wurden unmittelbar nach dem Absaugen des VSMC-Vollmediums mit 4 % Formaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert. In einem nächsten Schritt erfolgte die Permeabilisierung mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 3min bei RT. Freie, unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden durch Inkubation mit 1% (w/v) BSA in PBS bei 4°C für 1 h und anschließende Inkubation mit FcR-Blocking Reagenz (1min bei RT) abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 5 µg/ml monoklonalem anti-Stat1 Antikörper für 2 h in 0,2 % (w/v) BSA in PBS für 2h bei RT. Als Sekundäntikörper wurde im nächsten Schritt Alexa-488-konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT mit 10µg/ml Sekundäntikörper in 0,2 % (w/v) BSA in PBS. Danach wurden die Zellen in Aqua Poly-Mount (Polysciences, Warrington, PA) eingebettet. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden unter Verwendung einer an ein MRC1024 Konfokalmikroskop gekoppelten Nikon Diaphot Kamera bei einer Auflösung von 1024x1024 Pixel gewonnen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit Ölimmersions-Objektiv mit 63-facher Vergrößerung.

3.10 Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Proliferationsrate von VSMC wurde die Durchflusszytometrie genutzt. Zellen, die sich in der Synthese-Phase der Mitose befinden, bauen das synthetische Thymidinanalogon BrdU in ihre DNA ein (74). Mittels FACS-Analyse wurde der Anteil der VSMC bestimmt, die BrdU inkorporieren.

VSMC wurden wie unter 3.7.1 und 3.7.2 kultiviert und mit adenoviralen Vektoren infiziert und 48 h nach Infektion für 24 h mit Monozyten kokultiviert. Dann erfolgte ein Medienwechsel mit 100 nM BrdU (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) in VSMC-

Vollmedium und Inkubation für weitere 18 h. Als Kontrollen wurden parallel nicht infizierte VSMC sowohl in Mono- als auch in Kokultur sowie infizierte VSMC in Monokultur geführt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen zunächst 3 x mit PBS gewaschen, für 5 min mit 3 ml 5 mM EDTA in PBS pro Schale abgelöst und daraufhin die EDTA-Wirkung mit 3 ml 5 % (w/v) FKS in PBS neutralisiert und abzentrifugiert. Die anschließende Fixierung der Zellen erfolgte durch Resuspendierung des Zellpellets in 4 % (w/v) Formaldehyd in PBS an. Nach erneutem Zentrifugationsschritt wurden die Zellen 30 min in 50 % (v/v) Aceton in Methanol auf Eis permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 min bei 37 °C im Thermomixer mit FITC-konjugiertem monoklonalem anti-BrdU-Antikörper mit DNase A inkubiert. Danach wurden die Zellen eines jeden Ansatzes in FACS-Puffer überführt und es erfolgte die Auswertung per FACS-Analyse. Bei der FACS-Analyse wurden für jeden Ansatz 10.000 VSMC ausgezählt.

3.10.1 Statistische Auswertung

Die Proliferationsraten der VSMC jedes Einzelansatzes wurden in mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten ermittelt. Aus diesen Proliferationsraten wurde ein Mittelwert gebildet und die Standardabweichungen berechnet. Die Signifikanzprüfung erfolgte mit dem t-Test für zwei verbundene Stichproben. Das Testergebnis wurde als p-Wert angegeben. Ein $p < 0,05$ galt als signifikant.

4. Ergebnisse

Die Bearbeitung der Aufgabenstellung setzte die Herstellung von VSMC voraus, die entweder defizient für die Tyrosinkinase 2 oder für die Januskinase 1 waren. Hierfür wurde der Ansatz des adenoviralen Gentransfers verwendet. Ziel war die Überexprimierung der Kinasedomäne-defizienten Januskinasen Tyk2 Δ C und Jak1 Δ C. Die Funktionalität der Kinasedomäne-defizienten VSMC sowie die optimale zur Infektion benötigte Virusmenge wurde durch die in Abschnitt 4.1 beschriebenen Untersuchungen ermittelt. Im zweiten Schritt wurde ein Verfahren etabliert, mit dem in einer Kokultur aus Monozyten und VSMC der Anteil proliferierender VSMC bestimmt werden konnte. Das Verfahren wird unter 4.2 dargestellt. Im dritten Teil wurde mit Hilfe dieser Tools die Rolle von Jak1 und Tyk2 für die Aktivierung von Stat1 und das Proliferationsverhalten von mit Monozyten kokultivierten VSMC untersucht.

4.1 Effektivität der in HEK 293 amplifizierten Adenoviren

4.1.1 Inhibition der Stat1-Phosphorylierung an Tyr⁷⁰¹

Zunächst wurden die adenoviralen Vektoren Ad5Jak1 Δ C und Ad5Tyk2 Δ C wie unter 3.7.2 beschrieben in HEK-Zellen amplifiziert. Das hierbei gewonnene virusreiche Eluat wurde zur Infektion der VSMC verwendet. Zum Nachweis der Effektivität des adenoviralen Gentransfers wurden VSMC nach der unter 3.7.3 beschriebenen Art und Weise mit 0 – 50 μ l des virusreichen Eluates infiziert für 48 h inkubiert und anschließend für 30 min mit 100 ng/ml IFN α stimuliert. Aus den so behandelten VSMC wurden Proteinlysate hergestellt und dem Western Blotting zugeführt. Zur Verwendung kamen monoklonale Antikörper gegen Jak1 und Tyk2 sowie polyklonale Antikörper gegen pTyr⁷⁰¹Stat1.

Die Inkubationsdauer von 48 h wurde gewählt, da in Voruntersuchungen zur Kinetik der Infektion von VSMC mit Ad5Tyk2 mittels Northern Blot und Western Blot gezeigt wurde, dass zu diesem Zeitpunkt ein Maximum der Expression von Tyk2- mRNA und Tyk2-Protein besteht (68).

Abbildung 6 (obere Hälfte) zeigt eine effektive Expression der mutanten Kinasen Jak1 und Tyk2. Deutlich erkennbar ist, dass die Expression von der Konzentration der eingesetzten Virusmenge abhängig ist und mit steigender Virusmenge zunimmt. Während die Wildtypvarianten von Jak1 und Tyk2 bei 130 kDa bzw. 140 kDa zur Darstellung kommen, haben die Kinasedomäne-defizienten Kinasen ein kleineres Molekulargewicht und werden daher unterhalb der Wildtypvariante abgebildet.

Da Kinasedomäne-defiziente Formen von Jak1 und Tyk2 die IFN α -induzierte Stat1-Phosphorylierung dominant inhibieren (75), erfolgte die Stimulation mit IFN α zum Nachweis der funktionellen Aktivität der mutanten Januskinasen.

Die untere Hälfte der Abbildung 6 zeigt sowohl für Ad5Jak1 Δ C-VSMC als auch für Ad5Tyk2 Δ C-VSMC eine abnehmende Stat1-Phosphorylierung an Tyr⁷⁰¹ mit steigender Viruskonzentration. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Konzept der dominant negativen Überexpression der mutanten Kinasen erfolgreich ist und eine Phosphorylierung von Stat1 an Tyr⁷⁰¹ durch Jak1 und Tyk2 inhibiert werden kann.

Die so je Viruspräparation zur effektiven Infektion von VSMC ermittelten Virusmengen wurden bei den nachfolgenden funktionellen Studien eingesetzt.

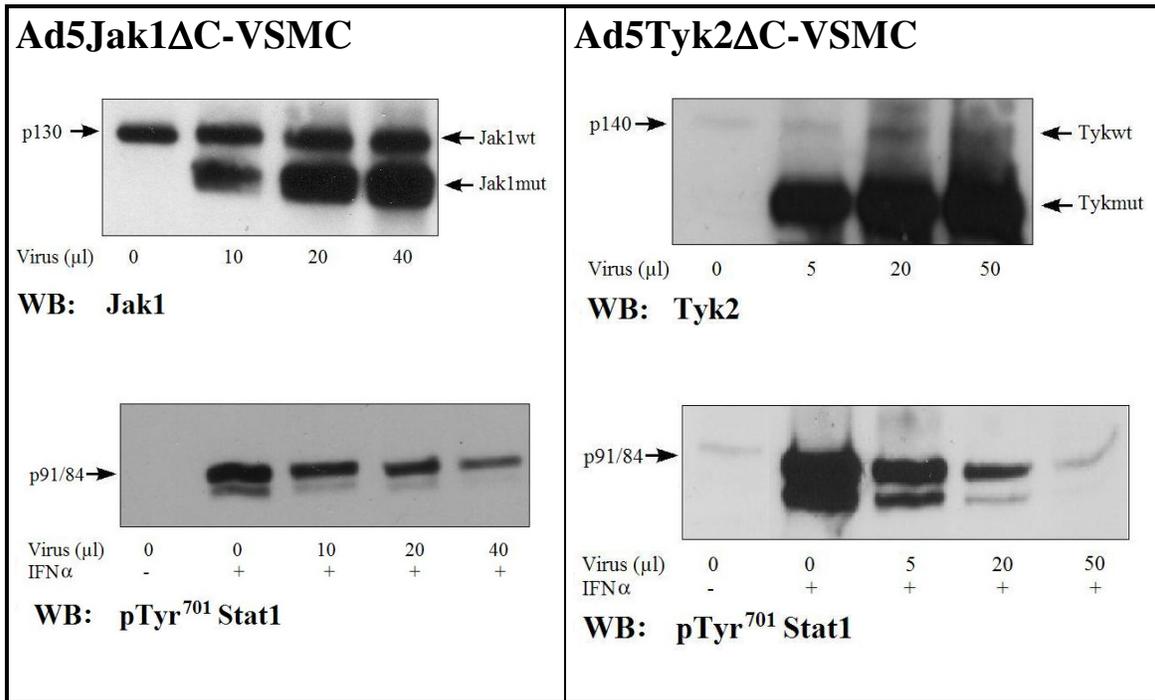


Abbildung 6: Westernblots von Proteinlysaten aus *Jak1ΔC-VSMC* und *Tyk2ΔC-VSMC* mit anti-*Jak1* bzw. anti-*Tyk2* (oben) und anti-pTyr⁷⁰¹ (unten) in Abhängigkeit zur Virusmenge

4.1.2 Inhibition der zytosolisch-nukleären Stat1-Translokation

Sowohl die IFN α -induzierte Phosphorylierung von Jak1 als auch von Tyk2 führen in Wildtyp-VSMC zu einer Stat1-Phosphorylierung am Tyrosinrest 701 und zur Dimerisierung von Stat1. Dies ist die Voraussetzung für die zytosolisch-nukleäre Translokation und anschließende DNA-Bindung von Stat1 (76;77). Zum Nachweis, dass in VSMC, die die mutanten Formen von Jak1 und Tyk2 exprimieren, die zytosolisch-nukleäre Translokation von Stat1 inhibiert wird, erfolgte die Stimulation von Ad5Jak1 Δ C-VSMC, Ad5Tyk2 Δ C-VSMC, sowie von mit dem Kontrollvektor Ad5LacZ infizierten VSMC mit 100 ng/ml IFN α . Anschließend wurde eine immunzytochemische Darstellung von Stat1 durchgeführt.

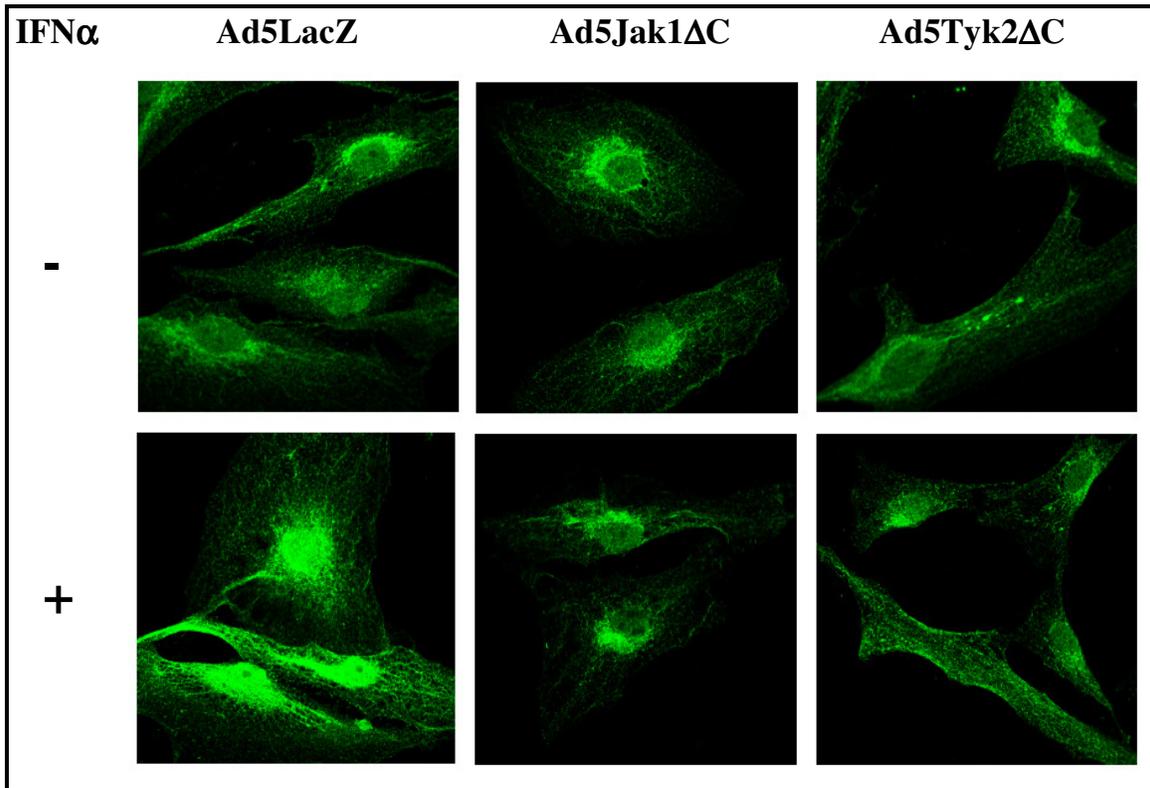


Abbildung 7: Konfokalmikroskopische Darstellung der mutanten VSMC mit und ohne IFN α -Stimulation nach Stat1-Färbung

Die Auswertung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 7) zeigt bei nicht mit IFN α stimulierten Ad5LacZ-VSMC, Ad5Jak1 Δ C-VSMC und Ad5Tyk2 Δ C-VSMC, dass sich Stat1 im Zytosol befindet. Im Nucleus hingegen findet sich nur eine sehr schwache Anfärbung. Bei mit dem Kontrollvektor Ad5LacZ infizierten VSMC ist nach IFN α -Stimulation Stat1 deutlich im Nucleus nachweisbar. Eine solche zytosolisch-nukleäre Translokation von Stat1 erfolgt bei den mit Ad5Jak1 Δ C und Ad5Tyk2 Δ C infizierten VSMC nicht. Diese Beobachtung belegt, dass die Expression der mutanten Januskinasen nicht nur die Phosphorylierung von Stat1 durch die Wildtypformen von Jak1 und Tyk2 verhindert, sondern auch eine nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors inhibiert.

4.2 Evaluation der Methode zur Bestimmung der Proliferationsrate von VSMC in direkter Kokultur mit Monozyten

Die Proliferationsraten der VSMC wurden mittels BrdU-Einbau und anschließender FACS-Analyse ermittelt. Die Methodik ist unter 3.8 bis 3.9 beschrieben. Im Rahmen der FACS-Analyse war bei den Kokulturen eine Differenzierung zwischen Monozyten und VSMC notwendig, um den VSMC-Anteil der BrdU-positiven und damit proliferierenden Zellen eindeutig bestimmen zu können. Dazu erfolgte bei den weiteren Experimenten (4.4) das Gating der VSMC in der FACS-Analyse nach morphologischen Kriterien (Verhalten von Forward Scatter und Sideward Scatter).

Um zu zeigen, dass ein alleiniges Gating nach morphologischen Kriterien zulässig ist um sicher zwischen Monozyten und VSMC differenzieren zu können, wurden die mit Monozyten kokultivierten VSMC mit monoklonalem anti- α -Aktin-Antikörper gelabelt. α -Aktin gilt als ein Markerprotein für glatte Muskelzellen, so auch für VSMC (78).

Abbildung 8 zeigt in der linken Spalte in Dotplots bzw. im Histogramm VSMC-Monokulturen, die rechte Spalte zeigt entsprechend VSMC-Monozyten-Kokulturen. Es erfolgte die Festlegung eines Gates R1 (a). Bei den Zellen, die sich nach α -Aktin-Färbung in diesem Gate R1 befanden, handelte es sich um VSMC (b). Das Gate R2 wurde um Zellen gelegt, von denen, ihrem Verhalten im Forward und Sideward Scatter nach, erwartet wurde, dass es sich um VSMC handelt (c). In der Histogrammdarstellung (d) zeigt sich, dass es bei den nach morphologischen Kriterien gegateten Zellen (R2) tatsächlich um die α -Aktin-positiven Zellen (R1) handelt, so dass bei den weiteren Experimenten auf eine Doppelfärbung von α -Aktin und BrdU verzichtet werden konnte und die Differenzierung der VSMC allein mittels ihrer Eigenschaften bezüglich Forward Scatter und Sideward Scatterd vorgenommen wurde.

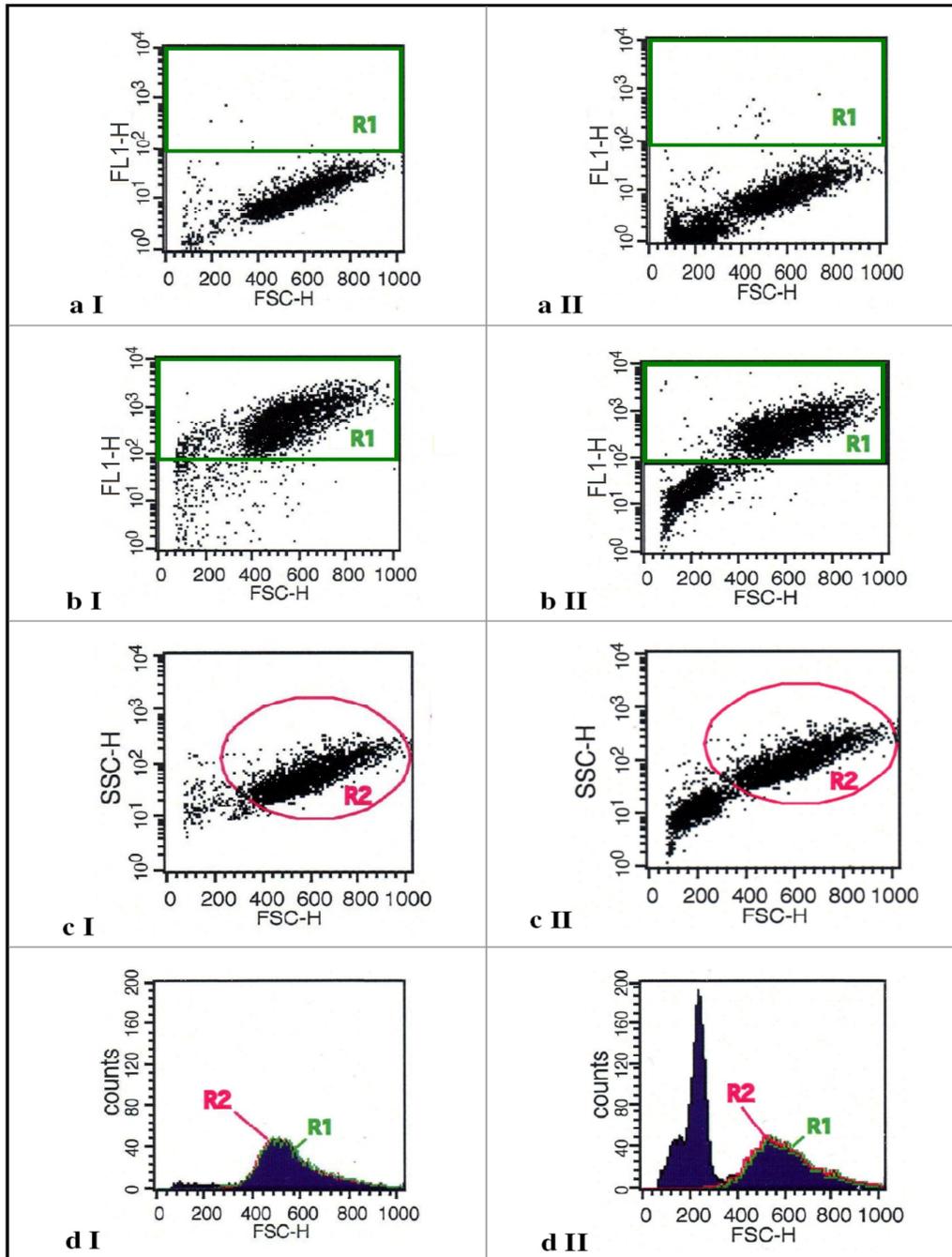


Abbildung 8: a I bis d I: VSMC-Monokultur; a II bis d II: VSMC-Monozyten-Kokultur; R1: Gating α -Aktin-positive Zellen; R2: Gating nach morphologischen Kriterien; a: native Zellen; b: Zellen nach α -Aktin-Labeling, c: native Zellen, d: überlappende Darstellung von R1 und R2; FL1-H: Fluoreszenzintensität, FSC-H: Forward Scatter, SSC-H: Sideward Scatter

4.3 Die Rolle von Jak1 und Tyk2 bei der Aktivierung von Stat1 in mit Monozyten kokultivierten VSMC

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass Monozyten, über die Sezernierung von uPA den membranständigen uPAR von VSMC aktivieren können. Die Aktivierung des uPAR mündet in einer Phosphorylierung, Dimerisierung und nukleären Translokation von Stat1 (30).

Unklar war bislang über welches Signaltransduktionsprotein der Schritt von der uPAR-Aktivierung zur Stat1-Phosphorylierung realisiert wird. Wir wählten als mögliche Kandidaten die Januskinase 1 und die Tyrosinkinase 2 aus, da von diesen beiden Kinasen bereits bekannt war, dass sie mit dem uPAR assoziieren (38).

Um zu prüfen, ob diese Kinasen eine Rolle in diesem Signaltransduktionsweg spielen, wurden nichtinfizierte VSMC, mit dem Kontrollvektor Ad5LacZ infizierte VSMC, mit Ad5Jak1 Δ C infizierte VSMC und mit Ad5Tyk2 Δ C infizierte VSMC mit aus frischem humanen Vollblut gewonnenen Monozyten für 24-36 h kokultiviert (siehe auch 3.7.3 – 3.7.4) oder in Monokultur gehalten. Daraufhin erfolgte die Aufarbeitung der Zellen für die Konfokalmikroskopie und Färbung mit monoklonalem Stat1-Antikörper (siehe auch 3.10).

Die Abbildung 9 zeigt repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen. Sowohl bei den nichtinfizierten VSMC, den mit Ad5LacZ infizierten VSMC, den mit Ad5Jak1 Δ C infizierten VSMC als auch bei den mit Ad5Tyk2 Δ C infizierten VSMC war in Monokultur keine Anreicherung von Stat1 im Nucleus erkennbar. In den Aufnahmen der Kokultur fand sich eine deutliche Stat1-Akkumulation in den Nuclei der nichtinfizierten VSMC, der Ad5LacZ infizierten VSMC und der mit Ad5Jak1 Δ C infizierten VSMC. Daneben imponieren die deutlich kleineren Nuclei der Monozyten. Lediglich in den Nuclei der mit Ad5Tyk2 Δ C infizierten VSMC findet sich in der Kokultur keine Stat1-Akkumulation im Nucleus.

Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass nur Tyk2 und nicht Jak1 oder eine andere Kinase die entscheidende Rolle bei der monozyteninduzierten zytosolisch-nukleären Translokation und damit Aktivierung von Stat1 hat.

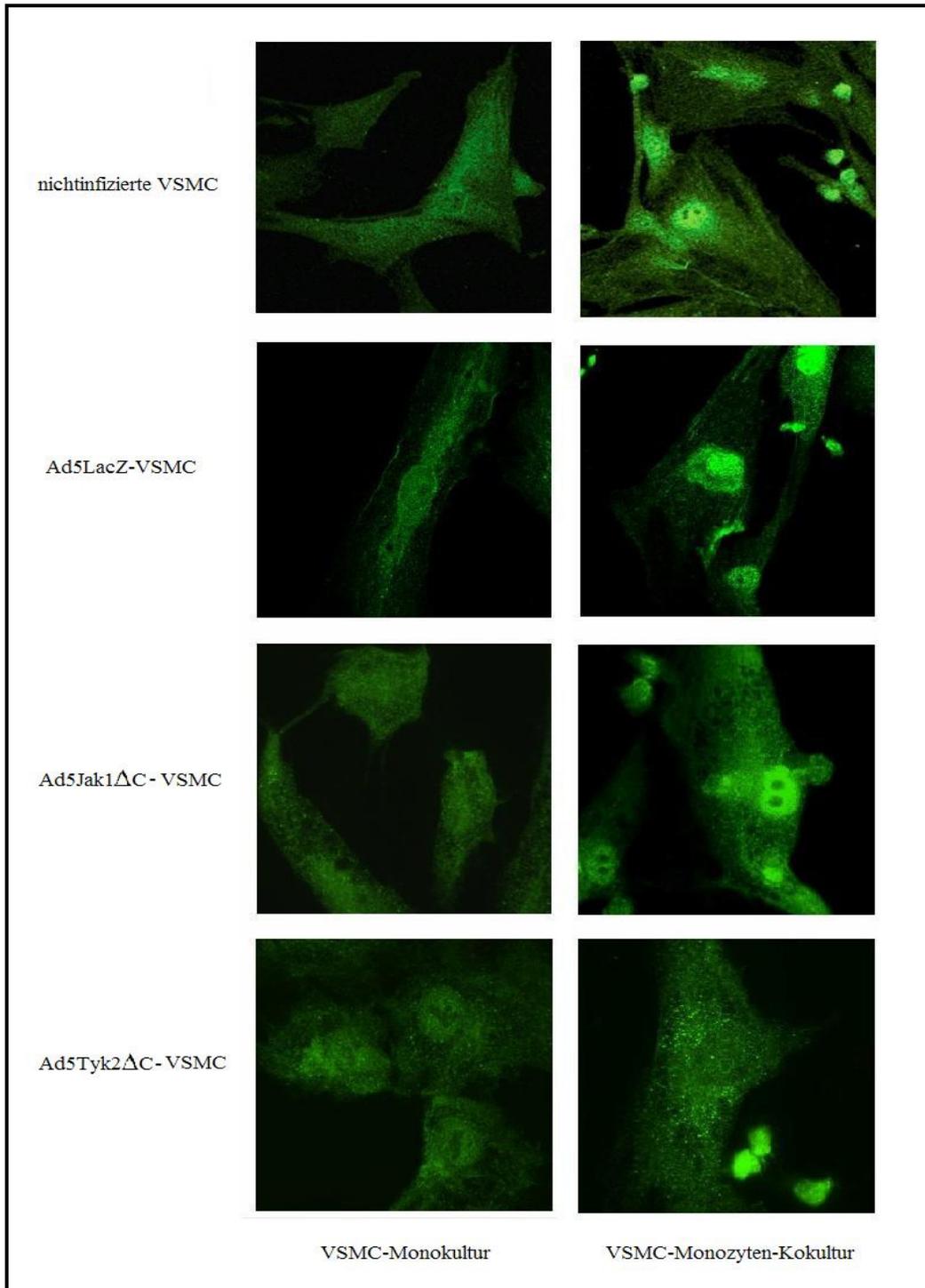


Abbildung 9: Konfokalmikroskopische Darstellung von VSMC in Monokultur und Monozyten-Kokultur nach Stat1-Färbung

4.4 Evaluation der Rolle der Januskinasen Jak1 und Tyk2 bei der monozyteninduzierten Proliferationshemmung von VSMC

Es war bereits bekannt, dass VSMC in der Gegenwart von Monozyten eine signifikant geringere Proliferationsrate aufweisen, als monokultivierte VSMC und dass dieser Effekt durch monozytär sezerniertes uPA und seine Interaktion mit VSMC-membranständigen uPAR vermittelt wird (30).

Nachdem nun gezeigt wurde, dass für die monozyteninduzierte Translokation von Stat1 in den Zellkern funktionsfähiges Tyk2, nicht jedoch Jak1 notwendig ist, stellte sich die Frage, ob Tyk2 auch auf funktioneller Ebene Bedeutung hat und für den antiproliferativen Effekt von Monozyten auf VSMC verantwortlich ist.

Dazu wurden in verschiedenen Versuchsansätzen VSMC entweder mit Ad5Jak1 Δ C, Ad5Tyk2 Δ C oder zur Kontrolle mit dem Leervektor Ad5LacZ infiziert. In einem weiteren Versuchsansatz wurden nicht infizierte VSMC entsprechend behandelt. Nach erfolgreicher Infektion wurden die verschiedenen VSMC-Ansätze wie unter 3.7.4 beschrieben für insgesamt 42 h mit Monozyten kokultiviert. Nach 24 h Kokulturzeit wurde dem Medium mit 100 nM BrdU zugefügt und anschließend für weitere 18 h kokultiviert. Schließlich erfolgte die Auswertung mittels FACS-Analyse wie unter 3.10 beschrieben. Die VSMC-Monokulturen wurden entsprechend den Kokulturansätzen behandelt.

Abbildung 10 zeigt von oben nach unten exemplarisch repräsentative FACS-Analysen von nichtinfizierten VSMC, Ad5Jak Δ 1-VSMC und Ad5Tyk2 Δ C-VSMC.

In Spalte 1 und 2 sind die Dotplots der Mono- und Kokulturen dargestellt. Das Verhalten der Zellen im Forward Scatter (FSC-H) ist gegen die Fluoreszenzintensität (FL-1) aufgetragen. Die Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der BrdU-Inkorporation. Im Gate 1 (R1) sind jeweils die BrdU-positiven Zellen erfasst. Diese Zellen wurden als Anteil der proliferierenden VSMC gewertet.

Ergebnisse

Die rechte Spalte zeigt die entsprechenden Histogramme. Die Fluoreszenzintensität (FL1-H), die mit der BrdU-Inkorporation korreliert, ist gegen die Zellzahl (counts) aufgetragen. Dabei sind die Kurven für die VSMC aus der Monokultur (M) und die VSMC aus der Kokultur (K) überlappend dargestellt. Die VSMC aus der Kokultur wurde zuvor nach den unter 4.2 beschriebenen Kriterien gated.

Bereits in der exemplarischen Darstellung wird deutlich, dass nichtinfizierte VSMC und Ad5Jak1 Δ C-VSMC in Monozytenkokultur einen geringeren Anteil proliferierender Zellen aufweisen als in Monokultur. Für Ad5Tyk2 Δ C-VSMC scheint sich sowohl in Monokultur als auch in Kokultur der Anteil der proliferierender Zellen in der gleichen Größenordnung zu bewegen, die Monozyten scheinen in diesem Ansatz also keine proliferationshemmende Wirkung zu haben.

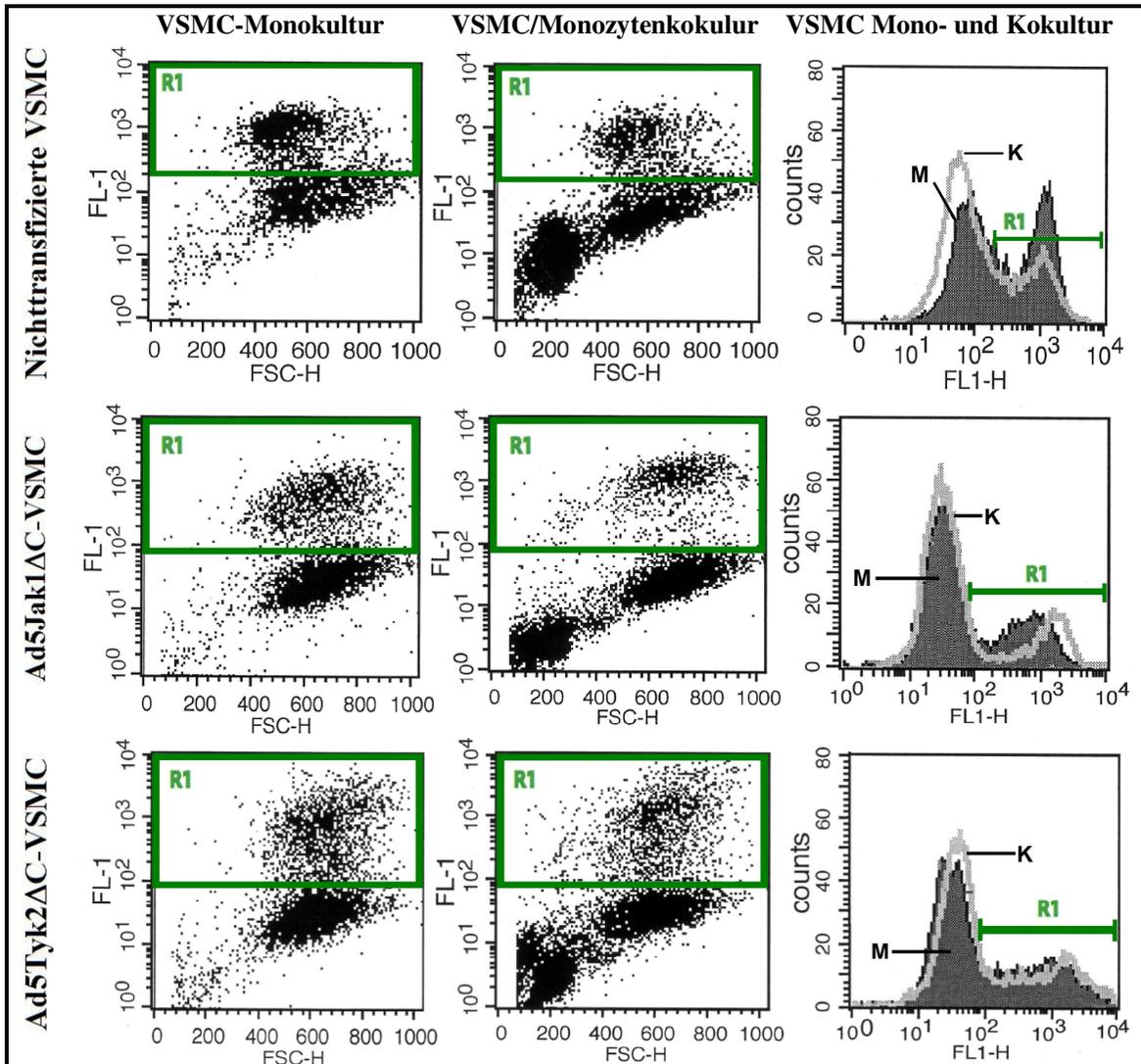


Abbildung 10: Dotplot von VSMC-Monokultur (Spalte 1) und VSMC-Monozytenkokultur (Spalte 2) mit Gating der BrdU-positiven Zellen (R1) sowie überlappende Darstellung von VSMC-Monokultur und nach morphologischen Kriterien gegateten VSMC der Kokultur

Ergebnisse

Abbildung 11 zeigt die statistische Auswertung der FACS-Analysen von je mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert und die entsprechende Standardabweichung. Dabei zeigte sich gegenüber der VSMC-Monokultur eine deutliche Proliferationshemmung der VSMC in Monozytenkokultur sowohl bei den nicht infizierten VSMC (MW 33,7%; SA 9,8%), den LacZ-VSMC (MW 29,7%; SA 4,2%), als auch den Jak1 Δ C-VSMC (MW 29,0%; SA 5,1%). Bei den Ad5Tyk2 Δ C-VSMC fand sich hingegen nahezu keine Proliferationshemmung (MW 2,9%; SA 3,0%)

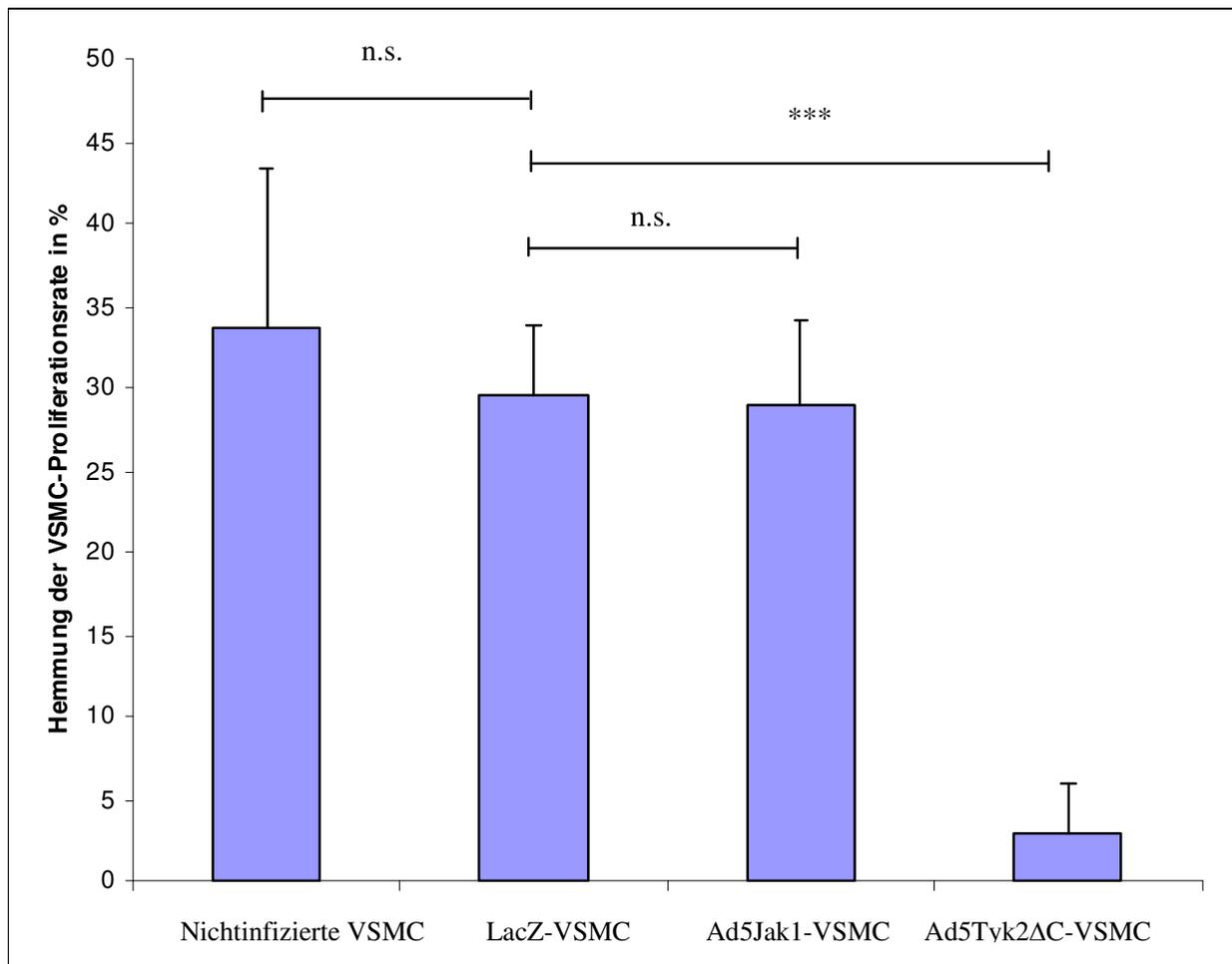


Abbildung 11: Monozyteninduzierte Proliferationshemmung von nichtinfizierten VSMC, LacZ-VSMC, Ad5Jak1 Δ C-VSMC und Ad5Tyk2 Δ C-VSMC in Prozent

4.4.1 Statistische Auswertung

Zur Sicherung der Signifikanz wurde ein t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Sowohl für die nicht infizierten VSMC, die LacZ-VSMC, als auch für die Jak1 Δ C-VSMC war bei einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ die Reduktion der Proliferationsrate signifikant. Für die Tyk2 Δ C-VSMC konnte hingegen keine signifikante Proliferationshemmung festgestellt werden. Damit darf geschlossen werden, dass eine funktionsfähige Tyk2, in VSMC notwendig ist, um die monozyteninduzierte Proliferationshemmung zu bewirken. Jak1 hingegen hat in diesem Zusammenhang weder einen proliferationshemmenden, noch einen proliferationsfördernden Einfluss.

5. Diskussion

Die Verhinderung von Atherosklerose und Restenose nach kathetergestützten Gefäßinterventionen ist eine der aktuellen Herausforderungen der Medizin. Die Erforschung der molekularen und zellulären Pathomechanismen der Neointimabildung bildet die Grundlage zur Entwicklung von Therapieoptionen.

Die Interaktion von Monozyten, die die Intima nach Endothelläsion infiltrieren, mit VSMC stellt einen der Schlüsselmechanismen da. Neben einer Vielzahl anderer Mediatoren, die Monozyten während dieses Geschehens exprimieren, spielt die Erkenntnis über die Wirkung von monozytär sezerniertem uPA auf VSMC eine wachsende Rolle.

Es wurde bereits gezeigt, dass VSMC in einem Kokulturmodell mit Monozyten eine höhere Migrationsrate und eine geringere Proliferationsrate aufweisen (30;31). Diese funktionellen Veränderungen der VSMC spiegeln die pathophysiologischen Vorgänge nach Gefäßwandverletzung in der Frühphase der Neointima wider (15).

Verantwortlich für diese Prozesse ist monozytär sezerniertes uPA, das über seine Bindung am VSMC-uPAR zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege führt. Es sind dabei bisher im Einzelnen zwei verschiedene Signalwege beschrieben worden. Zum einen wird über Tyk2 der Signalweg PIK-3-K/RhoA/Rac1-Kinase aktiviert, was zu einer Steigerung der VSMC-Migration führt. Zum anderen wird Stat1 aktiviert und zieht eine VSMC-Proliferationshemmung nach sich (30;31;68).

Die vorliegende Arbeit zeigt auf, dass es sich bei Tyk2 um die Kinase handelt, die in VSMC für die durch monozytär sezerniertes uPA induzierte Aktivierung von Stat1 und die daraus resultierende Proliferationshemmung verantwortlich ist.

Diskussion

In Vorarbeiten wurde demonstriert, dass in VSMC die Januskinasen Jak1 und Tyk2 uPA-abhängig mit dem uPA-Rezeptor assoziieren (38). Diese Beobachtung stützte die Arbeitshypothese, dass diese Kinasen oder nur eine von beiden für die Stat1 Aktivierung verantwortlich sind und nachfolgend zur Proliferationshemmung führen.

Aus diesem Grund wurde ein Versuchsansatz erarbeitet, der davon ausgeht, mittels adenoviralem Gentransfer die kinsedomänedefizienten Proteine Jak1 Δ C oder Tyk2 Δ C in VSMC stabil zu überexprimieren, um die Expression und Funktion der Wildtypkinasen zu inhibieren.

Es konnte im Westernblot gezeigt werden, dass dieser Ansatz in der Lage ist, die IFN α -induzierte Phosphorylierung und die nukleäre Translokation von Stat1 sowohl in Jak1 Δ C-VSMC als auch in Tyk2 Δ C-VSMC zu supprimieren.

Damit konnten auch die Beobachtungen von Müller et al. bestätigt werden, die demonstriert haben, dass eine IFN α -induzierte Tyk2-Phosphorylierung an die Anwesenheit von funktionsfähigem Jak1 gekoppelt ist und dass dies reziprok genauso gilt. Da durch IFN α nur diese beiden Januskinasen aktiviert werden (79;80), kann keine Stat1-Phosphoaktivierung stattfinden, wenn nur eine der beiden Kinasen inhibiert ist.

Darüber hinaus erfolgte der Nachweis durch Immunfluoreszenzfärbungen, dass sowohl in Tyk2 Δ C-VSMC als auch in Jak1 Δ C-VSMC nach IFN α -Stimulation keine Stat1-Translokation stattfand und somit auch diese Stat-Funktion in unserem Modell erfolgreich unterbunden wurde.

In einem weiteren Schritt wurden Monozyten entweder mit Jak1 Δ C-VSMC oder mit Tyk2 Δ C-VSMC kokultiviert. Wie durch Immunfluoreszenzmikroskopie dokumentiert, war nach 24-36h Kokulturzeit zwar in Jak1 Δ C-VSMC eine deutliche Anreicherung von Stat1 im Zellkern nachzuweisen, in Tyk2 Δ C-VSMC hingegen war dies nicht der Fall. Aus dieser Beobachtung kann geschlussfolgert werden, dass Tyk2 allein, nicht jedoch aber Jak1 für die monozyteninduzierte, uPA-vermittelte Stat1-Aktivierung verantwortlich ist.

Nachfolgend konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass es sich bei der Kinase, die die Stat1-Phosphoaktivierung durch monozytär exprimiertes uPA vermittelt und auf diesem Wege zur Proliferationshemmung führt, um Tyk2 handelt. Dies ist insofern überraschend, als dass

Tyk2, wie weiter oben beschrieben, bereits bei der zur Migrationssteigerung führenden Aktivierung des PIK-3-K/RhoA/Rac1-Kinase-Weges eine Schlüsselrolle zuteil wird. Da aber nicht nur Tyk2 sondern auch Jak1 uPA-abhängig mit dem uPAR assoziiert, wäre die Vermutung naheliegend gewesen, dass Jak1 eine Rolle bei der Proliferationshemmung von VSMC hat. Da das jedoch nicht der Fall war, bleibt die Frage, welche Funktion Jak1 in diesem Zusammenhang zukommt, weiter ungeklärt. Nicht auszuschließen ist eine modulierende Funktion des durch Tyk2 vermittelten Effektes. Eine solche Rolle würde die im Vergleich zu den LacZ-VSMC leicht reduzierten Proliferationsraten der Jak1 Δ C-VSMC erklären.

Neben dem Nachweis, dass Tyk2 für die Aktivierung von Stat1 und den dadurch induzierten proliferationshemmenden Effekt notwendig ist, wurde in dieser Arbeit auch eine Quantifizierung der Proliferationshemmung vorgenommen. Um die Proliferationsrate mittels BrdU-Einbau von VSMC in direkter Kokultur mit Monozyten bestimmen zu können, wurde zuvor durch Doppelfärbung und FACS-Analyse eine Methode etabliert, die isoliert den BrdU-Einbau in den VSMC sicher bestimmen konnte. Es wurde gezeigt, dass die Unterscheidung von VSMC und Monozyten durch morphologische Kriterien (Forward Scatter und Sideward Scatter) zulässig ist.

Eine Quantifizierung der Proliferationsraten ist insofern von Interesse, als dass sie dabei helfen kann abzuschätzen, welche Bedeutung sie im Vergleich zu anderen proliferationshemmenden Effekten hat. So wurde von Proudfoot et al. beschrieben, dass mit VSMC kokultivierte Monozyten antiproliferativ auf VSMC wirken und dass der antiproliferative Effekt durch Mediatoren mit einem Molekulargewicht kleiner 12 kDA, am ehesten durch die Cyclooxygenaseprodukte PGE₁ und PGE₂ vermittelt wird (81).

Ein anderes System, das mit dem uPA/uPAR-System an VSMC konkurriert, ist das Angiotensin II/AT₁-Rezeptor-System. Angiotensin führt im Rattenmodell zur VSMC-Proliferationssteigerung und trägt zur Neointimaentsehung bei (82-84). Seki et al. konnten zeigen, dass es in ballondilatierten Rattenarterien durch Angiotensinwirkung am VSMC-AT₁-Rezeptor, eine Jak2- und Stat2-Phosphorylierung mit einem Maximum am Tag 7 induziert

wird und diese im Zusammenhang mit den proliferativen Mechanismen der Neointimabildung steht (82). Während das in dieser Arbeit beschriebene Monozyten-VSMC-Kokulturmodell am ehesten die Vorgänge in der frühen Phase der Neointimabildung widerspiegelt, scheinen die Beobachtungen von Seki et al. ein Abbild der darauf folgenden Prozesse der Neointimaentstehung zu sein. Interessant ist dabei, dass auch in dieser Phase dem Jak-Stat-Signalweg eine wichtige Bedeutung zukommt. Einschränkend muss gesagt werden, dass nicht hinreichend geklärt ist, ob die proliferativen Mechanismen im Rattenmodell und in murinen VSMC, dieselbe Bedeutung haben wie in humanen Gefäßläsionen (7;15).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass vermittelt durch Monozyten die Aktivierung von Stat1 durch Tyk2 erfolgt. Damit wird jedoch nicht geklärt, über welchen Mechanismus nach uPAR-Stimulation, die Phosphoaktivierung von Tyk2 erfolgt. Da der uPAR selbst keine transmembranäre Kinasedomäne besitzt, bleibt zu vermuten, dass für diesen Schritt (in Abbildung 12 mit einem roten Fragezeichen versehen) die Interaktion mit einem bisher nicht identifizierten transmembranären Adaptermolekül mit Kinaseaktivität notwendig ist, welches die Phosphorylierung von Tyk2 realisiert. Ein bereits bekannter Mechanismus, über den der uPAR intrazelluläre Signalwege anstößt, ist die Interaktion über den PDGFR β (37).

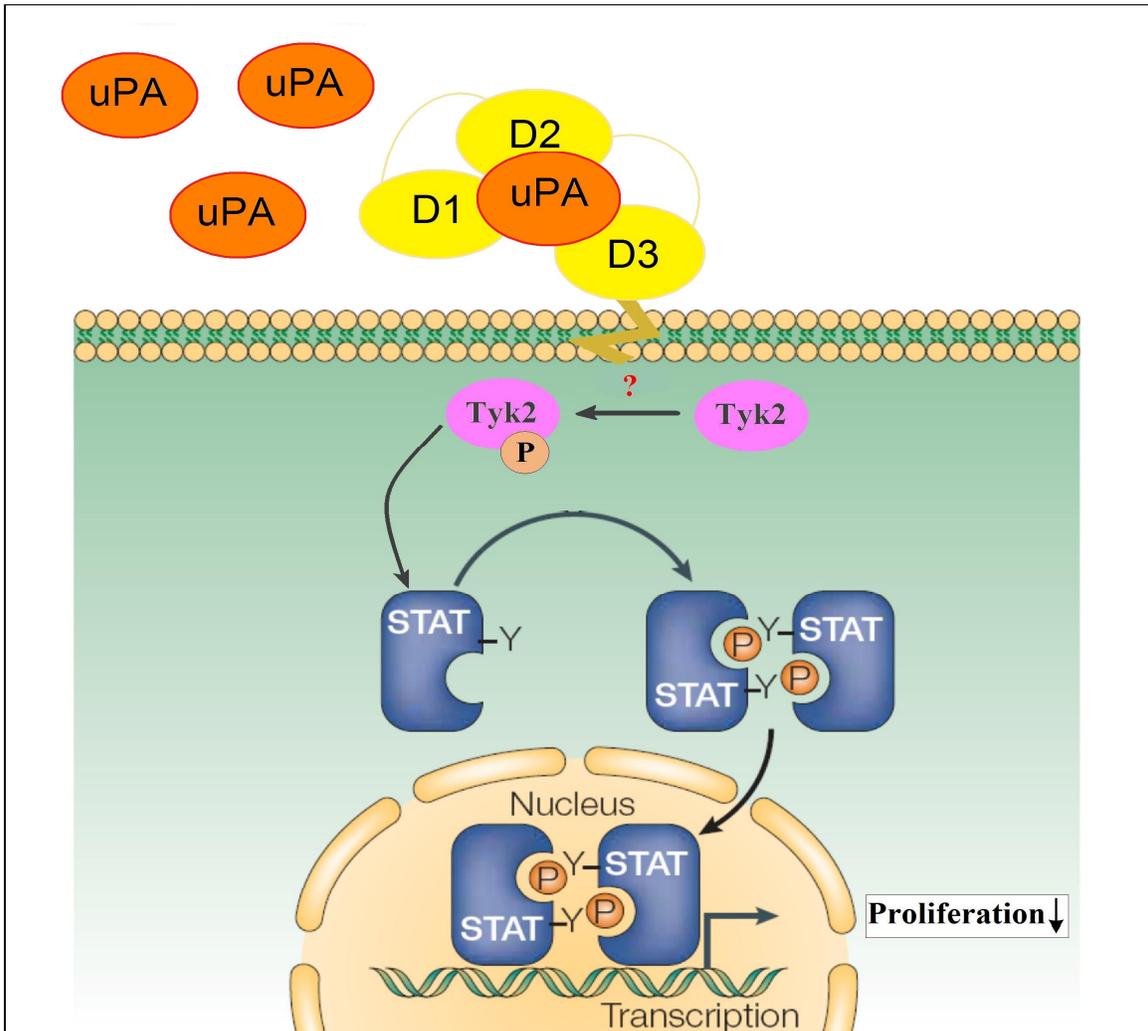


Abbildung 12: Tyk2 phosphoryliert Stat1 über die Interaktion von uPA/uPAR-Interaktion, Stat1 transloziert in den Zellkern und wirkt über Modulation der Transkription antiproliferativ (Abbildung modifiziert nach Shui K, Nature Immunol. Rev 2003; 3(11): 900-911)

Die meisten Studien an VSMC, die über die Effekte von uPA berichten, wurden mit rekombinant hergestelltem oder aufgereinigtem uPA durchgeführt (68;71;85;86). Indem die vorliegende Arbeit ein in vitro Kokulturmodell benutzt, um funktionelle Veränderungen der

VSMC zu dokumentieren, bietet sie gegenüber diesen Arbeiten offensichtliche Vorteile. Durch die direkte Interaktion von Monozyten und VSMC ist die beobachtete monozytäre VSMC-Proliferationshemmung der Nettoeffekt der sich wechselseitig beeinflussenden Parameter. Es konnte bereits gezeigt werden, dass im Monozyten-VSMC-Kokulturmodell, sowohl die monozytäre uPA-Expression, als auch die Expression von uPAR durch VSMC gesteigert ist und dass diese Expressionsmuster spezifischen Kinetiken folgen (31). Derartige Wechselwirkungen können in *in vitro* Monokulturmodellen nicht erfasst werden. Darüberhinaus besteht bei der herkömmlichen Stimulation von VSMC mit uPA die Gefahr, dass die angewendeten Molekülkonzentrationen nicht physiologisch sind und dass eine vorzeitige proteolytische Inaktivierung des uPA erfolgt. Dies könnte zur Folge haben, dass Beobachtungen über mehrere Tage, wie sie in dieser Arbeit getätigt wurden, zu verminderten Effekten führen könnten. Wie wichtig ein kontinuierliches vom Rezeptor ausgehendes Signal ist, konnte zumindest für die IFN γ -abhängige Stat1-Aktivierung gezeigt werden. Haspel et al. konnten demonstrieren, dass schon 60 min nach IFN-Rezeptor-Blockade, kein Phospho-Stat1 mehr in der Zelle nachweisbar war (87).

Natürlich ist auch das hier verwendete Kokulturmodell in seiner Aussagekraft limitiert, da nur die Wechselwirkungen zwischen zwei Zellpopulationen untersucht werden, während *in vivo* die Zahl der Interaktionspartner ungleich höher ist und dazu noch physikochemische Einflussfaktoren wie Scherkräfte, Druckschwankungen und Hypoxie wirken, von denen nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie in ihrer Summe zum Überwiegen anderer VSMC-Funktionen führen.

Indem diese Arbeit zeigt, dass Tyk2 in VSMC nicht nur wie bereits vorbekannt für die Migrationsinduktion von entscheidender Bedeutung ist, sondern auch die Proliferationshemmung vermittelt, wird die These erhärtet, dass Tyk2 die entscheidende Kinase in der Regulation der uPA-vermittelten Funktionsänderungen von VSMC ist.

An anderer Stelle konnte gezeigt werden, dass Tyk2 bei der Regulation der Lokalisierung und Stabilisierung des Erythropoetinrezeptors an der Zelloberfläche eine Rolle spielt. An Mesangiumzellen wurde demonstriert, dass Tyk2 an der Vermittlung der urokinaseinduzierten

Expression immunkompetenter Rezeptoren beteiligt ist (88). Ob Tyk2 in VSMC ähnliche Funktionen zukommen ist bislang nicht geklärt. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass Tyk2, im Rahmen der Response-to-injury-Hypothese, an der Vermittlung von inflammatorischen Reaktionen nach Gefäßwandverletzung beteiligt ist und modulierend auf das angeborene Immunsystem wirkt, zumal bekannt ist, dass VSMC im Rahmen der Neointimabildung eine Vielzahl von Zytokinen produzieren (89).

Für die Annahme, dass Tyk2 in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnte, gibt es inzwischen mehrere Hinweise. So konnte an Tyk2-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass Tyk2 eine bedeutende Funktion bei der Regulierung der Th1-vermittelten Immunität besitzt (90). Darüber hinaus berichtet eine Studie, dass in dendritischen Zellen die Expression von Tyk2 für die Produktion mehrerer Zytokine und die Induktion von Th1-Zell-Differenzierung notwendig ist (91). Letztlich kann die tatsächliche Bedeutung dieser Aspekte jedoch nur durch weiterführende in vivo Studien geklärt werden, die sich mit der Frage beschäftigen, welche Effekte auf die Neointimabildung aus der lokalen Hemmung von Tyk2, zum Beispiel durch spezifische Januskinaseinhibitoren, resultieren würden.

Es ist davon auszugehen, dass der Einsatz von Januskinaseinhibitoren in der Klinik für die Therapie unterschiedlicher Krankheitsbilder an Bedeutung gewinnen wird. Der Nutzen eines Jak3-Inhibitors wird aktuell an Hand von Modellen für Diabetes Typ I, Inselzelltransplantation, Allograft-Vaskulopathie, Thrombose und Knochenmarktransplantation geprüft. Darüber hinaus befinden sich mehrere Jak2- und Jak3-Inhibitoren in der Phase der klinischen Erprobung (92;93). Erste Ergebnisse für den Nutzen bei Psoriasis, Myeloproliferativen Syndromen und Organtransplantation sind vielversprechend (94-96).

6. Zusammenfassung

Die Atherosklerose ist ein klinisches Phänomen, deren Folgen maßgeblich zur Mortalität in Industrienationen beitragen. Die therapeutische Anwendung von perkutanen Interventionen wird durch das Auftreten von Restenosen limitiert.

Obwohl weitgehend anerkannt ist, dass es sich bei der Atherosklerose um ein systemisches, inflammatorisches Geschehen handelt, bei dem Komponenten des Immunsystems, wie Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten mit Bestandteilen der Arterienwand, wie Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen interagieren, ist die zu Grunde liegende Pathogenese auf zellulärer und molekularer Ebene erst unzureichend erforscht.

Ein Verständnis eben dieser Pathomechanismen bildet jedoch die Grundlage für die Entwicklung von Therapieoptionen.

Die vorliegende Arbeit identifiziert ein zelluläres Signaltransduktionsprotein, das für die Hemmung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) durch monozytär exprimierten Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) verantwortlich ist. Die Untersuchungen wurden in einem Modell durchgeführt, in dem glatte Gefäßmuskelzellen direkt mit Monozyten in Kokultur gebracht werden. Dieses Modell reflektiert die Vorgänge der frühen Phase der Neointimaenstehung, bei der Monozyten über Endothelläsionen mit glatten Gefäßmuskelzellen in Kontakt treten. In der Folge kommt es in glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Hemmung der Proliferation zu Gunsten gesteigerter Migrationsraten.

Weiterhin kam das Verfahren des adenoviralen Gentransfers zur Anwendung, das genutzt wurde, um die funktionelle Aktivität einzelner Signaltransduktionsproteine gezielt zu supprimieren.

Die Arbeit weist unter Verwendung von immunhistochemischen Verfahren erstmals nach, dass ein Vertreter aus der Gruppe der Januskinasen, die Tyrosinkinase 2 (Tyk2) für die durch

monozytär exprimiertes uPA vermittelte Aktivierung und anschließende nukleäre Translokation von Stat1 verantwortlich ist.

Darüber hinaus wurde demonstriert, dass Tyk2 auch die Kinase ist, die in VSMC für die Vermittlung der monozyteninduzierten Proliferationshemmung zuständig ist. Es wird belegt, dass die Januskinase 1 (Jak1), eine weitere Kinase, von der bekannt ist, dass sie in glatten Gefäßmuskelzellen mit dem uPA-Rezeptor assoziiert, keinen Einfluss auf die Stat1-Aktivierung hat und dass ihre Anwesenheit zur Vermittlung des antiproliferativen Effektes nicht notwendig ist. Die Quantifizierung des proliferationshemmenden Effektes erfolgte durch Messung des BrdU-Einbaus mittels FACS-Analyse.

In der Zusammenschau mit früheren Untersuchungen zeigt diese Arbeit auf, dass es sich bei Tyk2 um das Signaltransduktionsprotein handelt, welches im Zentrum der monozyteninduzierten funktionellen Änderungen von glatten Gefäßmuskelzellen steht.

Die Arbeit unterstreicht die Bedeutung des Jak-Stat-Signalweges für den Prozess der Neointimaentstehung und gibt Anlass dazu, die funktionelle Bedeutung dieses Signalweges auch in vivo zu untersuchen.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362(6423):801-809.
- (2) Corti R, Hutter R, Badimon JJ, Fuster V. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 2004; 17(1):35-44.
- (3) Drexler H, Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(1):51-60.
- (4) Enseleit F, Ruschitzka F, Noll G. Atherosklerose. In: Gerok W, Huber C, editors. *Die Innere Medizin*. Stuttgart, New York: Schattauer, 2007: 318-328.
- (5) Dosquet C, Weill D, Wautier JL. Molecular mechanism of blood monocyte adhesion to vascular endothelial cells. *Nouv Rev Fr Hematol* 1992; 34 Suppl:S55-S59.
- (6) Yoshida Y, Mitsumata M, Ling G, Jiang J, Shu Q. Migration of medial smooth muscle cells to the intima after balloon injury. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 811:459-470.
- (7) Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res* 2007; 100(5):607-621.
- (8) Bell L, Madri JA. Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. *Am J Pathol* 1990; 137(1):7-12.
- (9) Grotendorst GR, Seppa HE, Kleinman HK, Martin GR. Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(6):3669-3672.
- (10) Stepanova V, Bobik A, Bibilashvily R et al. Urokinase plasminogen activator induces smooth muscle cell migration: key role of growth factor-like domain. *FEBS Lett* 1997; 414(2):471-474.
- (11) Groves PH, Banning AP, Penny WJ, Lewis MJ, Cheadle HA, Newby AC. Kinetics of smooth muscle cell proliferation and intimal thickening in a pig carotid model of balloon injury. *Atherosclerosis* 1995; 117(1):83-96.

- (12) De Meyer GR, Bult H. Mechanisms of neointima formation--lessons from experimental models. *Vasc Med* 1997; 2(3):179-189.
- (13) Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1992; 89(2):507-511.
- (14) Nabel EG, Yang ZY, Plautz G et al. Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993; 362(6423):844-846.
- (15) Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM. Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(12):4600-4604.
- (16) PLOUG J, KJELDGAARD NO. Urokinase an activator of plasminogen from human urine. I. Isolation and properties. *Biochim Biophys Acta* 1957; 24(2):278-282.
- (17) Blasi F. Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *Bioessays* 1993; 15(2):105-111.
- (18) Magdolen V, Rettenberger P, Koppitz M et al. Systematic mutational analysis of the receptor-binding region of the human urokinase-type plasminogen activator. *Eur J Biochem* 1996; 237(3):743-751.
- (19) Quax PH, Grimbergen JM, Lansink M et al. Binding of human urokinase-type plasminogen activator to its receptor: residues involved in species specificity and binding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(5):693-701.
- (20) Appella E, Robinson EA, Ullrich SJ et al. The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. *J Biol Chem* 1987; 262(10):4437-4440.
- (21) Preissner KT, Kanse SM, May AE. Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12(5):621-628.
- (22) Behrendt N., Stephens R.W. The urokinase receptor. *Fibrinolysis & Proteolysis* 1998;(12(4)):191-204.
- (23) Clowes AW, Clowes MM, Au YP, Reidy MA, Belin D. Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue-type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery. *Circ Res* 1990; 67(1):61-67.
- (24) Eaton DL, Scott RW, Baker JB. Purification of human fibroblast urokinase proenzyme and analysis of its regulation by proteases and protease nexin. *J Biol Chem* 1984; 259(10):6241-6247.

- (25) Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(12):932-943.
- (26) Blasi F, Behrendt N, Cubellis MV et al. The urokinase receptor and regulation of cell surface plasminogen activation. *Cell Differ Dev* 1990; 32(3):247-253.
- (27) Estreicher A, Muhlhauser J, Carpentier JL, Orci L, Vassalli JD. The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes. *J Cell Biol* 1990; 111(2):783-792.
- (28) Okada SS, Tomaszewski JE, Barnathan ES. Migrating vascular smooth muscle cells polarize cell surface urokinase receptors after injury in vitro. *Exp Cell Res* 1995; 217(1):180-187.
- (29) Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 1985; 44:139-266.
- (30) Kunigal S, Kusch A, Tkachuk N et al. Monocyte-expressed urokinase inhibits vascular smooth muscle cell growth by activating Stat1. *Blood* 2003; 102(13):4377-4383.
- (31) Kusch A, Tkachuk S, Lutter S et al. Monocyte-expressed urokinase regulates human vascular smooth muscle cell migration in a coculture model. *Biol Chem* 2002; 383(1):217-221.
- (32) Ossowski L, Guirre-Ghiso JA. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12(5):613-620.
- (33) Blasi F. The urokinase receptor. A cell surface, regulated chemokine. *APMIS* 1999; 107(1):96-101.
- (34) Carmeliet P, Moons L, Herbert JM et al. Urokinase but Not Tissue Plasminogen Activator Mediates Arterial Neointima Formation in Mice. *Circ Res* 1997; 81(5):829-839.
- (35) Wei Y, Eble JA, Wang Z, Kreidberg JA, Chapman HA. Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with integrin alpha3beta1. *Mol Biol Cell* 2001; 12(10):2975-2986.
- (36) Resnati M, Pallavicini I, Wang JM et al. The fibrinolytic receptor for urokinase activates the G protein-coupled chemotactic receptor FPRL1/LXA4R. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(3):1359-1364.

- (37) Kiyani J, Kiyani R, Haller H, Dumler I. Urokinase-induced signaling in human vascular smooth muscle cells is mediated by PDGFR-beta. *EMBO J* 2005; 24(10):1787-1797.
- (38) Dumler I, Weis A, Mayboroda OA et al. The Jak/Stat pathway and urokinase receptor signaling in human aortic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998; 273(1):315-321.
- (39) Dumler I, Kopmann A, Wagner K et al. Urokinase induces activation and formation of Stat4 and Stat1-Stat2 complexes in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999; 274(34):24059-24065.
- (40) Dumler I, Kopmann A, Weis A et al. Urokinase activates the Jak/Stat signal transduction pathway in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(2):290-297.
- (41) Koshelnick Y, Ehart M, Hufnagl P, Heinrich PC, Binder BR. Urokinase receptor is associated with the components of the JAK1/STAT1 signaling pathway and leads to activation of this pathway upon receptor clustering in the human kidney epithelial tumor cell line TCL-598. *J Biol Chem* 1997; 272(45):28563-28567.
- (42) Horvath CM, Darnell JE. The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(2):233-239.
- (43) Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR, Ralph SJ, Zurcher G, Ziemiecki A. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol* 1991; 11(4):2057-2065.
- (44) Frank SJ, Gilliland G, Kraft AS, Arnold CS. Interaction of the growth hormone receptor cytoplasmic domain with the JAK2 tyrosine kinase. *Endocrinology* 1994; 135(5):2228-2239.
- (45) Chen M, Cheng A, Candotti F et al. Complex effects of naturally occurring mutations in the JAK3 pseudokinase domain: evidence for interactions between the kinase and pseudokinase domains. *Mol Cell Biol* 2000; 20(3):947-956.
- (46) Zhao Y, Wagner F, Frank SJ, Kraft AS. The amino-terminal portion of the JAK2 protein kinase is necessary for binding and phosphorylation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta c chain. *J Biol Chem* 1995; 270(23):13814-13818.
- (47) Chen M, Cheng A, Chen YQ et al. The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common gamma chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(13):6910-6915.

- (48) Hilkens CM, Is'harc H, Lillemeier BF et al. A region encompassing the FERM domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130. *FEBS Lett* 2001; 505(1):87-91.
- (49) Imada K, Leonard WJ. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 2000; 37(1-2):1-11.
- (50) Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X et al. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 1993; 74(2):237-244.
- (51) Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993; 74(2):227-236.
- (52) Muller M, Briscoe J, Laxton C et al. The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction. *Nature* 1993; 366(6451):129-135.
- (53) O'Brien KB, O'Shea JJ, Carter-Su C. SH2-B family members differentially regulate JAK family tyrosine kinases. *J Biol Chem* 2002; 277(10):8673-8681.
- (54) Takeshita T, Arita T, Higuchi M et al. STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction. *Immunity* 1997; 6(4):449-457.
- (55) Notarangelo LD, Mella P, Jones A et al. Mutations in severe combined immune deficiency (SCID) due to JAK3 deficiency. *Hum Mutat* 2001; 18(4):255-263.
- (56) Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:293-322.
- (57) Fujitani Y, Hibi M, Fukada T et al. An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* 1997; 14(7):751-761.
- (58) Silvennoinen O, Julkunen I, Alitalo K. [Nuclear pathway of interferons]. *Duodecim* 1993; 109(17):1447-1449.
- (59) Paukku K, Valgeirsdottir S, Saharinen P, Bergman M, Heldin CH, Silvennoinen O. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced activation of signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 is mediated by PDGF beta-receptor and is not dependent on c-src, fyn, jak1 or jak2 kinases. *Biochem J* 2000; 345 Pt 3:759-766.
- (60) Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(9):651-662.

- (61) Lillemeier BF, Koster M, Kerr IM. STAT1 from the cell membrane to the DNA. *EMBO J* 2001; 20(10):2508-2517.
- (62) Sekimoto T, Imamoto N, Nakajima K, Hirano T, Yoneda Y. Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO J* 1997; 16(23):7067-7077.
- (63) Marg A, Shan Y, Meyer T, Meissner T, Brandenburg M, Vinkemeier U. Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J Cell Biol* 2004; 165(6):823-833.
- (64) Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 1995; 82(2):241-250.
- (65) Kile BT, Nicola NA, Alexander WS. Negative regulators of cytokine signaling. *Int J Hematol* 2001; 73(3):292-298.
- (66) Starr R, Hilton DJ. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays* 1999; 21(1):47-52.
- (67) Wormald S, Hilton DJ. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 2004; 279(2):821-824.
- (68) Kusch A, Tkachuk S, Haller H et al. Urokinase stimulates human vascular smooth muscle cell migration via a phosphatidylinositol 3-kinase-Tyk2 interaction. *J Biol Chem* 2000; 275(50):39466-39473.
- (69) 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 Rac1 to the Tyk2/PI3-K signalling pathway. *Thromb Haemost* 2003; 89(5):904-914.
- (70) Noda-Heiny H, Sobel BE. Vascular smooth muscle cell migration mediated by thrombin and urokinase receptor. *Am J Physiol* 1995; 268(5 Pt 1):C1195-C1201.
- (71) Fazioli F, Resnati M, Sidenius N, Higashimoto Y, Appella E, Blasi F. A urokinase-sensitive region of the human urokinase receptor is responsible for its chemotactic activity. *EMBO J* 1997; 16(24):7279-7286.
- (72) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- (73) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-685.

- (74) Leif RC, Stein JH, Zucker RM. A short history of the initial application of anti-5-BrdU to the detection and measurement of S phase. *Cytometry A* 2004; 58(1):45-52.
- (75) Krishnan K, Pine R, Krolewski JJ. Kinase-deficient forms of Jak1 and Tyk2 inhibit interferon alpha signaling in a dominant manner. *Eur J Biochem* 1997; 247(1):298-305.
- (76) Shuai K, Stark GR, Kerr IM, Darnell JE, Jr. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science* 1993; 261(5129):1744-1746.
- (77) Meyer T, Vinkemeier U. Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur J Biochem* 2004; 271(23-24):4606-4612.
- (78) Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986; 103(6 Pt 2):2787-2796.
- (79) Ihle JN, Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 1995; 11(2):69-74.
- (80) Beadling C, Guschin D, Witthuhn BA et al. Activation of JAK kinases and STAT proteins by interleukin-2 and interferon alpha, but not the T cell antigen receptor, in human T lymphocytes. *EMBO J* 1994; 13(23):5605-5615.
- (81) Proudfoot D, Fitzsimmons C, Torzewski J, Bowyer DE. Inhibition of human arterial smooth muscle cell growth by human monocyte/macrophages: a co-culture study. *Atherosclerosis* 1999; 145(1):157-165.
- (82) Seki Y, Kai H, Shibata R et al. Role of the JAK/STAT pathway in rat carotid artery remodeling after vascular injury. *Circ Res* 2000; 87(1):12-18.
- (83) Powell JS, Muller RK, Rouge M, Kuhn H, Hefti F, Baumgartner HR. The proliferative response to vascular injury is suppressed by angiotensin-converting enzyme inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16 Suppl 4:S42-S49.
- (84) Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res* 1991; 68(2):450-456.
- (85) Chartier C, Degryse E, Gantzer M, Dieterle A, Pavirani A, Mehtali M. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol* 1996; 70(7):4805-4810.

- (86) Mukhina S, Stepanova V, Traktouev D et al. The chemotactic action of urokinase on smooth muscle cells is dependent on its kringle domain. Characterization of interactions and contribution to chemotaxis. *J Biol Chem* 2000; 275(22):16450-16458.
- (87) Haspel RL, Salditt-Georgieff M, Darnell JE, Jr. The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J* 1996; 15(22):6262-6268.
- (88) Royer Y, Staerk J, Costuleanu M, Courtoy PJ, Constantinescu SN. Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. *J Biol Chem* 2005; 280(29):27251-27261.
- (89) de Vries CJ, van Achterberg TA, Horrevoets AJ, ten Cate JW, Pannekoek H. Differential display identification of 40 genes with altered expression in activated human smooth muscle cells. Local expression in atherosclerotic lesions of smags, smooth muscle activation-specific genes. *J Biol Chem* 2000; 275(31):23939-23947.
- (90) Shaw MH, Freeman GJ, Scott MF et al. Tyk2 negatively regulates adaptive Th1 immunity by mediating IL-10 signaling and promoting IFN-gamma-dependent IL-10 reactivation. *J Immunol* 2006; 176(12):7263-7271.
- (91) Tokumasa N, Suto A, Kagami S et al. Expression of Tyk2 in dendritic cells is required for IL-12, IL-23, and IFN-gamma production and the induction of Th1 cell differentiation. *Blood* 2007; 110(2):553-560.
- (92) Cetkovic-Cvrlje M, Tibbles HE. Therapeutic potential of Janus kinase 3 (JAK3) inhibitors. *Curr Pharm Des* 2004; 10(15):1767-1784.
- (93) Rousvoal G, Si MS, Lau M et al. Janus kinase 3 inhibition with CP-690,550 prevents allograft vasculopathy. *Transpl Int* 2006; 19(12):1014-1021.
- (94) Hexner EO, Serdikoff C, Jan M et al. Lestaurtinib (CEP701) is a JAK2 inhibitor that suppresses JAK2/STAT5 signaling and the proliferation of primary erythroid cells from patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 2008; 111(12):5663-5671.
- (95) van Gurp EA, Schoordijk-Verschoor W, Klepper M et al. The effect of the JAK inhibitor CP-690,550 on peripheral immune parameters in stable kidney allograft patients. *Transplantation* 2009; 87(1):79-86.
- (96) Wilkinson B, et al. Improvement in psoriatic lesions during a 14-day trial of CP-690,550 (CP), an orally active inhibitor of Janus Kinase 3 (JAK). *Ann Rheum Dis* 2007; 66:-Suppl. II.

8. Anhang

I Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

II Publikationen

Margret Patecki*, Markus von Schaewen*, Sergey Tkachuk, Uwe Jerke, Rainer Dietz, Inna Dumler, Angelika Kusch: **Tyk2 mediates effects of urokinase on human vascular smooth muscle cell growth**; Biochem Biophys Res Commun; 2007 Aug 3; 359(3):679-84

*geteilte Autorenschaft

III Selbständigkeitserklärung

Ich, Markus von Schaewen, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Die Rolle der Januskinasen Jak1 und Tyk2 bei der monozyteninduzierten
Proliferationshemmung glatter Gefäßmuskelzellen“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Dr. med. Angelika Kusch bedanken, die mir die Anfertigung der vorliegenden Arbeit erst ermöglicht hat. Sie hat mich in den spannenden Themenkomplex der vorliegenden Dissertation eingearbeitet und in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit begleitet. Sie war es auch, die mich an das wissenschaftliche Arbeiten herangeführt und mir die so wichtige Orientierung im Irrgarten der Experimente gegeben hat. Besonders bedanken möchte ich mich bei ihr für die kritische und geduldige Durchsicht des Manuskriptes.

Bei Herrn PD Dr. med. Cemil Özcelik bedanke ich mich für die kurzfristige Übernahme der Betreuung dieser Arbeit.

Bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Inna Dumler möchte ich mich für die zahlreichen fachlichen Anregungen bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Uwe Jerke, der stets ein offenes Ohr für mich hatte, mir sowohl im Theoretischen als auch im Praktischen wichtige Anregungen gab und es immer verstand, mich auch nach Rückschlägen wieder zu motivieren.

Mein Dank gilt auch Gudrun Hartmann und Jana Treutler, die mir das praktische Arbeiten im Labor beigebracht haben und mit ihrer Erfahrung eine nicht versiegende Quelle wertvoller Tipps und Hinweise waren.

Des Weiteren möchte ich mich bei denen bedanken, die mich in der Zeit der Entstehung dieser Arbeit außerhalb des Labors begleitet und unterstützt haben. Besonders Janine, Kerstin, Christoph und natürlich Daniel möchte ich an dieser Stelle nicht unerwähnt lassen.

Bei meinen Eltern möchte ich mich bedanken für Ihre Fürsorge und für alles, was Sie für mich getan haben, wovon die Ermöglichung des Studiums nur das Geringste war.