

Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
aus dem  
CharitéCentrum 4 für Therapieforschung  
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie CBF/CCM

Direktor:  
Prof. Dr. med. Ivar Roots

**Einfluss der pharmakologischen MEK-Inhibition auf  
Phosphorylierung und Expression der extrazellulär-regulierten  
Kinasen ERK1/2 und deren Substrate nach intraluminarer  
Verletzung der Arteria carotis der Ratte**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
Medizinischen Doktorwürde  
Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von: Meike Fahrenholz  
aus: Braunschweig

Referent: PD Dr. med. H.-D. Orzechowski

Korreferent: PD Dr. K. Danker

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 01.06.2008

## INHALTSVERZEICHNIS

1	DANKSAGUNG .....	4
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	5
3	EINLEITUNG .....	8
3.1	<b>Rolle der glatten Gefäßmuskelzellen bei der Restenose</b> .....	<b>9</b>
3.2	<b>Signaltransduktion</b> .....	<b>10</b>
3.2.1	Mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskade .....	10
3.2.2	Substrate der extrazellulär-regulierten Kinasen ERK1 und ERK2 .....	13
3.2.3	Regulierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen .....	13
3.2.4	PD98059: Ein synthetischer Inhibitor der Mitogen-aktivierten Protein- kinasekaskade .....	15
3.3	<b>Modelle zur Untersuchung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase- kaskade</b> .....	<b>16</b>
3.3.1	Zellkulturmodell .....	16
3.3.2	Rattenmodell .....	17
3.4	<b>Ziel der Arbeit</b> .....	<b>18</b>
4	MATERIAL UND METHODEN .....	20
4.1	<b>Material</b> .....	<b>20</b>
4.1.1	Chemikalien .....	20
4.1.2	Pharmaka .....	21
4.1.3	Antikörper .....	21
4.1.4	Geräte und sonstige Materialien .....	22
4.1.5	Puffer, Lösungen, Gele und Medien.....	23
4.2	<b>Zellkultur</b> .....	<b>25</b>
4.2.1	Explantation glatter Gefäßmuskelzellen .....	25
4.2.2	Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen .....	25
4.2.3	Toxizitätsprüfung von PD98059 .....	26
4.3	<b>Rattenmodell</b> .....	<b>26</b>
4.3.1	Ballonkatheterverletzung der A. carotis communis.....	26
4.3.2	Pharmakologische Behandlung.....	27
4.4	<b>Proteinbiochemische Untersuchungen</b> .....	<b>28</b>
4.4.1	Extraktion von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen aus Zellkultur zellen und Aa. carotides communes.....	28
4.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	29
4.4.3	Aufkonzentration von Proteinproben .....	29
4.4.4	Western Blot.....	30

<b>4.5</b>	<b>Molekularbiologische Untersuchungen</b> .....	<b>35</b>
4.5.1	Extraktion der RNA aus kultivierten Zellen .....	35
4.5.2	Bestimmung der RNA-Konzentration .....	35
4.5.3	Northern Blot.....	35
<b>4.6</b>	<b>Immunhistochemische Analysen</b> .....	<b>38</b>
4.6.1	Präparation der Gefäße.....	38
4.6.2	Immunhistochemische Färbung .....	38
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>39</b>
<b>5.1</b>	<b>Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung</b> .....	<b>39</b>
5.1.1	Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung in vitro.....	39
5.1.2	Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung in vivo .....	40
<b>5.2</b>	<b>Induktion der Expression der MAPK-Phosphatasen MKP-1 und MKP-3</b> .....	<b>41</b>
5.2.1	Induktion der Expression der MAPK-Phosphatasen MKP-1 und MKP-3 in vitro .....	41
5.2.2	Induktion der Expression der MAPK-Phosphatasen MKP-1 und MKP-3 in vivo.....	42
<b>5.3</b>	<b>Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung durch PD98059</b> .....	<b>43</b>
5.3.1	Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung durch PD98059 in vitro .....	43
5.3.2	Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung und Suppression der ERK1/2-Proteinexpression durch PD98059 in vivo.....	44
<b>5.4</b>	<b>Toxizitätsprüfung von PD98059 bei Behandlung von VSMC</b> .....	<b>46</b>
<b>5.5</b>	<b>Verminderung der Ets-1-Proteinexpression durch PD98059</b> .....	<b>49</b>
5.5.1	Verminderung der Ets-1-Proteinexpression durch PD98059 in vitro .....	49
5.5.2	Verminderung der Ets-1-Proteinexpression durch PD98059 in vivo .....	50
<b>5.6</b>	<b>Verminderung der Zellproliferation durch PD98059 in vivo</b> .....	<b>52</b>
<b>5.7</b>	<b>Effekte von PD98059 auf die Apoptose in vivo</b> .....	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>59</b>
<b>6.1</b>	<b>Zeitverlauf der ERK1/2-Aktivierung im Rattenmodell</b> .....	<b>59</b>
6.1.1	Einfluss der MKP-1 und MKP-3 auf die Regulierung der MAPK .....	61
<b>6.2</b>	<b>Einfluss von PD98059 auf die ERK1/2-Aktivierung und die ERK1/2-Proteinexpression</b> .....	<b>64</b>
<b>6.3</b>	<b>Wirkung von PD98059 auf die Ets-1-Expression</b> .....	<b>66</b>
<b>6.4</b>	<b>PD98059 als Proliferationshemmer glatter Gefäßmuskelzellen</b> .....	<b>67</b>
<b>6.5</b>	<b>Effekt von PD98059 auf die Apoptose</b> .....	<b>69</b>
<b>6.6</b>	<b>Grenzen des verwendeten Rattenmodells</b> .....	<b>70</b>

---

<b>6.7</b>	<b>Mögliche klinische Bedeutung der MEK-Inhibition für die pharmakologische Prävention der Restenose .....</b>	<b>72</b>
7	ZUSAMMENFASSUNG .....	76
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	78
9	LEBENS LAUF .....	86
10	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG .....	88

## **1 Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Hans-Dieter Orzechowski dafür, dass ich unter seiner Betreuung diese Promotion anfertigen konnte. Besonders danke ich ihm für die Anregungen und intensiven und hilfreichen Diskussionen während der Promotionsarbeit.

Für die guten Forschungsbedingungen bei der Erarbeitung der experimentellen Grundlagen von 2001 bis 2003 sei Herrn Prof. Dr. med. Martin Paul als Direktor des Institutes für Klinische Pharmakologie und Toxikologie gedankt.

Bei Frau Birgitta Schwaneberg möchte ich mich sehr herzlich für die Unterstützung bei der Erlernung der Methoden bedanken.

Allen Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für die gute Zusammenarbeit und große Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie danke ich für die unermüdliche Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit und meiner gesamten beruflichen Ausbildung.

## 2 Abkürzungsverzeichnis

Nicht aufgenommen sind die Abkürzungen für chemische Elemente, internationale Standardeinheiten (SI-Einheiten), andere gesetzliche Maßeinheiten und nach den Regeln der deutschen Rechtschreibung allgemein gültige Abkürzungen.

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
APS	Ammoniumpersulfat
Bax	Bcl-assoziertes X-Protein
Bcl-2	B-Zelllymphom 2
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor ( <i>basic fibroblast growth factor</i> )
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure ( <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
cps	Zählschritte pro Sekunde ( <i>counts per second</i> )
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DAG	Diacylglycerin
cdk2	Cyclin-abhängige Kinase 2 ( <i>cyclin-depend kinase 2</i> )
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's serum</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DSP	doppelt-spezifische Phosphatase
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Egr-1	<i>early growth response gene-1</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-Aminoethyl)-Tetraessigsäure
ERK	Extrazellulär-regulierte Kinase
Ets	E26 Erythroblastomavirus transformationsspezifisch

fl.	flüssig
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	fötale Rinderserum ( <i>fetal calf serum</i> )
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-Protein	guaninnukleotidbindendes Protein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethan-Sulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
Ig	Immunglobulin
IC	inhibitorische Konzentration
IL-1	Interleukin-1
JNK	c-jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MACE	größere unerwünschte kardiale Ereignisse ( <i>major adverse cardiac events</i> )
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK (=MKK)	MAPK/ERK-Kinase
MEKK (=MKKK)	MAPK/ERK-Kinase-Kinase
MKP	MAPK-Phosphatase
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonat
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MWCO	Molmassengrenze ( <i>molecular weight cut-off</i> )
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren
O.D.	optische Dichte
p	statistische Signifikanz
p38/42/44	38/42/44-kDa-Protein
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>



PD98059	2'-Amino-3'-Methoxyflavon
PDGF	Plättchenwachstumsfaktor ( <i>platelet-derived growth factor</i> )
PKC	Proteinkinase C
PMA (=TPA)	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PTCA	perkutane transluminare koronare Angioplastie
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PVP	Polyvenylpyrolidon
Ras (p21)	21-kDa-Protein
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RRE	<i>Ras-responsive element</i>
S	Serin
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SB203580	Pyridinyl-Imidazol
SB239063	Pyrimidin-Imidazol
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHR	Spontan Hypertensive Ratte
SP600125	1,9-Pyrazoloanthrone
SSC	<i>sodium saline citrate</i>
T	Threonin
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>tris buffered saline</i> )
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$ 1	Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$ 1 ( <i>transforming growth factor-<math>\beta</math>1</i> )
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TPA (= PMA)	Tetradecanoylphorbolazetat
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Einheit (unit)
UV	ultraviolett
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen ( <i>vascular smooth muscle cells</i> )
Y	Tyrosin

### 3 Einleitung

Die atherosklerotisch verursachten Herz-Kreislaufkrankungen stehen in den westlichen Industrienationen an erster Stelle der Todesursachen. Nach Erhebungen des Statistischen Bundesamtes starben 2003 46,4 % der insgesamt Gestorbenen an Erkrankungen des Kreislaufsystems (Statistisches Bundesamt, 2005).

Die Atherosklerose entwickelt sich über viele Jahre und schränkt im fortgeschrittenen Stadium die Lebensqualität des Einzelnen erheblich ein. Zu ihren Symptomen zählen unter anderem die koronare Herzkrankheit (KHK), zerebrovaskuläre Erkrankungen und periphere Gefäßverschlüsse.

Die hohe Inzidenz der atherosklerotischen Folgeerkrankungen fordert neben Präventionsmaßnahmen die Weiterentwicklung gezielter Therapiemaßnahmen.

Die Verfahren der Revaskularisation verbessern die Symptomatik der Angina pectoris, senken das Infarktrisiko und verbessern die Belastbarkeit und die Prognose bei KHK. Zu den Verfahren der Revaskularisation zählen die perkutane transluminare koronare Angioplastie (PTCA), bei der eine Ballondilatation oft in Kombination mit einer Stentimplantation durchgeführt wird, und die operative Koronarrevaskularisation (Bypass-Operation).

Bei den Verfahren der Revaskularisation, insbesondere bei der PTCA, stellt die Reobstruktion eine häufige Komplikation dar, die den langfristigen Erfolg dieser Therapien in mehr als 30 % der Fälle mindert (Popma et al., 1991) und auch durch Stentimplantation in 10-50 % der Fälle nicht verhindert werden kann (Lowe et al., 2002). Neben den thrombotischen Gefäßverschlüssen und der Progression der Grundkrankheit spielt der Prozess der traumainduzierten Lumeneinengung, der als Restenosierung bezeichnet wird, eine wichtige Rolle (Alfke et al., 1996).

Erst bei besserem Verständnis darüber, wie die Restenose entsteht, und nach Entwicklung spezifischer Hemmstoffe wird man die langfristigen Erfolgsraten der interventionellen Revaskularisierung entscheidend voranbringen.

### 3.1 Rolle der glatten Gefäßmuskelzellen bei der Restenose

Unter physiologischen Bedingungen proliferieren glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) zu einer sehr geringen Rate (Pauletto et al., 1994). Atherosklerose und hypertensive Gefäßerkrankungen sind mit einem Anstieg der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen verbunden (Schwartz et al., 1986). Dabei wird die Verletzung der Tunica intima (Intima) im Sinne der *response-to-injury*-Hypothese als Auslöser des atherosklerotischen Geschehens betrachtet (Ross, 1986).

Die PTCA führt zur Frakturierung des atherosklerotischen Plaques und einer weitgehenden Zerstörung der Intima mit oder ohne Auftreten von Dissektionen der Tunica media (Media) (Alfke et al., 1996). Die anschließende Neointimabildung mit Gefahr der Restenosierung basiert auf der durch die erhebliche Verletzung ausgelösten Gefäßmuskelzellproliferation. Da sich die Prozesse der Atherosklerose auf die Entwicklung der Restenosierung übertragen lassen, spricht man auch von akzelerierter Atherosklerose (Ip et al., 1990).

Der Verlauf der Restenosierung kann in drei Phasen eingeteilt werden. In der frühen postinterventionellen Phase können ein Vasospasmus und die elastische Rückstellbewegung, welche als *elastic recoil* bezeichnet wird, zu einem akuten Gefäßverschluss führen. Anschließend kommt es innerhalb der ersten Stunden bis Tage dadurch, dass verletztes Gefäßendothel nicht in der Lage ist, thrombozytenaggregationshemmende Faktoren zu bilden, zu einer Anlagerung von Thrombozyten und gegebenenfalls zur Bildung eines wandständigen Thrombus (Ip et al., 1990). Diese Prozesse sind mit einer Freisetzung von mitogenen Faktoren, zum Beispiel den Wachstumsfaktoren *platelet-derived growth factor* (PDGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *transforming growth factor- $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1) und dem Interleukin-1 (IL-1), verbunden. Durch Chemotaxis können diese Faktoren zu einer Einwanderung von Entzündungszellen führen (Libby et al., 1992; Reidy et al., 1992).

Die zweite Phase ist durch Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und durch Migration von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Gefäßwandmedia in die Gefäßwandintima gekennzeichnet. Die DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Replikation der Gefäßmuskelzellen beginnt bereits 24 Stunden nach Gefäßverletzung, wobei die Anhäufung dieser Zellen in der Neointima nach 14 Tagen ihren Höhepunkt erreicht (Casscells, 1992).

In der letzten Phase spielt die Produktion von extrazellulärer Matrix durch glatte Gefäßmuskelzellen, die verglichen mit denen in der Media dominierenden Muskelzellen

vom kontraktilen Typ eine Differenzierung in Richtung synthetischer Typ vollbracht haben, die entscheidende Rolle (Pauletto et al., 1994).

### 3.2 Signaltransduktion

Das Zusammenspiel der Zellen im Organismus ist nur dadurch möglich, dass Zellen extrazelluläre Signale empfangen, in das Zellinnere übermitteln und auf diese durch spezifische zelluläre Effekte reagieren können.

Zum Kommunikationssystem der Zelle gehören Membranrezeptoren und intrazelluläre Rezeptoren, die die extrazellulären physikalischen, chemischen oder molekularen Signale empfangen. Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, eine Großzahl weiterer Proteine, die mit Signalproteinen im Austausch stehen, und andere Botenstoffe (*second messenger*) sind an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt. Die Interaktion der einzelnen Elemente führt zu einer Transduktion des Signals in das Zytoplasma oder den Zellkern und löst dort eine Zellantwort aus. Mögliche Antworten sind Änderungen von Enzymaktivitäten, Hemmung oder Steigerung von Proteinbiosynthesen, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Hemmung oder Steigerung der Apoptose.

#### 3.2.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskade

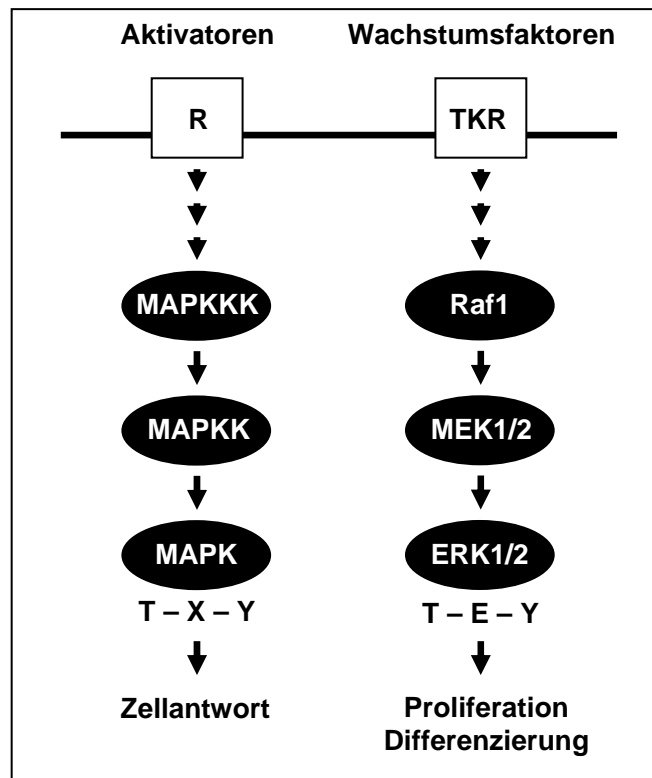
Bei der Übertragung extrazellulärer Signale sind die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) von entscheidender Bedeutung. Es wird die extrazellulär-regulierte Kinasen (ERK)-Familie von den Familien der Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) unterschieden. Zu den Stress-aktivierten Proteinkinasen gehören die JNK (c-jun N-terminale Kinase)-Familie und die p38 (38-kDa-Protein)-MAPK-Familie (Cohen, 1997).

Die extrazellulär-regulierten Kinasen nehmen bei der Regulierung der Zelldifferenzierung und Zellproliferation eine zentrale Stellung ein. Dabei binden Wachstumsfaktoren und Faktoren der Zelldifferenzierung an zellmembranständige Tyrosinkinase-rezeptoren, heterotrimere G-Protein (guaninnukleotidbindendes Protein)-Rezeptoren oder Wachstumshormonrezeptoren und aktivieren die Mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskade, die durch mehrere Phosphorylierungsschritte das Signal in den Zellkern oder das Zytoplasma überträgt. Die zwei extrazellulär-regulierten Kinasen ERK1 (p44), ein 44 kDa großes Protein, und ERK2 (p42), ein 42 kDa großes Protein, sind unter anderem bei Menschen und Ratten bekannt (Pauletto et al., 1994; Widmann et al., 1999).

Um ihre volle katalytische Aktivität zu erlangen, müssen MAPK sowohl an einem Threoninrest (T) als auch an einem Tyrosinrest (Y) phosphoryliert werden. Da diese Reste lediglich durch eine Aminosäure voneinander getrennt sind, spricht man von einem T–X–Y-Phosphorylierungsmotiv. Im Fall der ERK1 und der ERK2 handelt es sich um die Aminosäuren Threonin und Tyrosin mit einem dazwischenliegenden Glutamatrest (E), folglich einem T–E–Y-Motiv. Bei der ERK der Ratte und der Maus liegt der Threoninrest an Position 183 und der Tyrosinrest an Position 185 (Ray und Sturgill, 1988; Canagarajah et al., 1997). Die humane ERK1/2 wird an einem Threoninrest an Position 202/185 und an einem Tyrosinrest an Position 204/187 phosphoryliert (Ahn et al., 2001).

Die vorgeschalteten MAPK-Aktivatoren sind die ERK-spezifischen MAPK-Kinasen (MEK, MAPKK, MKK) MEK1 und MEK2, die ihrerseits durch die MAPK-Kinase-Kinase (MEKK, MAPKKK, MKKK) Raf1 aktiviert werden (Johnson und Vaillancourt, 1994). Raf1 wird nach Ligandenbindung an den jeweiligen Rezeptor, Rezeptoraktivierung und Bindung von weiteren Proteinen mit Hilfe des kleinen G-Proteins Ras (p21, 21-kDa-Protein) und einer Tyrosinkinase oder mit Hilfe der Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert (Widmann et al., 1999) (**Abb. 1**).

Die Bezeichnung ERK1/2 steht in den folgenden Ausführungen für die beiden extrazellulär-regulierten Kinasen ERK1 und ERK2 und MEK1/2 für die beiden MAPK-Kinasen MEK1 und MEK2.



**Abb. 1: Mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskade (MAPK-Kaskade).** Links: klassisches Schema der MAPK-Kaskade. Rechts: Aktivierungskaskade der extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK) ERK1 und ERK2. Der gestrichelte Pfeil symbolisiert die vorgeschalteten Aktivierungsschritte. R: Membranrezeptor; TKR: Tyrosinkinase-Rezeptor; T: Threonin; Y: Tyrosin; E: Glutamat; X: Threonin- und Tyrosinrest-trennende Aminosäure.

### 3.2.2 Substrate der extrazellulär-regulierten Kinasen ERK1 und ERK2

ERK1 und ERK2 sind Serin-Threonin-Kinasen, die das Signal dadurch weiterleiten, dass sie entweder im Zellkern oder im Zytoplasma Proteine an Serin- oder Threoninresten phosphorylieren. Zu den Substraten der ERK1/2 zählen Transkriptionsfaktoren, nukleäre Hormonrezeptoren, Zytoskelettproteine, Enzyme und andere Proteinkinasen (Cohen, 1997; Widmann et al., 1999).

Ein entscheidender Transkriptionsfaktor hinsichtlich der Bildung der Neointima ist Ets-1, ein Mitglied der Ets (E26 Erythroblastomavirus transformationsspezifisch)-Transkriptionsfaktorenfamilie. Ets-Proteine sind durch eine hoch konservative DNA-Bindungsstelle, die in einem *winged-helix-loop-helix*-Motiv liegt, charakterisiert. Das Ets-1-Gen der Ratte in glatten Gefäßmuskelzellen hat zwei Transkriptionsprodukte von 5,3 und 4 kb, und das entsprechende nukleäre Protein hat eine Größe von 55 kDa (Bhat et al., 1989; Wasylyk et al., 1998).

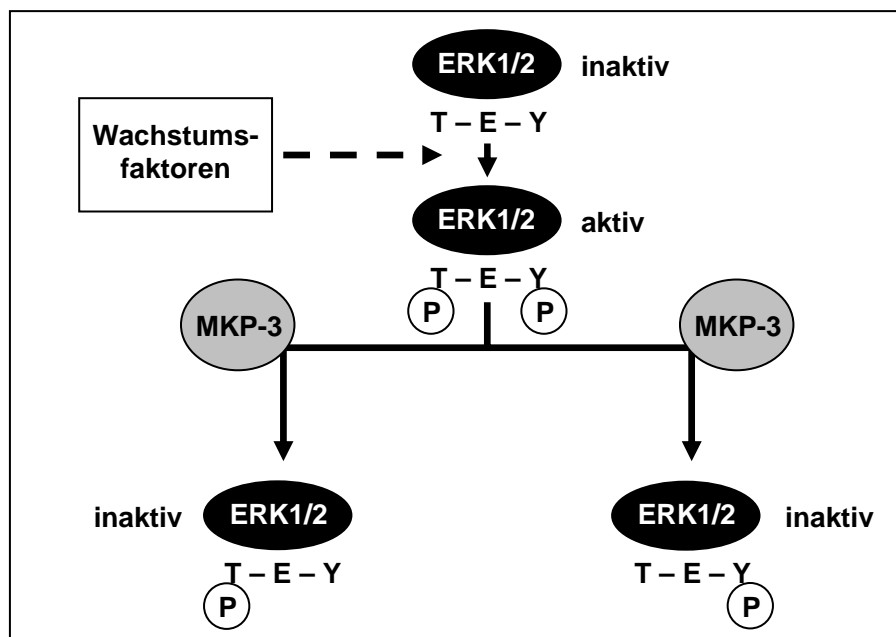
Die Aktivierung der MAPK-Kaskade führt einerseits zu einer gesteigerten Ets-1-Expression (Goetze et al., 2001; Hultgardh-Nilsson et al., 1996; Naito et al., 1998), andererseits wird die Aktivität des Ets-1-Proteins durch ERK-abhängige Phosphorylierung eines Threoninrestes reguliert (McCarthy et al., 1997). Anschließend kann Ets-1 nach Bildung eines Heterodimers mit einem anderen Transkriptionsfaktor durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, den *Ras-responsive elements* (RRE's), die Genexpression regulieren (Wasylyk et al., 1998; Yordy und Muise-Helmericks, 2000). Zu den Ets-1-regulierten Genen gehören für Serinproteasen, Matrixmetalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren kodierende Gene, deren Genprodukte am Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix entscheidenden Anteil haben (Hultgardh-Nilsson et al., 1996; Trojanowska, 2000).

### 3.2.3 Regulierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

Die Dauer und die Stärke der MAPK-Aktivierung hängen nicht allein von der Aktivierung durch stromaufwärts gelegene Proteinkinasen ab, sondern die MAPK können auf verschiedenen Ebenen der Signalkaskade und durch unterschiedliche Mechanismen reguliert werden. Im Sinne einer negativen Rückkopplung können die MAPK durch Phosphorylierung von Wachstumsfaktorrezeptoren, vorgeschalteten Kinasen oder anderen an der Signaltransduktion beteiligten Proteinen deren katalytische Aktivität reduzieren (Widmann et al., 1999).

Auf Höhe der MAPK entfalten spezifische, inaktivierende Phosphatasen als Gegenspieler der MAPK-Kinasen ihre Wirkung. Dabei handelt es sich um Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) aus der Familie der doppelt-spezifischen Phosphatasen (DSP). Diese als MAPK-Phosphatasen (MKP) bezeichneten Phosphatasen dephosphorylieren MAPK an Threonin- oder Tyrosinresten des T-X-Y-Motivs und überführen dadurch die aktive Form der MAPK in eine inaktive Form (Keyse, 2000; Camps et al., 2000). Bei Säugetieren sind bisher 10 verschiedene MAPK-Phosphatasen identifiziert worden, wobei es sich mit Ausnahme der MKP-3 um Produkte von *immediate-early genes* handelt (Tanoue et al., 2002). Die verschiedenen MAPK-Phosphatasen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität, ihrer subzellulären Lokalisation und des Mechanismus ihrer Regulierung (Brondello et al., 1997).

ERK1 und ERK2 werden bevorzugt durch die zytosolische 42 kDa große MKP-3 inaktiviert (**Abb. 2**). Diese Selektivität erklärt sich dadurch, dass die MKP-3 erst durch Bindung des nicht-katalytischen Aminoterminus an die ERK aktiviert wird. Dieser Vorgang ist unabhängig von der ERK-Aktivität (Muda et al., 1998).

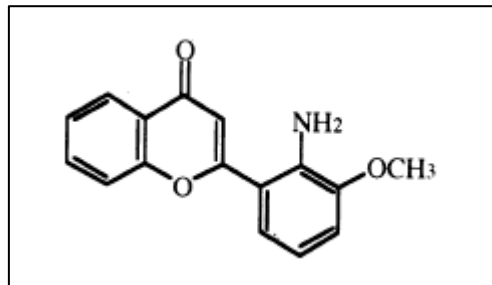


**Abb. 2:** Inaktivierung von ERK1/2 durch die MAPK-Phosphatase-3 (MKP-3). Der gestrichelte Pfeil symbolisiert die vorgeschalteten Aktivierungsschritte. T: Threonin; Y: Tyrosin; E: Glutamat; P: Phosphat (modifiziert nach Camps et al., 2000)



### 3.2.4 PD98059: Ein synthetischer Inhibitor der Mitogen-aktivierten Protein-kinasekaskade

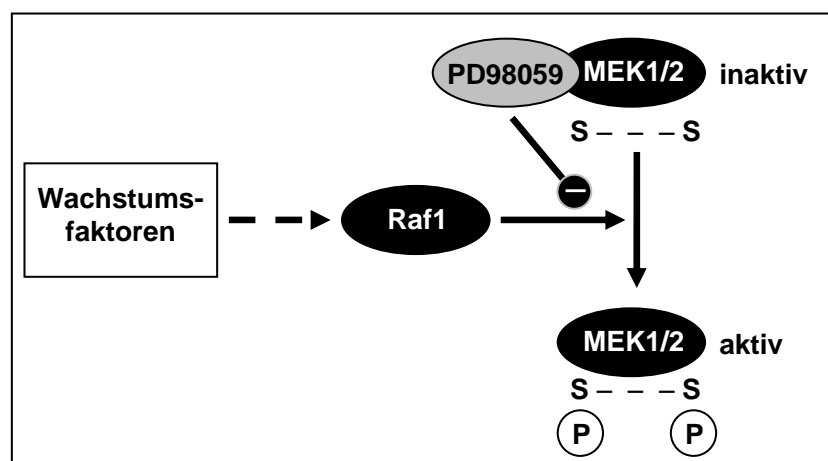
PD98059 (2'-Amino-3'-Methoxyflavon) ist eine kleine, zellpermeable Flavonverbindung, die von Alan Saltiel und Kollegen bei Parke-Davis in der pharmazeutischen Forschungsabteilung durch Screeninguntersuchungen von synthetischen Verbindungen an der MAPK-Kaskade entdeckt wurde (**Abb. 3**).



**Abb. 3:** Chemische Struktur von PD98059.  
(Dudley et al., 1995)

PD98059 inhibiert die ERK-aktivierenden Enzyme MEK1 und MEK2, ohne einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die ERK selbst auszuüben. Bei Anwesenheit von PD98059 können die ERK und demzufolge die nachgeschalteten Substrate nicht aktiviert werden (Dudley et al., 1995).

PD98059 ist ein nichtkompetitiver, reversibler MEK-Inhibitor, der selektiv die inaktive Form von MEK1 und MEK2 bindet und dadurch die Phosphorylierung und Aktivierung durch Raf1 verhindert (**Abb. 4**).



**Abb. 4:** PD98059 vermittelte MEK1/2-Inhibition.  
Der gestrichelte Pfeil symbolisiert die vorgeschalteten Aktivierungsschritte. S: Serin; P: Phosphat

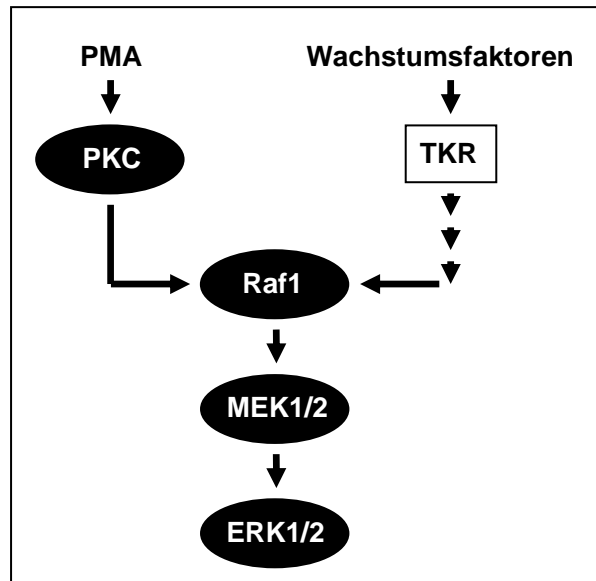
Die Aktivitäten anderer MAPK-Kinasen oder der bereits phosphorylierten, aktiven Formen von MEK werden durch Anwesenheit des Inhibitors nicht beeinflusst. MEK2 wird durch PD98059 etwa zehnmals schwächer gehemmt als MEK1. Die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) beträgt für MEK1 2-7 µM und für MEK2 50 µM (Alessi et al., 1995; Favata et al., 1998).

### 3.3 Modelle zur Untersuchung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasekaskade

#### 3.3.1 Zellkulturmodell

Ein Zellkulturmodell zur Untersuchung der MAPK-Kaskade ist die Kultur glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC), wobei die ERK-Aktivierung zur Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen führt. Der Einsatz des MEK-Inhibitors PD98059 zeigte eine Abnahme der Gefäßmuskelzellproliferation bei unterschiedlichen Stimulationversuchen, wie zum Beispiel bei der Stimulation mit *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Graf et al., 1997), Angiotensin II (Touyz et al., 1999), oxidiertem *low density lipoprotein* (LDL) (Yang et al., 2001) und glykiertem Serumalbumin (Hattori et al., 2001).

Ein weiterer potenter Aktivator der MAPK-Kaskade ist der Phorbolster TetradeCANOYLphorbolazetat (TPA), auch Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA). PMA stimuliert *in vitro*, wie der physiologische Aktivator Diacylglycerin (DAG), direkt die Isoformen PKC- $\alpha$ , PKC- $\beta$ I und PKC- $\gamma$  der Proteinkinase C (PKC) (Dekker und Parker, 1994; Liu und Heckman, 1998). Die aktivierte Proteinkinase C phosphoryliert die MAPK-Kinase-Kinase Raf1 und setzt die MAPK-Kaskade in Gang (Kazlauskas und Cooper, 1988; Marquardt et al., 1994) (**Abb. 5**).



**Abb. 5:** Modell der MAPK-Aktivierung durch Phorbolester (PMA). Links: Aktivierung der MAPK-Kaskade durch PMA via Proteinkinase C (PKC). Rechts: physiologische Aktivierungskaskade. Der gestrichelte Pfeil symbolisiert die vorgeschalteten Aktivierungsschritte. TKR: Tyrosinkinase-Rezeptor (modifiziert nach Marquardt et al., 1994)

### 3.3.2 Rattenmodell

Die Ballonkatheterverletzung der A. carotis communis der Ratte mit Neointimabildung (Clowes et al., 1983) ist ein gängiges Modell für proliferative Gefäßerkrankungen, für das eine Aktivierung der MAPK-Kaskade gezeigt wurde. Nach Ballonkatheterverletzung wurde die schnelle ERK-Aktivierung durch die Darstellung der ERK-Phosphorylierung (Koyama et al., 1998), der erhöhten ERK-Enzymaktivität (Hu et al., 1997; Koyama et al., 1998; Lille et al., 1997; Pyles et al., 1997) oder der Translokation von ERK in den Zellkern (Watson et al., 2000) demonstriert.

Unterschiedlich sind die Daten bezüglich der Dauer der ERK-Aktivierung. Sie differieren von einer vollständigen Inaktivierung innerhalb eines Tages (Koyama et al., 1998; Lille et al., 1997) bis zu einer anhaltend erhöhten Aktivität bis Tag 7 (Hu et al., 1997) oder Tag 14 (Lai et al., 1996). Über einen biphasigen Verlauf mit einer erneut erhöhten nukleären ERK-Aktivität an Tag 7 wurde berichtet (Watson et al., 2000).

### 3.4 Ziel der Arbeit

Die Verfahren der Revaskularisation führen wie oben beschrieben über die Aktivierung der MAPK-Kaskade zu einer Neointimabildung durch Gefäßmuskelzellproliferation mit der Gefahr der Restenosierung.

Um die Aktivierungskaskade der MAPK zu unterbrechen, sind spezifische Inhibitoren entwickelt worden. Da für die MAPK-Kinasen MEK1 und MEK2 keine anderen Substrate als die ERK1 und ERK2 identifiziert werden konnten, scheinen MEK1 und MEK2 ein ideales Ziel für die pharmakologische Inhibition der MAPK-Kaskade zu sein (Ahn et al., 2001; Tian et al., 2000). Der synthetische MAPK-Kinase-Inhibitor PD98059 hemmt spezifisch die MEK1/2-Aktivierung (s. Kapitel 3.2.4).

Im Rahmen anderer Dissertationsarbeiten des Institutes für Klinische Pharmakologie und Toxikologie (R. Real, A. Weinstrauch) wurden histomorphologische Analysen des Effektes von PD98059 auf die Neointimabildung nach Ballonkatheterverletzung der A. carotis communis der Ratte durchgeführt. Dabei zeigte sich bei einmaliger lokaler Behandlung mit PD98059 14 Tage nach Gefäßverletzung eine Reduktion des Neointima-Media-Verhältnisses um mehr als 60 % und ein Lumengewinn von mehr als 30 % verglichen mit den Tieren, die mit dem Trägerstoff ohne Wirkstoff behandelt wurden.

Vor diesem Hintergrund bestand das Ziel der Arbeit darin, die Mechanismen der verminderten Neointimabildung nach Ballondilatation durch pharmakologische MEK1/2-Inhibition zu identifizieren. Dazu wurden die Effekte von lokal verabreichten PD98059 auf die Gefäßmuskelzellproliferation untersucht.

Bei widersprüchlichen Studienergebnissen bezüglich der Dauer der ERK-Aktivierung schien es in einem ersten Schritt sinnvoll, den Zeitverlauf der ERK1/2-Phosphorylierung in dem verwendeten Rattenmodell der Restenose modifiziert nach Clowes et al. zu untersuchen (Clowes et al., 1983). In diesem Zusammenhang sollte auch die Regulierung der MAPK durch die MAPK-Phosphatasen (MKP) beleuchtet werden.

Der zweite Schritt beinhaltete die Untersuchung der Wirkung von PD98059 auf die ERK-Phosphorylierung und die ERK-Proteinexpression in vitro und in vivo.

Anschließend sollte die Wirkung von PD98059 auf ein Zielprodukt der ERK in vitro und in vivo untersucht werden. Es wurde der Transkriptionsfaktor Ets-1 ausgewählt, dessen Expression durch die Aktivierung der ERK in glatten Gefäßmuskelzellen induzierbar ist und dem in der letzten Phase der Restenosierung mit exzessiver Produktion extrazellulärer Matrix eine besondere Bedeutung zukommt (s. Kapitel 3.2.2).

Mit Hilfe von Analysen des Proliferationsmarkers *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), des anti-apoptotischen Onkogens Bcl-2 (B-Zelllymphom 2) und des pro-apoptotischen Proteins Bax (Bcl-assoziiertes X-Protein) sollte eruiert werden, ob die Reduktion der Neointima bei PD98059-behandelten Tieren vor allem durch die verminderte Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen verursacht wird oder ob die Apoptose einen entscheidenden Einfluss hat.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

Artikel	Katalognr.	Firma
Agarose	130022	Amicon
Albumin-egg-Standard	A-1533	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	A-9164	Sigma
BenchMark™ Prestained Protein Ladder	10748-010	Invitrogen
Bio-Rad DC Protein Assay	500-0116	Bio-Rad
Blotting Grade Blocker Non-fat Dry Milk	170-6404	Bio-Rad
Bromphenolblau	11746	Merck
BSA, bovines Serumalbumin	A-8577	Sigma
Complete™ (+ EDTA)	1697498	Roche Diagnostics
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	D-575835	Sigma
Dextransulfat	5956.1	Roth
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	FG 0415	Biochrom KG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D-8418	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	D-9779	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	E-5134	Sigma
Ethylenglykol-bis-(2-Aminoethyl)-Tetraessigsäure (EGTA)	1093053	Boeringer
Ethidiumbromid	11615	Merck
fetal calf serum (FCS)	S 0115	Biochrom KG
Ficoll® 400	17-0400-01	Pharmacia Biotec
Formaldehyd 37 %	F-1635	Sigma
Formamid, deionisiert	P040.1	Roth
Glycerol (fl.)	G-5516	Sigma
Glycin	1.04201	Merck
β-Glycerophosphat (fl.)	G-9891	Sigma
Hämatoxylin	7221	Mikrom International
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2180	J.T. Baker, Deventer
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin)-Ethansulfonsäure (HEPES)	10110	Merck
Igepal CA-630 (fl.)	I-3021	Sigma
Isopropanol	I-9516	Sigma
Lachssperma-DNA	15632-011	GibcoBRL Life Technologies GmbH
2-Mercaptoethanol	15433.0100	Merck
Methanol	8047	J.T. Baker, Deventer
3-(N-Morpholino)-Propansulfonat (MOPS)	M-8899	Sigma
Mouse UniTect™ ABC Kit	XHC01	Calbiochem
Natriumazetat	1.06268	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	3957.2	Roth

Natriumcitrat	3580.2	Roth
Natriumphosphat	6639	Merck
Natriumpyruvat	L 0473 5	Biochrom KG
Sodium-Orthovenadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	S-6508	Sigma
nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	13-114 E 5	Biochrom KG
Paraformaldehyd	8334	Mikrom International
PBS-Dulbecco (1x) w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	L 1825	Biochrom KG
2'-Amino-3'-Methoxyflavon (PD98059)	51300	Calbiochem
Penicillin/Streptomycin	A2213	Biochrom KG
Pluronic® F127	583106	Prill, BASF
Phorbol ester (PMA)	P-158535	Sigma
Ponceau S	P-7170	Sigma
2-Propranolol	6752.1	Roth
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	7370.0100	Merck
Rediprime™ II Random Labelling System	RPN 1633	Amersham
RNase AWAY	70008	Bio Products
RNeasy Mini Kit (250)	74106	Qiagen
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis: 37,5:1)	3029.1	Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	2326.2	Roth
Sodium Deoxycholate	D-5670	Sigma
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	34080	Pierce Chemical
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	T-9281	Sigma
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	5429.2	Roth
Triton X-100	11869.1000	Merck
Trypanblau 0,5 %	444U	Seromed
Trypsin-EDTA	T4049	Sigma
Tween-20	9127.2	Roth

#### 4.1.2 Pharmaka

Artikel	Firma
Ketanest® 25 mg/ml	Parke-Davis/Pfizer
Xylazin 2 %	Sanofi/Ceva GmbH

#### 4.1.3 Antikörper

Antikörper	Katalognr.	Firma
Actin polyclonal goat-Antibody (Epitop: Actin; 43 kDa)	sc-1516	Santa Cruz
Anti-actin, α-smooth muscle-FITC monoclonal mouse-Antibody (clone 1A4 purified immunoglobulin buffered aqueous solution)	F3777	Sigma
Anti-goat, HRP-linked Antibody	sc-2020	Santa Cruz
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	sc-2005	Santa Cruz
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	7071-1	Cell Signaling
Bax polyclonal rabbit-Antibody (Epitop: Baxα, Baxβ; 23 kDa)	sc-493	Santa Cruz

Bcl-2 polyclonal mouse-Antibody (Epitop: amino acids 1-205 of Bcl-2; 26 kDa)	sc-7382	Santa Cruz
Ets-1 monoclonal mouse-Antibody (Epitop: Ets-1; 54 kDa)	sc-350	Santa Cruz
MKP-1 polyclonal rabbit-Antibody (Epitop: MKP-1; 38 kDa)	sc-1199	Santa Cruz
MKP-3 polyclonal goat-Antibody (Epitop: MKP-3 (N-20) carboxy terminus; 42 kDa)	sc-8599	Santa Cruz
p44/42 MAP Kinase polyclonal rabbit-Antibody (Epitop: total Erk 1/2; 42/44 kDa)	9101	Cell Signaling
PCNA monoclonal mouse-Antibody (Epitop: proliferating cell nuclear antigen (cyclin); 37 kDa)	NA03	Oncogene
Phospho-p44/42 MAP Kinase E 10 monoclonal mouse-Antibody (Epitop: double phosphorylated Thr202/Tyr204 of Erk1/2; 42/44 kDa)	sc-9106S	Santa Cruz
Phospho-p44/42 MAP Kinase polyclonal rabbit-Antibody (Epitop: double phosphorylated human: Thr202/Tyr204 of Erk1/2 rat: Thr183/Tyr185; 42/44 kDa)	sc-9101S	Santa Cruz
$\alpha$ -Tubulin monoclonal mouse-Antibody (Epitop: $\alpha$ -Tubulin; 51-54 kDa)	sc-8035	Santa Cruz

#### 4.1.4 Geräte und sonstige Materialien

Artikel	Firma
Anatomische Pinzette, 120 mm	Aesculap
Biometra Multigel G44	Biometra
Cell Scraper, 23 cm	Nunc
Conical Centrifuge Tube, 15 ml	Nunc
Elektrophorese-Powerpack P24	Biometra
Fastblot B43	Biometra
2F Fogarty Ballonkatheter EMB 60	Baxter GmbH
Hybond <sup>TM</sup> -N Nylonmembran	Amersham
Hyperfilm <sup>TM</sup> MP	Amersham
Irispinzette, 100 mm	Aesculap
Microcon <sup>®</sup> Microcentrators Modell 30	Amicon
Mikro-Pinzette, Uhrmacher Typ, 110 mm	Aesculap
Mikro-Federschere, gerade, 120 mm	Aesculap
Mini Protean II Cell 165-2940	Bio-Rad
MRX Microplate-Reader	Dynex Technologies
96F Microwell Plate	Nunc
Parma-Hand <sup>®</sup> Seide 4/0 (1,5 Metric)	Ethicon GmbH
Phosphorimager	Raytest
Photometer UV-1202	Shimadzu
Promax 2020	Heidolph Elektro GmbH & KG
Protran Nitrozellulose Transfermembran	Schleicher & Schüll
Revelation-Program 3.0	Dynex Technologies
Rotationsmikrotom	Mikrom International
Sephadex G-50 Quick Spin <sup>TM</sup> Columns	Boehringer



TINA-Software Version 2.09g	raytest Isotopenmessgeräte GmbH
Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik
Varifuge 3.OR	Heraeus Sepatech
3 MM Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schüll
Zellkulturflaschen mit Filter (25 cm <sup>2</sup> )	Nunc
35 mm-Zellkulturschalen	Nunc
Zentrifuge 5402	Eppendorf

#### 4.1.5 Puffer, Lösungen, Gele und Medien

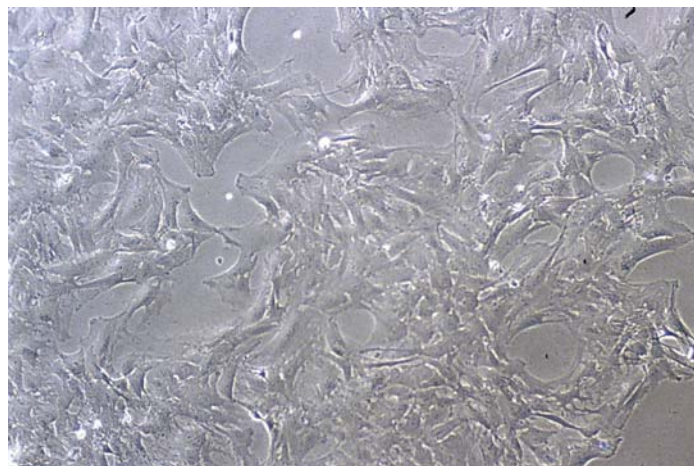
Puffer, Lösung, Gel oder Medium	Bestandteile	Konzentration/ Menge
50x Denhardslösung	BSA PVP Ficoll® 400 Aqua dest.	1,0 g 1,0 g 1,0 g ad 100 ml
Hybridisierungslösung (30 ml)	20x SSPE 50x Denhardslösung 10 % SDS deionisiertes Formamid 50 % Dextransulfat	7,5 ml 3,0 ml 1,5 ml 15 ml 3,0 ml
Laufpuffer (nach Laemmli)	Tris (pH 8,3) Glycin SDS	25 mmol/l 192 mmol/l 0,1 %
10x MOPS	MOPS (pH 7 ) Natriumazetat (pH 5,2 ) EDTA (pH 8)	200 mmol/l 50 mmol/l 10 mmol/l
1 %iger MOPS-Agarose- Gelansatz	Agarose 10x MOPS-Puffer DEPC-H <sub>2</sub> O	1,1 g 11 ml 80,3 ml
4x Probenpuffer (nach Laemmli)	Tris (pH 7) Glycerol (pH 6,75) SDS 2-Mercaptoethanol Bromphenolblau	250 mmol/l 40 % 8 % 20 % 0,006 %
Proteinextraktionspuffer A	HEPES (pH 7,4) β-Glycerophosphat (fl.) EGTA DTT Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> Triton X-100 Glycerol (fl.) Leupeptin* PMSF* Aprotinin* * 2 Tabletten Complete™ für 100 ml Ansatz	20 mmol/l 50 mmol/l 2 mmol/l 1 mmol/l 1 mmol/l 1 % 10 % 2 μmol/l 400 μmol/l 10 U/ml

Proteinextraktionspuffer B	1x PBS Igepal CA-630 Sodium Deoxycholate SDS PMSF* Aprotenin* Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> * 2 Tabletten Complete™ für 50 ml Ansatz	1 % 0,5 % 0,1 % 570 µmol/l 10 U/ml 100 mol/l
5 ml 5 %iges SDS-PAA-Sammelgel	Rotiphorese® Gel 30 0,5 M Tris (pH 6,8) 20 % SDS Aqua dest. 10 % APS TEMED	835 µl 1,25 ml 25 µl 2,89 ml 50 µl 5 µl
15 ml 10 %iges SDS-PAA-Trenngel	Rotiphorese® Gel 30 1,5 M Tris (pH 8,8) 20 % SDS Aqua dest. 10 % APS TEMED	5 ml 3,75 ml 75 µl 6,175 ml 150 µl 15 µl
20x SSC (pH 7,0)	NaCl Natriumcitrat	3 mmol/l 0,3 mmol/l
20x SSPE	NaCl Natriumphosphat EDTA (pH 7,7) DEPC-H <sub>2</sub> O (pH 7,4)	3,6 mmol/l 0,2 mmol/l 0,02 mmol/l ad 1000 ml
TBS (pH 7,5)	Tris NaCl	20 mmol/l 150 mmol/l
TE-Puffer (pH 8,0)	Tris EDTA	10 mmol/l 1 mmol/l
Transferpuffer (pH 8,3)	Tris Glycin Methanol	25 mmol/l 150 mmol/l 10 %
VSMC-Medium	DMEM Glucose FCS Penicillin/Streptomycin 100x Natrium Pyruvat NEAA 100 X	500 ml 1,0 g/l 10 % 5 ml 100 mmol/l 5 ml

## 4.2 Zellkultur

### 4.2.1 Explantation glatter Gefäßmuskelzellen

Glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) wurden aus Aorten adulter männlicher Sprague-Dawley-Ratten gewonnen. Nach Entnahme konnten die Aorten für einige Minuten im VSMC-Medium gelagert werden, bis die weitere Präparation unter sterilen Bedingungen erfolgte. Nach Abziehen der Adventitia und Abschaben der Intima wurde die Media in ca. 2-4 mm<sup>2</sup> große Stückchen zerteilt. Die Gewebesuspension wurde in 35 mm-Kulturschalen überführt (ca. 10 Stückchen je Schale), nach kurzem Antrocknen mit VSMC-Medium überschichtet und bei 37°C und 5 % Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) im Brutschrank inkubiert. Um Ablösungen zu vermeiden, sollten die Schalen in den ersten 5 Tagen weder bewegt werden, noch sollte ein Medienwechsel durchgeführt werden. Danach wurde das Medium alle 3 Tage gewechselt. Die anhaftenden Gefäßmuskelzellen bildeten innerhalb von 7-10 Tagen einschichtige subkonfluente Zelllagen (**Abb. 6**) und konnten auf drei Zellkulturflaschen verteilt werden. Die Expression von  $\alpha$ -Aktin der glatten Muskelzelle wurde mit Hilfe eines FITC-gelabelten Anti- $\alpha$ -Aktin-Antikörpers mit Immunfluoreszenz nachgewiesen.



**Abb. 6: Subkonfluente Gefäßmuskelzellen in Kultur**

### 4.2.2 Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen

Die Stimulationsversuche wurden an konfluenten Zellen der 2. bis 4. Passage durchgeführt, die vor Stimulation für 24 Stunden serumfrei inkubiert worden waren. Die Stimulation der VSMC erfolgte mit 10 ng/ml (ca. 16 nM) PMA für 10 Minuten. Zur

Inhibition der MEK wurden die Zellen im Brutschrank für eine Stunde mit in DMSO gelöstem PD98059 (2, 5, 10, 25 oder 50  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert und anschließend wie oben beschrieben mit PMA stimuliert.

Die Negativkontrolle wurde nur mit Lösungsmittel (0,1 % DMSO) für eine Stunde inkubiert, während die Positivkontrolle mit dem Träger für eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit PMA für 10 Minuten stimuliert wurde.

#### **4.2.3 Toxizitätsprüfung von PD98059**

VSMC wurden zum Ausschluss zytotoxischer Effekte von PD98059 auf Gefäßzellen lichtmikroskopisch untersucht, und es wurden Zellzählungen nach Färbung mit Trypanblau durchgeführt.

##### Lichtmikroskopische Untersuchung:

Für die mikroskopische Untersuchung wurden für 24 Stunden mit 50  $\mu\text{M}$  PD98059 inkubierte Zellen mit den Zellen verglichen, die 24 Stunden mit dem oben genannten Lösungsmittel behandelt worden waren.

##### Zellzählung nach Trypanblaufärbung:

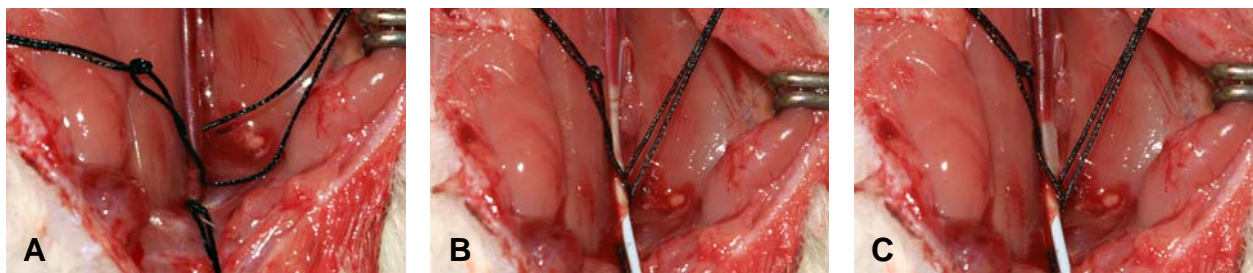
Das Medium wurde abgesaugt, und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Nach Lyse mit Trypsin-EDTA-Lösung für 3 Minuten bei 37°C wurden die Zellen mit VSMC-Medium gewaschen und je 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 50  $\mu\text{l}$  Trypanblau gemischt. Die gefärbten Zellen wurden in die Neubauer-Zählkammer gefüllt. Es wurden je vier große Quadrate ausgezählt, wobei die lebenden Zellen farblos und die toten blau erschienen. Vier große Quadrate entsprechen  $x \cdot 20.000$  Zellen/ml.

### **4.3 Rattenmodell**

#### **4.3.1 Ballonkatheterverletzung der A. carotis communis**

Männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden von der Tierzucht Schönwalde GmbH geliefert und bei konstanter Raumtemperatur (21°C) und Luftfeuchtigkeit (75 %) unter kontrolliertem Hell-Dunkel-Zyklus gehalten und erhielten Wasser und Futter ad libitum. Die Ballondilatation der A. carotis communis wurde bei Tieren mit einem Körpergewicht von 350-450 g durchgeführt.

Nach Anästhesie mit 100 mg/kgKG (S)-Ketamin und 13 mg/kgKG Xylazin wurde die rechte A. carotis communis bis zur Karotisbifurkation mit einer anatomischen Pinzette und einer Irispinzette dargestellt und freipräpariert (**Abb. 7A**). Die A. carotis externa wurde permanent und die A. carotis interna für die Zeit der Dilatation unterbunden. Anschließend wurde die A. carotis externa proximal der Ligatur mit einer Mikrofederschere eröffnet, die Inzisionsstelle mit einer Mikropinzette offen gehalten und der 2-F Fogarty Ballonkatheter durch die A. carotis externa in die A. carotis communis eingeführt (**Abb. 7B**). Der Katheter wurde bis zum Aortenbogen vorgeschoben und unter Füllung mit 0,02 ml Aqua dest. zurückgezogen (**Abb. 7C**). Nachdem diese Prozedur fünfmal durchgeführt worden war, wurde der Katheter entfernt, die A. carotis externa proximal der Inzision unterbunden und die A. carotis interna wieder eröffnet. Die Tiere wurden entweder mit Wirkstoff oder mit dem Träger behandelt, und das Operationsgebiet wurde mit Parma-Hand® Seide 4/0 in Einzelknopfnahnt verschlossen. Als Kontrolle diente die nicht operierte linke A. carotis communis.



**Abb. 7** Rechte A. carotis communis mit Bifurkation vor Inzision (A), bei Vorschieben des entleerten (B) und bei Zurückziehen des gefüllten Katheters (C)

Es wurden 10 Minuten, 1 Stunde, 1 Tag, 2, 3, 5 oder 7 Tage nach der Ballondilatation Gefäße entnommen. Dabei wurde die A. carotis communis vorsichtig, ohne das Gefäß zu dehnen, dargestellt und entnommen. Anschließend wurden die Gefäße in flüssigem Stickstoff gefroren und danach bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.3.2 Pharmakologische Behandlung

PD98059 wurde in DMSO aufgelöst (50 mM) und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. 30-prozentiges *Pluronic Gel* wurde durch Zugabe von Aqua dest. unter kontinuierlichem Rühren über 48 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  hergestellt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Unmittelbar vor Behandlung wurde durch Zugabe von in DMSO gelöstem PD98059 oder DMSO entweder der Wirkstoff mit 50  $\mu\text{M}$  PD98059 und 0,1 % DMSO oder der

Träger mit 0,1 % DMSO hergestellt. Behandelt wurde jeweils mit 0,2 ml Gel, das direkt auf die operierte A. carotis communis gegeben wurde.

#### 4.4 Proteinbiochemische Untersuchungen

##### 4.4.1 Extraktion von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen aus Zellkulturzellen und Aa. carotides communes

###### Prinzip:

Die Extraktion von zytoplasmatischen Proteinen erfolgte modifiziert nach einer publizierten Methode (Hu et al., 1997) und basiert auf einer mechanischen Homogenisierung mit Zellmembranauflösung durch Detergenzien in hypotonischem Puffer. Die Extraktion von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen, modifiziert nach den Empfehlungen von Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc, 2006), basiert auf Zell- und Kernmembranauflösung durch Detergenzien.

###### Durchführung bei kultivierten Zellen:

Zunächst wurde das Zellkulturmedium der konfluenten Zellen abgesaugt. Nach Zugabe von 4°C kaltem 1x PBS wurden die Zellen mit einem *Cell Scraper* von der Kulturflasche abgeschabt. Die Zellen wurden in einem ersten Schritt in 15-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und für 10 Minuten bei 900 rpm und 4°C zentrifugiert.

In einem zweiten Schritt wurde das Zellpellet in 0,5 ml Proteinextraktionspuffer aufgenommen, im *Ultra-Turrax T25* homogenisiert, für 15 Minuten auf Eis inkubiert und dann für 30 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Zur Extraktion der zytoplasmatischen Proteine wurde der Proteinextraktionspuffer A, zur Extraktion der zytoplasmatischen und nukleären Proteine der Proteinextraktionspuffer B verwendet. Der Überstand mit den Proteinen wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

###### Durchführung bei Aa. carotides communes:

Zu einer gefrorenen A. carotis communis wurde 0,5 ml Proteinextraktionspuffer gegeben. Die Gefäße wurden im *Ultra-Turrax T25* homogenisiert, und anschließend wurde wie beim 2. Schritt zur Extraktion von Zellkulturproteinen verfahren.

#### 4.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

##### Prinzip:

Die Proteinbestimmung mit dem *Bio-Rad DC Protein Assay* basiert auf der Methode nach Lowry und misst die Proteinkonzentration gelöster Proteine in Anwesenheit von Detergenzien. Die Protein-Farbstoff-Bindung entsteht in zwei Schritten und hat ein Absorptionsmaximum bei 750 nm und ein Absorptionsminimum bei 405 nm.

Da die Farbauscheidung nur in einem beschränkten Konzentrationsbereich linear ist, sollte bei jedem Assay zunächst eine Proteinstandardkurve erstellt werden.

##### Durchführung:

Für die Proteinstandardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) mit den Konzentrationen 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 und 3,2 mg/ml hergestellt. Auf einer Mikrotiterplatte wurden je 25 µl AS-Reagenz (A-Reagenz:S-Reagenz im Verhältnis 50:1) mit 5 µl Probe (BSA-Standard oder zu messende Proteinprobe) zusammenpipettiert und anschließend jeweils 200 µl B-Reagenz dazugegeben. Nach vorsichtigem Mischen und 15 Minuten Inkubation wurde die Absorption mit dem *MRX Microplate-Reader* bei 750 nm gemessen. Mit dem *Revelation-Programm 3.0* konnten Extinktions-Konzentrations-Kurven erstellt und somit die Messwerte ausgewertet werden. Jeder Standard und jede Proteinprobe wurde dreimal gemessen und anschließend der Mittelwert bestimmt.

#### 4.4.3 Aufkonzentration von Proteinproben

##### Prinzip:

Die anisotrope, hydrophile Membran des *Microcon<sup>®</sup> Microcentrators Model 30* bindet Proteine bei Zentrifugation locker und reversibel. Die Porengröße der Membran bestimmt die Molmassengrenze (MWCO, *molecular weight cut-off*), die bei dem verwendeten Modell 30 kDa beträgt. Laut Hersteller werden bei diesem Modell Proteine mit einer Größe von 25 kDa bis 67 kDa zu 95 % zurückgehalten.

##### Durchführung:

Proteinproben mit einer Konzentration von unter 0,5 mg/ml wurden für bessere Ergebnisse mit *Microcon<sup>®</sup> Microcentrators Model 30* aufkonzentriert. Dazu wurde das Probenreservoir in ein Eppendorfgefäß gesteckt, mit maximal 0,5 ml Probe gefüllt

und für 20 Minuten bei 3.000 rpm und 4°C zentrifugiert, um die Konzentration auf etwa das 50fache zu erhöhen. Um die Probe weniger stark aufzukonzentrieren, musste eine entsprechend kürzere Zeit gewählt werden. Anschließend wurde das Filtrat verworfen und das Probenreservoir umgekehrt in ein neues Eppendorfggefäß gesteckt. Durch das erneute Zentrifugieren für 3 Minuten bei 900 rpm und 4°C wurden die locker gebundenen Proteine gewonnen.

#### 4.4.4 Western Blot

##### Prinzip:

Der Western Blot dient dem Nachweis spezifischer Proteine. Proteinproben werden auf SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gel aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulosefilter geblottet. Dieser Filter wird zunächst mit einem spezifischen Primärantikörper gegen das nachzuweisende Protein inkubiert. Anschließend bindet bei einem zweiten Inkubationsschritt ein mit Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) gekoppelter Sekundärantikörper an den spezifischen Primärantikörper. Die HRP ist ein Enzym, das eine Chemolumineszenzreaktion katalysiert, bei der der im *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* enthaltene Farbstoff Luminol in Gegenwart von Wasserstoffionen oxydiert und in einen angeregten Zustand überführt wird. Durch Lichtemission erreicht das Luminol wieder seinen Grundzustand und damit ein niedrigeres Energieniveau. Diese Autoradiographie führt zu einer Schwärzung auf dem Röntgenfilm.

##### Durchführung:

##### Herstellung des Gels:

Die Gelplatten wurden vor Gebrauch mit NaOH, 70-prozentigem Ethanol und Aqua dest. gereinigt, und der Gelsandwich, bestehend aus zwei Glasplatten und den dazwischenliegenden 1 mm dünnen Spacern, wurde zusammengebaut. Das Gel bestand aus einem Trenn- und einem Sammelgel.

Zunächst wurden 7,5 ml des 10-prozentigen SDS-PAA-Trenngels bis 2 mm unterhalb des Kamms eingefüllt. Um eine gleichmäßige Gelkante und ein schnelles Auspolymerisieren unter Sauerstoffausschluss zu gewährleisten, wurde sofort nach Gießen des Trenngels dieses mit 1:4-Isopropanol-H<sub>2</sub>O-Gemisch überschichtet. Nach ca. 10 Minuten war die Polymerisation abgeschlossen, das Isopropanol-H<sub>2</sub>O-Gemisch konnte abgegossen werden. Nun wurden 2,5 ml des 5-prozentigen SDS-PAA-



Sammalgels ebenfalls mit einer Spritze und Kanüle blasenfrei bis 3 mm unterhalb des Randes eingefüllt und sofort der Kamm hinter die Spacer geklemmt.

Luftdicht verpackt mit beigelegtem feuchten Filterpapier zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit können die Gele bei 4°C bis zu vier Wochen gelagert werden.

#### Probenaufbereitung:

Die Proteinproben sowie die Molekulargewichtsmarker wurden im Verhältnis 1:4 mit reduzierendem SDS-Probenpuffer nach Laemmli (Laemmli, 1970) verdünnt. Dabei sollte die Proteinmenge pro Geltasche (ca. 20 µl Ansatz) nicht unter 10 µg liegen, um die Nachweisgrenze der zu bestimmenden Proteine nicht zu unterschreiten. Nach Inkubation der Proben für 3 Minuten bei 95°C zur Degradation der Proteine wurden diese ohne weitere Behandlung auf ein Gel aufgetragen.

#### Elektrophorese:

Bei Verwendung der *Mini Protean II Cell*-Elektrophoresekammer können zwei Gele mit je 10 Taschen, d. h. maximal 8 Proben und 2 Molekulargewichtsmarker, bei Verwendung der *Biometra-Multigel-G44*-Elektrophoresekammer zwei Gele mit je 24 Taschen, d. h. maximal 22 Proben und 2 Molekulargewichtsmarker, beladen werden. Es wurden folgende Molekulargewichtsmarker verwendet: *Albumin-egg-Standard* mit einer Bande bei 45 kDa und *BenchMark™ Prestained Protein Ladder* mit Banden bei 182,9, 113,7, 80,9, 63,8, 49,5, 37,4, 26,0, 14,9 und 8,4 kDa.

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer gestellt und ca. 800 ml Laufpuffer, bis der Puffer in die Taschen lief, eingefüllt. Nach Entfernung aller Luftblasen wurden die Geltaschen mit 20 µl Ansatz mit Gelladertips beladen. Die Proteinproben und Standards wurden für 80-100 Minuten bei 120 V laufen gelassen, bis die blaue Lauffront den Unterrand des Trenngels erreichte.

#### Proteintransfer auf Nitrozellulosefilter:

5 Schichten 3 MM *Whatman-Filterpapier*, zugeschnitten auf die Größe des Trenngels, wurden nach Tränken in Transferpuffer auf die Anode der *Fastblot-B43*-Apparatur gelegt. Auf die Filterpapiere wurde die gut mit Transferpuffer angefeuchtete *Protran Nitrozellulose Transfermembran* gelegt. Der Gelsandwich wurde aus der Elektrophoresekammer ausgebaut und in einer Wanne mit Transferpuffer so auseinandergelassen, dass das Gel an der großen Glasplatte kleben blieb. Das

Sammelgel wurde mit einem Skalpell entfernt. Anschließend wurde das Trenngel mit Hilfe eines Spatels auf die Transfermembran gelegt, 5 Schichten von in Transferpuffer getränktes Filterpapier auf das Gel gelegt und überschüssiger Transferpuffer entfernt. Beim Aufbau musste darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen zwischen den Schichten befanden. Diese konnten gegebenenfalls mit einer Pipette herausgerollt werden. Das Gerät wurde geschlossen, mit 1 kg Gewicht beschwert, die Wasserkühlung eingeschaltet und mit einer Stromstärke von maximal 5 mA/cm<sup>2</sup> angestellt, wobei eine Leistung von 10 W nicht überschritten wurde. Die Blotzeit betrug 75 Minuten.

#### Färben mit *Ponceau-S*-Reagenz:

Nach dem Abbau des Blots wurde die Nitrozellulosemembran mit Aqua dest. gespült und für 30 Sekunden mit *Ponceau-S*-Reagenz gefärbt. Nach Abspülen der überschüssigen Farbe erkannte man die Bandenmuster der Proteinproben und der Standards. Diese Färbung diente nur als Kontrolle für eine erfolgreiche Elektrophorese und einen erfolgreichen Blot, ließ jedoch keine Aussagen über eine gleichmäßige Beladung zu. Die Proteinseite und die Auftragstellen wurden mit einem Bleistift markiert und die Banden der Molekulargewichtsmarker abgeschnitten. Sie dienten nach der Lumineszenzreaktion zum Größenvergleich mit den nachgewiesenen Proteinen.

#### Blockade der unspezifischen Proteinbindungen und Waschen:

Zur Sättigung der unspezifischen Proteinbindungen wurde die Membran mit 6 % *Blotting Grade Blocker Non-fat Dry Milk* in TBS für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttlergerät inkubiert.

Die Membran wurde dreimal mit 0,1 % *Tween-20* in TBS für jeweils 5 Minuten und anschließend dreimal mit TBS für jeweils 5 Minuten auf einem Schüttelgerät gewaschen.

#### Inkubation mit Primär-Antikörper und Waschen:

Für den Nachweis von ERK1 (p44)-Protein und ERK2 (p42)-Protein wurde *p44/42 MAP Kinase Antibody* in einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet. Die Konzentrationen der übrigen benutzten Antikörper sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Der Primärantikörper wurde mit 0,6 % *Blotting Grade Blocker Non-fat Dry Milk* in TBS bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttelgerät lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Waschschritte

wie oben beschrieben wiederholt, um nicht gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen.

Primärantikörper	Konzentration
Actin polyclonal goat-Antibody	0,4 µg/ml
Bax polyclonal rabbit-Antibody	0,1 µg/ml
Bcl-2 polyclonal mouse-Antibody	1,0 µg/ml
Ets-1 monoclonal mouse-Antibody	0,1 µg/ml
MKP-1 polyclonal rabbit-Antibody	1,0 µg/ml
MKP-3 polyclonal goat-Antibody	0,4 µg/ml
PCNA monoclonal mouse-Antibody	0,2 µg/ml
Phospho-p44/42 MAP Kinase E 10 monoclonal mouse-Antibody	1,0 µg/ml
Phospho-p44/42 MAP Kinase polyclonal rabbit-Antibody	1,0 µg/ml
α-Tubulin monoclonal mouse-Antibody	0,4 µg/ml

**Tab. 1: Konzentrationen der Primärantikörper**

Inkubation mit dem Sekundärantikörper und Waschen:

Da der *p44/42 MAP Kinase Antibody* ein polyklonaler Ratten-Antikörper ist, wurde als Sekundärantikörper der *Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody* in einer Konzentration von 0,4 µg/ml verwendet. Die Konzentrationen der übrigen benutzten Antikörper sind in der Tabelle 2 aufgeführt. Der Sekundärantikörper wurde mit 0,6 % *Blotting Grade Blocker Non-fat Dry Milk* in TBS bei Raumtemperatur für 45 Minuten auf einem Schüttelgerät lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Waschschritte wie oben beschrieben wiederholt, um nicht gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen.

Sekundärantikörper	Konzentration
Anti-goat, HRP-linked Antibody	0,16 µg/ml
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	0,16 µg/ml

**Tab. 2: Konzentrationen der Sekundärantikörper**

Chemolumineszenzdetektionsreaktion:

Lösung A und Lösung B des *SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate* wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die vorher luftgetrocknete Nitrozellulosemembran mit dem Substrat für 5 Minuten lichtgeschützt auf einem Schüttelgerät inkubiert. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran zum Trocknen auf Filterpapier gelegt und durch Folie geschützt in eine Röntgenkassette gelegt. In der

Dunkelkammer wurde ein *Hyperfilm<sup>TM</sup> MP* eingelegt und für 10 Sekunden bis zu 1 Stunde, je nach Intensität der Chemolumineszenzreaktion, exponiert.

Die Nitrozellulosemembran sollte anschließend gewaschen werden, um verbliebenes Chemolumineszenzsubstrat, das die Proteine angreifen kann, zu entfernen.

Die Membranen können lichtgeschützt und luftdicht abgeschlossen bei -20°C bis zu einem halben Jahr aufbewahrt werden, ohne dass die Nachweisbarkeit der Proteine erkennbar abnimmt.

#### Sättigen mit Chemolumineszenzsubstrat:

Lösung A und Lösung B des *SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate* wurden wie oben beschrieben im Verhältnis 1:1 gemischt und mit der Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C auf einem Schüttelgerät inkubiert. Die Nitrozellulosemembran sollte anschließend gewaschen werden. Eine erneute Detektion nach Sättigen und damit Aufbrauchen der Meerrettichperoxidase kann nur erfolgreich sein, wenn der Antikörper, der danach mit der Membran inkubiert werden soll, an einem anderen Epitop bindet. Anderenfalls muss die Nitrozellulosemembran gestrippt werden, um die gebundenen Antikörper zu entfernen.

#### Densitometrische Auswertung:

Für die densitometrische Auswertung wurden die auf dem *Hyperfilm<sup>TM</sup> MP* erscheinenden Banden eingescannt, das Dateiformat in *bitmap* konvertiert und anschließend mit der *TINA*-Software ausgewertet.

#### Statistische Analyse:

Die Daten wurden mit einem zweiseitigen Student's t-Test für unverbundene Stichproben analysiert. Bei einem Wert für die statistische Signifikanz ( $p$ ) kleiner als 0,05 ( $p < 0,05$ ) wird Signifikanz angenommen. Ein hoch signifikantes Testergebnis liegt vor, wenn der  $p$ -Wert kleiner als 0,01 ist ( $p < 0,01$ ).

## 4.5 Molekularbiologische Untersuchungen

### 4.5.1 Extraktion der RNA aus kultivierten Zellen

#### Prinzip:

Nach dem *RNeasy*-Protokoll von Qiagen werden die Zellen unter denaturierenden Bedingungen lysiert und nach Inaktivierung von RNasen wird durch das selektive Bindungsvermögen von RNA an eine Silikongelmembran intakte RNA extrahiert.

#### Durchführung:

Zunächst wurde das Zellkulturmedium der konfluenten Zellen abgesaugt. Nach Zugabe des Lysepuffers wurde die RNA durch mehrmaliges Aufziehen in eine Tuberkulinspritze homogenisiert und anschließend mit 70-prozentigem Ethanol auf die *RNeasy Spin Column* gegeben. Durch verschiedene Waschschriffe wurden andere Zellbestandteile mittels Zentrifugation entfernt, während die Säule die gesamte RNA band. Die RNA wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert.

### 4.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

#### Prinzip:

Die RNA-Konzentration wird durch die Messung der optischen Dichte (O.D.) bestimmt.

#### Durchführung:

Die RNA-Proben wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Absorption wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm für Ribonukleinsäure und für 280 nm für Proteine gemessen. Der Quotient  $O.D._{260\text{ nm}}/O.D._{280\text{ nm}}$  gibt die Reinheit der RNA an, wobei der Wert zwischen 1,65 und 2,20 liegen sollte.

Die RNA-Konzentration (C) wird nach folgender Formel berechnet:

$$C_{\text{RNA}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (O.D._{260\text{ nm}} \cdot \text{Absorptionsfaktor} \cdot \text{Verdünnung}) / 1000$$

(Absorptionsfaktor für RNA: 40)

### 4.5.3 Northern Blot

#### Prinzip:

Die Methode, die nach dem Protokoll von Amersham durchgeführt wurde, dient dem Nachweis spezifischer mRNA-Spezies. Nach elektrophoretischer Auftrennung von RNA

auf einem denaturierendem MOPS-Agarosegel wird die RNA über Kapillarkräfte auf eine flexible Nylonmembran übertragen, immobilisiert und anschließend durch Hybridisierung mit spezifischen radioaktiv markierten Gensonden die gewünschte mRNA nachgewiesen. Durch Autoradiographie können die spezifischen mRNA-Signale im Phosphorimager sichtbar gemacht werden.

#### Durchführung:

##### Herstellung des Gels:

Gelschlitten und Kamm wurden zur Eliminierung von RNAsen mit *RNase-AWAY* gewaschen und mit H<sub>2</sub>O abgespült. Der Gelschlitten wurde mit Plastikband umklebt und der Kamm eingesetzt. Der 1-prozentige MOPS-Agarosegelansatz wurde aufgekocht, auf einem Magnetrührer auf ca. 50°C abgekühlt und nach Zugabe von 18,7 ml 37-prozentigem Formaldehyd in den Gelschlitten eingegossen.

##### RNA-Aufbereitung:

Es wurden pro Auftragstelle 10 µg RNA eingesetzt. Zur Fällung der RNA wurde zur 10 µg RNA-Probe 50 µl Aqua dest., 5 µl Natriumazetatelösung (pH 5,2) und 50 µl Isopropanol gegeben. Die Proben wurden anschließend für 1 Stunde bei -80°C gelagert, dann für 10 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und dekantiert. Nach Waschen mit kaltem 70-prozentigem Ethanol wurde erneut zentrifugiert und dekantiert. Die Pellets wurden in 6 µl Aqua dest. aufgenommen.

Zur Denaturierung wurden 12,5 µl deionisiertes Formamid, 2,5 µl 10x MOPS-Puffer, 8 µl 37-prozentiges Formaldehyd und 0,1 µl Ethidiumbromid zur RNA-Probe gegeben. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 65°C inkubiert und danach kurz auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 2,5 µl Bromphenolblau in Glycerol wurden die Proben gemischt, kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen.

##### Elektrophorese:

1x MOPS diente als Elektrophoresepuffer. Das Gel lief bei 50-60 V, bis das Bromphenolblau des Gelbeladungspuffers zwei Drittel der Gelstrecke zurückgelegt hatte. Nach Waschen des Gels für 15 Minuten in DEPC-Wasser zur Entfernung der Formaldehydreste wurde es unter UV-Licht photographiert, um die durch das Ethidiumbromid gefärbten Banden dazustellen.

### Transfer auf die Nylonmembran:

Ein Plastikgefäß wurde mit 20x SSC gefüllt und eine Glasplatte so darüber gelegt, dass ein in 20x SSC getränktes und auf die Glasplatte platziertes 3 MM Whatman-Filterpapier auf beiden Seiten in das 20x SSC hineinragt. Eine Hybond<sup>TM</sup>-N Nylonmembran wurde auf Gelgröße zugeschnitten, in Wasser und dann für 5 Minuten in 20x SSC eingeweicht. Der Blot wurde nun in folgender Reihenfolge aufgebaut: Das Gel wurde in die Mitte der mit dem Filterpapier belegten Platte gelegt und seitlich mit Parafilm umklebt, darauf kam die Nylonmembran, 3 Schichten Filterpapier mit 20x SSC angefeuchtet, 3 Schichten trockenes Filterpapier und zum Schluss 10 cm Zellstoff und eine mit 750 g beschwerte Glasplatte. Die Transferdauer betrug ca. 12 Stunden.

Nach dem Abbau wurde die Membran kurz in 2x SSC gewaschen und unter UV-Licht ein Membranfoto gemacht. Zum Fixieren der RNA-Bindung wurde die Membran für 2 Stunden bei 80°C gebacken.

### Isotopenmarkierung der DNA-Sonde:

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonde wurde mittels Rediprime<sup>TM</sup> II Random Labelling System durchgeführt. 25 ng DNA-Sonde wurden mit TE-Puffer auf 45 µl aufgefüllt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Probe wurde für 5 Minuten auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert und dann zum Labelling-Mix gegeben. 5 µl radioaktives [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP wurden dazugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde über eine Sephadex G-50 Quick Spin<sup>TM</sup> Column gereinigt.

### Konventionelle Hybridisierung:

Es wurden die Membran in eine Hybridisierungsröhre gelegt, 100 µl der für 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturierte DNA aus Lachssperma mit der Hybridisierungslösung gemischt und die Lösung in die Röhre gegeben. Für eine Stunde wurde bei 42°C prähybridisiert, anschließend die radioaktive Sonde für 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert und zur prähybridisierten Membran pipettiert. Die Hybridisierung wurde bei 42°C über Nacht durchgeführt.

### Waschen und Exposition:

Die hybridisierte Membran musste anschließend zweimal für je 15 Minuten mit 2x SSC + 0,1 % SDS bei Raumtemperatur und ebenfalls zweimal für je 15 Minuten mit 1x SSC

+ 0,1 % SDS bei 60°C gewaschen werden, bis der Radioaktivitätszähler noch eine Zerfallsrate von ca. 40 cps (*counts pro second*) anzeigte. Die Membran wurde in Plastikfolie eingewickelt und zur Exposition für eine Stunde auf der Phosphorimager-Platte bei Raumtemperatur belassen.

## 4.6 Immunhistochemische Analysen

### 4.6.1 Präparation der Gefäße

Die Gefäße wurden nach Entnahme sofort für 24 Stunden in Formaldehydlösung gegeben und konnten dann in 80-prozentiger Ethanollösung für wenige Wochen aufbewahrt werden. Nach Entwässerung wurden sie in 4 % Paraformaldehyd/PBS fixiert. Mit dem Rotationsmikrotom wurden aus dem mittleren Bereich 4,5 µm dicke Schnitte angefertigt.

### 4.6.2 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemische Färbung wurde mit dem *mouse UniTect<sup>TM</sup> ABC kit* nach dem Protokoll von Calbiochem durchgeführt. Nach Deparaffinisierung und Rehydrierung wurde die endogene Peroxidaseaktivität, die zu unspezifischen Immunfärbungen führt, durch Inkubation mit 0,1 % Wasserstoffperoxid für 30 Minuten reduziert. Für den Nachweis von PCNA wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper *PCNA monoclonal mouse-Antibody* in einer Konzentration von 2 µg/ml bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach verschiedenen Waschschritten wurde der biotinylierte Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur zu den Schnitten gegeben, und anschließend nach erneutem Waschen wurden die Antikörperkomplexe durch enzymaktiviertes Avidin sichtbar gemacht. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung

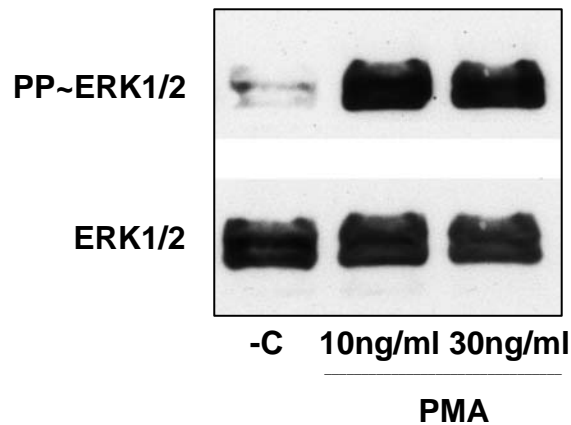
#### 5.1.1 Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung in vitro

Glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) wurden mit dem Tumorpromoter Phorbol ester (PMA) stimuliert. Diese Stimulierung führt durch Aktivierung von Isoformen der Proteinkinase C und nachfolgend Raf1 und MEK1/2 zu einer Phosphorylierung des T–E–Y-Motivs der ERK1/2.

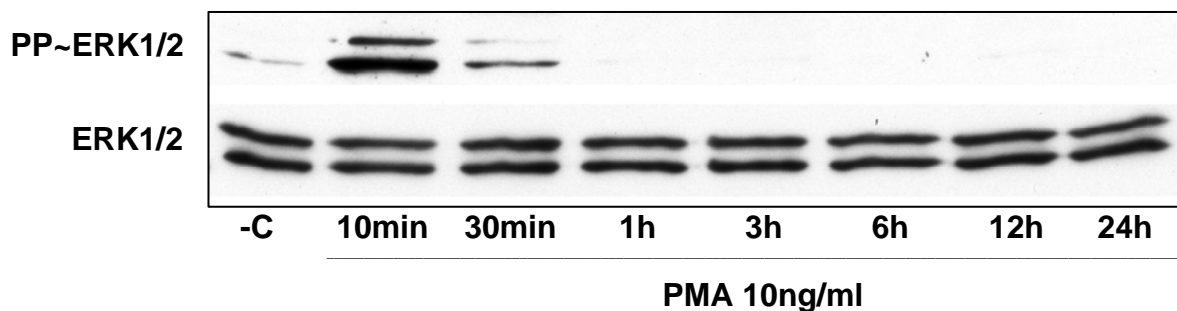
Die Western-Blot-Analysen der ERK1/2-Proteinexpression und ERK1/2-Phosphorylierung wurden nach der Extraktion zytosolischer Proteine aus VSMC-Lysat durchgeführt. Nach elektrophoretischer Auftrennung von je 13 µg Protein konnten - mittels polyklonalem *p44/42 MAP Kinase rat-Antibody* und monoklonalem *Phospho-p44/42 MAP Kinase mouse-Antibody* - Banden bei 44 kDa für ERK1-Protein (bzw. doppelt-phosphoryliertes ERK1-Protein) und bei 42 kDa für ERK2-Protein (bzw. doppelt-phosphoryliertes ERK2-Protein) detektiert werden. In den Legenden der Abbildungen wird die Bezeichnung ERK1/2 für ERK1/2-Protein und PP~ERK1/2 für doppelt-phosphoryliertes ERK1/2-Protein verwendet.

Die Signalstärke der Banden von phosphorylierter ERK1/2 war bei einer Aktivierung von VSMC durch 10 bzw. 30 ng/ml PMA nach 10 Minuten nicht unterschiedlich. Alle folgenden Stimulationsversuche in vitro wurden daher mit 10 ng/ml PMA durchgeführt. Auf die ERK1/2-Proteinexpression hatte PMA im Zellkulturversuch keinen Einfluss (**Abb. 8**).

Bei der Analyse der phosphorylierten ERK1/2 zu den Zeitpunkten 10 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden, 6 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden nach Stimulation der VSMC mit 10 ng/ml PMA zeigte sich ein maximales Signal der Banden nach 10 Minuten. Nach 30 Minuten war noch ein deutliches Signal vorhanden, das nach 1 Stunde und im weiteren Verlauf vollständig verschwand. Die ERK1/2-Proteinexpression blieb konstant (**Abb. 9**).



**Abb. 8:** Western-Blot-Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung und ERK1/2-Proteinexpression in vitro nach Stimulation mit 10 und 30 ng/ml PMA. -C: Negativkontrolle (nicht stimulierte VSMC).



**Abb. 9:** Western-Blot-Analyse des Zeitverlaufs der ERK1/2-Phosphorylierung und ERK1/2-Proteinexpression in vitro nach Stimulation mit 10 ng/ml PMA. -C: Negativkontrolle (nicht stimulierte VSMC).

### 5.1.2 Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung in vivo

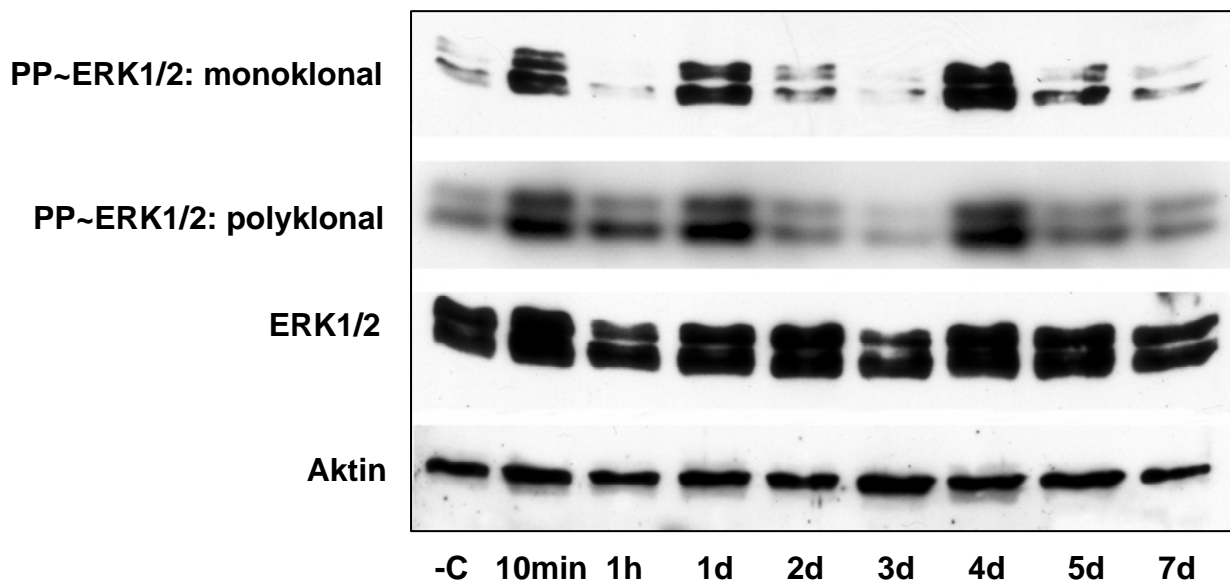
Es wurde die MAPK-Kaskade und damit verbundenen die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen der A. carotis communis der Ratte durch Ballonkatheterverletzung stimuliert.

Die Western-Blot-Analysen der ERK1/2-Phosphorylierung und ERK1/2-Proteinexpression wurden nach der Extraktion zytosolischer Proteine aus Gefäßlysat durchgeführt.

Nach elektrophoretischer Auftrennung von je 20 µg Protein wurde mittels monoklonalem *Phospho-p44/42 MAP Kinase mouse-Antibody* ein triphasiges Muster der ERK1/2-Phosphorylierung detektiert. Nach schneller Phosphorylierung 10 Minuten nach Ballonkatheterverletzung war 1 Stunde später kein Signal einer Phosphorylierung mehr zu erkennen. Das Phosphorylierungssignal kehrte am ersten Tag nach Verletzung

deutlich zurück und verschwand am Tag 3 nahezu vollständig, um am Tag 4 erneut deutlich aufzutauchen. Erst am Tag 7 nahm das Signal wieder auf basale Werte ab. Dasselbe Aktivierungsmuster erschien bei Detektion mittels polyklonalem *Phospho-p44/42 MAP Kinase rabbit-Antibody*. Da der monoklonale Antikörper ein schärferes Bild zeigte, wurden alle weiteren Versuche mit diesem Antikörper durchgeführt. Die Detektion mit polyklonalem *p44/42 MAP Kinase rat-Antibody* zeigte am Tag 1 und Tag 3 einen leichten Abfall der ERK1/2-Proteinexpression.

Aktin diente zur Kontrolle der gleichmäßigen Gelbeladung. Die Western Blots wurden nach Sättigung mit Chemolumineszenzsubstrat mit *Actin polyclonal goat-Antibody* inkubiert. Es zeigten sich gleichmäßige Banden bei 43 kDa (**Abb. 10**).



**Abb. 10:** Western-Blot-Analyse des Zeitverlaufs der ERK1/2-Phosphorylierung und ERK1/2-Proteinexpression in vivo nach Ballonkatheterverletzung. Aktin dient als Beladungskontrolle. -C: Negativkontrolle (nicht operierte linke A. carotis communis).

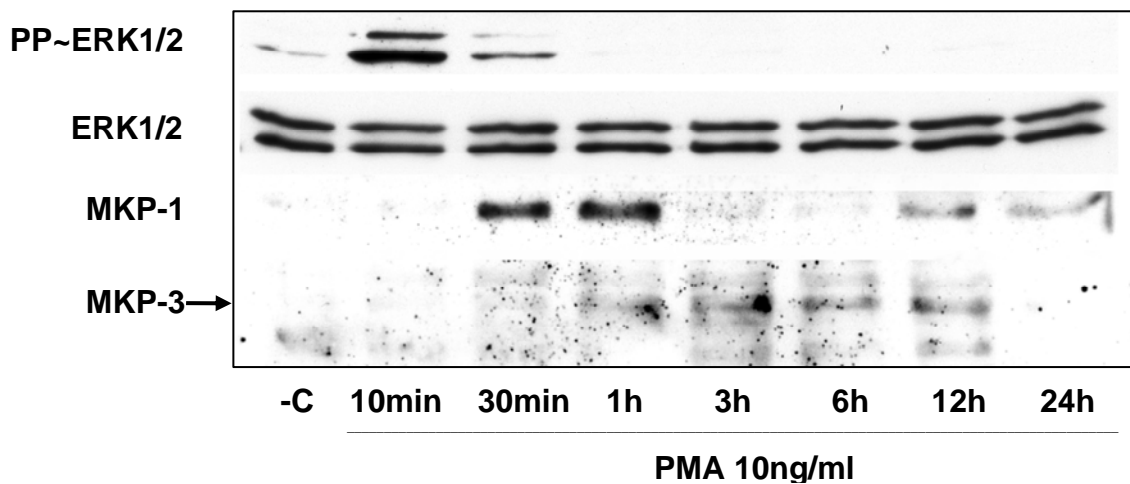
## 5.2 Induktion der Expression der MAPK-Phosphatasen MKP-1 und MKP-3

### 5.2.1 Induktion der Expression der MAPK-Phosphatasen MKP-1 und MKP-3 in vitro

Zur Untersuchung des Zeitverlaufs der MKP-1- und MKP-3-Proteinexpression in vitro wurden die Western Blots des VSMC-Lysats mit Chemolumineszenzsubstrat gesättigt und die Blots anschließend mit *MKP-1 polyclonal rabbit-Antibody* und mit *MKP-3 polyclonal goat-Antibody* inkubiert.

Nach 30 Minuten und nach 1 Stunde konnte in vitro eine deutliche MKP-1-Proteinexpression mit Banden bei 38 kDa festgestellt werden. Nachdem 3 und 6 Stunden nach Stimulation kein MKP-1-Protein zu detektieren war, erschien nach 12 und 24 Stunden erneut eine, wenn auch wesentlich schwächere, Bande.

Eine MKP-3-Proteinexpression mit einer Bande bei 42 kDa konnte erst nach 3 Stunden eindeutig detektiert werden und war bis zu 12 Stunden nachweisbar (**Abb. 11**).

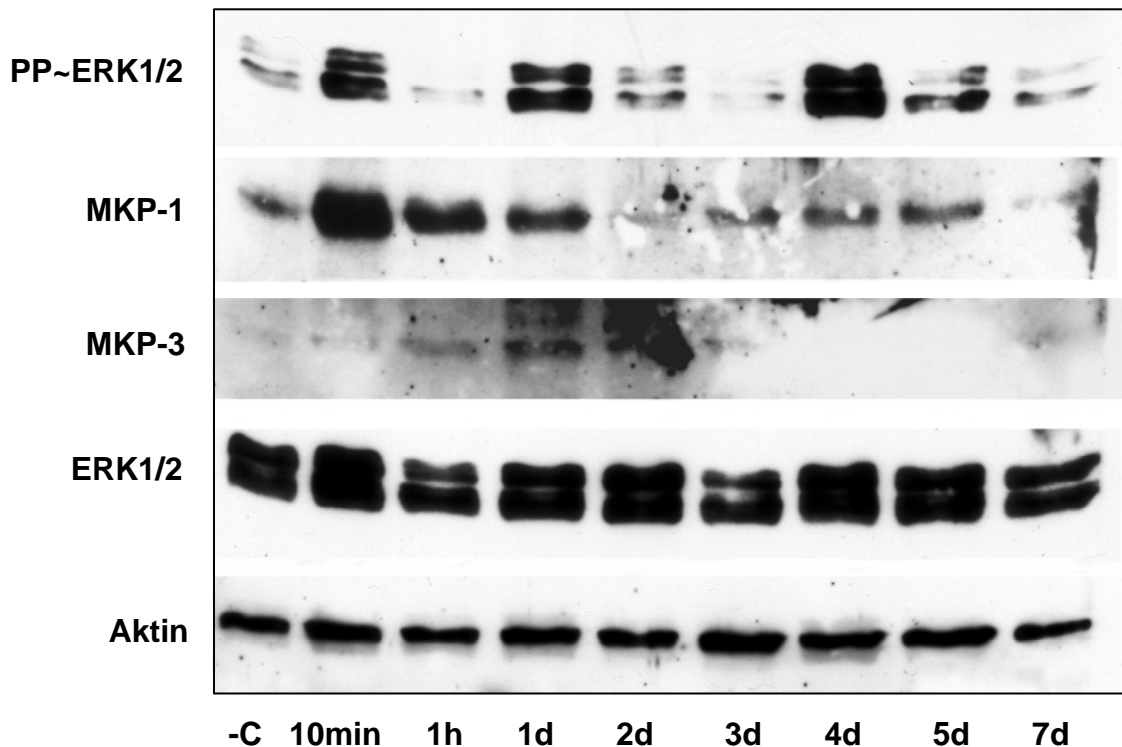


**Abb. 11:** Western-Blot-Analyse des Zeitverlaufs der MKP-1- und MKP-3-Proteinexpression in vitro nach Stimulation mit 10 ng/ml PMA. Der Pfeil markiert die MKP-3-Bande. -C: Negativkontrolle (nicht stimulierte VSMC).

### 5.2.2 Induktion der Expression der MAPK-Phosphatasen MKP-1 und MKP-3 in vivo

Zur Untersuchung des Zeitverlaufs der MKP-1- und MKP-3-Proteinexpression in vivo wurden die Western Blots des Gefäßlysats mit Chemolumineszenzsubstrat gesättigt und die Blots anschließend mit *MKP-1 polyclonal rabbit-Antibody* und mit *MKP-3 polyclonal goat-Antibody* inkubiert.

MKP-1, das in vivo eine deutliche basale Proteinexpression besitzt, zeigte eine maximale Expression nach 10 Minuten mit einem kontinuierlichen Abfall bis auf Ausgangswerte nach 2 Tagen. Am Tag 3 bis 5 war erneut ein Intensitätsanstieg der MKP-1-Banden zu detektieren, der jedoch schwächer war als der der frühen MKP-1-Expression. Für MKP-3 war eine geringgradige basale Proteinexpression zu erkennen, die 1 Stunde nach Ballonkatheterverletzung und am Tag 1 und 2 deutlich zunahm. Am Tag 3 und später waren keine Banden für MKP-3 mehr zu detektieren (**Abb. 12**).



**Abb. 12:** Western-Blot-Analyse des Zeitverlaufs der MKP-1- und MKP-3-Proteinexpression in vivo nach Ballonkatheterverletzung. Aktin dient als Beladungskontrolle. -C: Negativkontrolle (nicht operierte linke A. carotis communis).

### 5.3 Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung durch PD98059

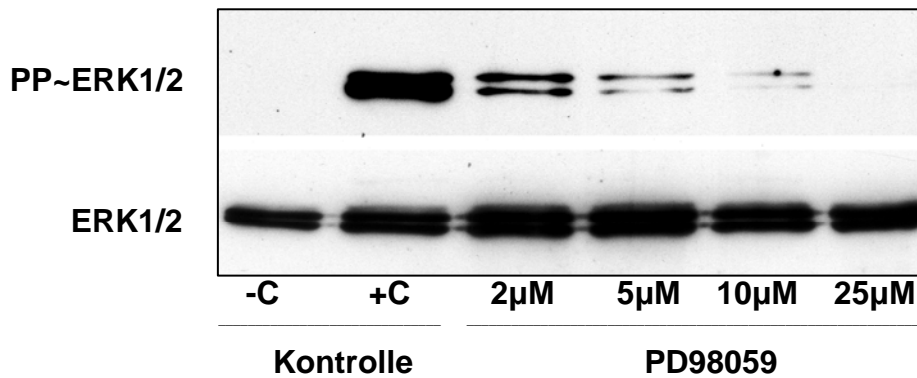
#### 5.3.1 Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung durch PD98059 in vitro

Zum Nachweis der dosisabhängigen Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung in VSMC durch PD98059 wurden die Zellen vor 10-minütiger Stimulation mit 10 ng/ml PMA für eine Stunde mit PD98059 (2, 5, 10 oder 25  $\mu$ M gelöst in DMSO) inkubiert.

Nach Extraktion zytosolischer Proteine und Gelelektrophorese mit Auftrennung von je 12  $\mu$ g Protein wurden Western-Blot-Analysen der ERK1/2-Phosphorylierung und der ERK1/2-Proteinexpression durchgeführt.

Bereits bei einer Konzentration von 2  $\mu$ M PD98059 war eine deutlich verminderte Phosphorylierung festzustellen, die mit steigender Konzentration des Inhibitors weiter abnahm. Bei 25  $\mu$ M PD98059 war kein phosphoryliertes ERK1/2-Protein mehr zu detektieren.

Die Detektion gleichmäßiger Banden für ERK1/2-Protein zeigte, dass sich die ERK1/2-Proteinexpression in vitro durch Behandlung mit PD98059 nicht änderte (**Abb. 13**).



**Abb. 13:** Western-Blot-Analyse der dosisabhängigen Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung durch PD98059 *in vitro* nach Stimulation für 10 Minuten mit 10 ng/ml PMA. -C: Negativkontrolle (nicht stimulierte VSMC), +C: Positivkontrolle (für 10 Minuten mit PMA stimulierte VSMC).

### 5.3.2 Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung und Suppression der ERK1/2-Proteinexpression durch PD98059 *in vivo*

*In vivo* wurde der Effekt von 50 µM PD98059 auf die ERK1/2-Phosphorylierung untersucht. Es wurde der Zeitpunkt 24 Stunden nach Ballonkatheterverletzung für die Untersuchung gewählt, da ERK1/2 zu diesem Zeitpunkt in den Western-Blot-Analysen des zeitlichen Verlaufs der ERK1/2-Phosphorylierung deutlich phosphoryliert war (**Abb. 10**).

Die Tiere wurden nach Ballonkatheterverletzung entweder mit dem Wirkstoff (0,2 ml *Pluronic Gel* mit 50 µM PD98059 und 1 ‰ DMSO) oder mit dem Lösungsmittel (0,2 ml *Pluronic Gel* mit 1 ‰ DMSO) behandelt, und 24 Stunden später erfolgte die Entnahme der Aa. carotides communes. Als Negativkontrolle (-C) wurden nicht operierte linke Aa. carotides communes und als Positivkontrolle (+C) 10 Minuten nach Stimulation entnommene Gefäße verwendet.

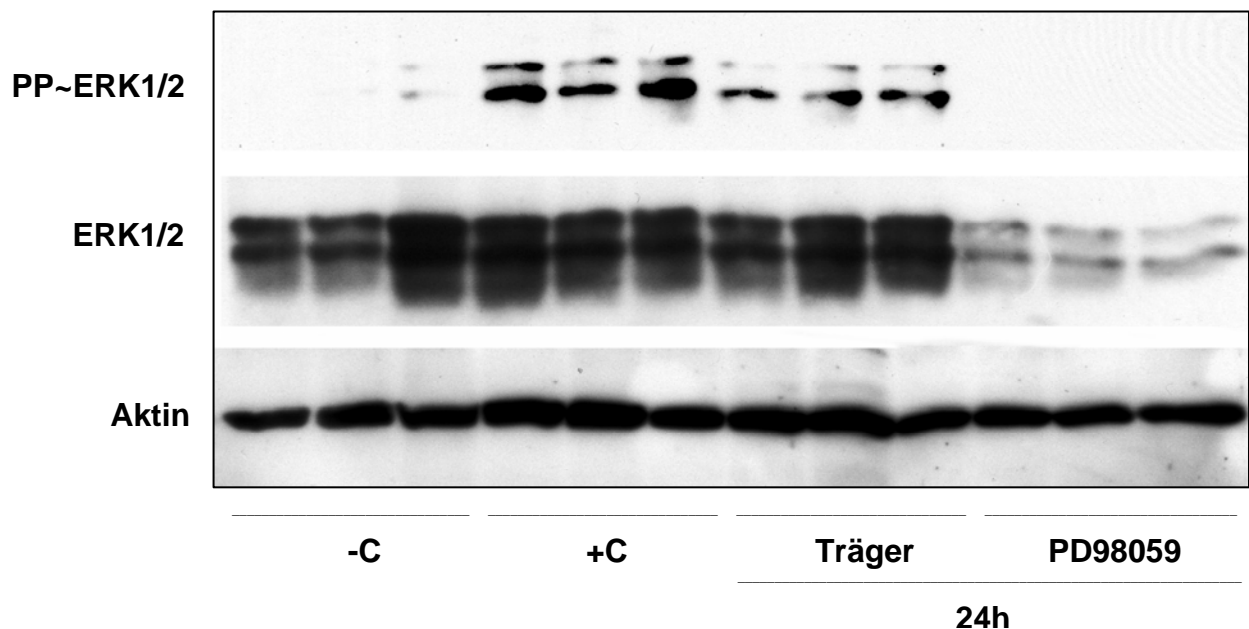
Die zytosolischen Proteine wurden extrahiert, und nach elektrophoretischer Auftrennung von je 20 µg Protein wurden Western-Blot-Analysen der ERK1/2-Phosphorylierung und der ERK1/2-Proteinexpression durchgeführt.

Dabei zeigte sich in den Western-Blot-Analysen, dass durch 50 µM PD98059 die ERK1/2-Phosphorylierung 24 Stunden nach Verletzung unterdrückt werden konnte. Die ERK1/2-Proteinexpression der mit Wirkstoff behandelten Tiere war ebenfalls deutlich vermindert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Gelbeladung wurde nach Sättigung mit Chemolumineszenzsubstrat die Aktinexpression dargestellt. Es zeigten sich gleichmäßige Banden für Aktin (**Abb. 14**).

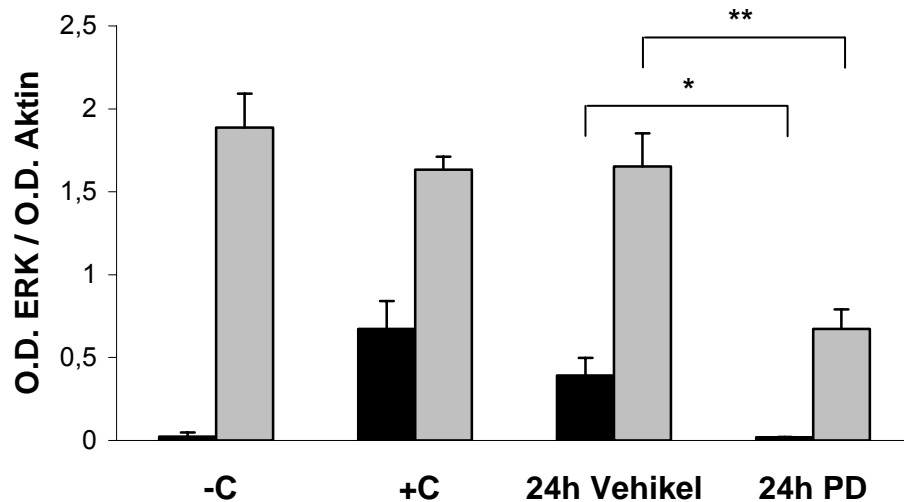
Zur quantitativen Auswertung wurde eine densitometrische Analyse durchgeführt. Nach Messung der optischen Dichten (O.D.) der Banden wurde das ERK1/2-Proteinsignal (bzw. das Signal für doppelt phosphoryliertes ERK1/2-Protein) auf das Aktinsignal standardisiert, wobei die optische Dichte des Aktinsignals eine Standardabweichung von kleiner als 10 % des Mittelwertes zeigte. Zur Standardisierung wurde der Quotient der optischen Dichte der jeweiligen ERK1/2-Proteinbande (bzw. der Bande für doppelt phosphoryliertes ERK1/2-Protein) und der dazugehörigen Aktinbande gebildet. Für jede Gruppe (n=3) wurden das geometrische Mittel und die Standardabweichung der auf das Aktinsignal standardisierten Messwerte bestimmt.

Die Mittelwerte der vier Gruppen sind in einem Säulendiagramm dargestellt, wobei die Fehlerindikatoren auf den Säulen die Standardabweichungen beschreiben (**Abb. 15**).

Nach Auswertung mit einem zweiseitigen Student's t-Test für unverbundene Stichproben zeigte sich eine signifikante Abnahme um mehr als 95 % ( $p < 0,05$ ) der ERK1/2-Phosphorylierung bei behandelten Tieren im Vergleich zu nicht behandelten Tieren. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Unterdrückung der Phosphorylierung von einem hoch signifikanten Abfall der ERK1/2-Proteinexpression um ca. 60 % ( $p < 0,01$ ) in den mit PD98059 behandelten Gefäßen begleitet war.



**Abb. 14:** Western-Blot-Analyse der Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung und der Suppression der ERK1/2-Proteinexpression durch PD98059 in vivo 24 Stunden nach Ballonkatheterverletzung. Aktin dient als Beladungskontrolle. -C: Negativkontrolle (nicht operierte linke A. carotis communis), +C: Positivkontrolle (A. carotis 10 Minuten nach Ballonkatheterverletzung).



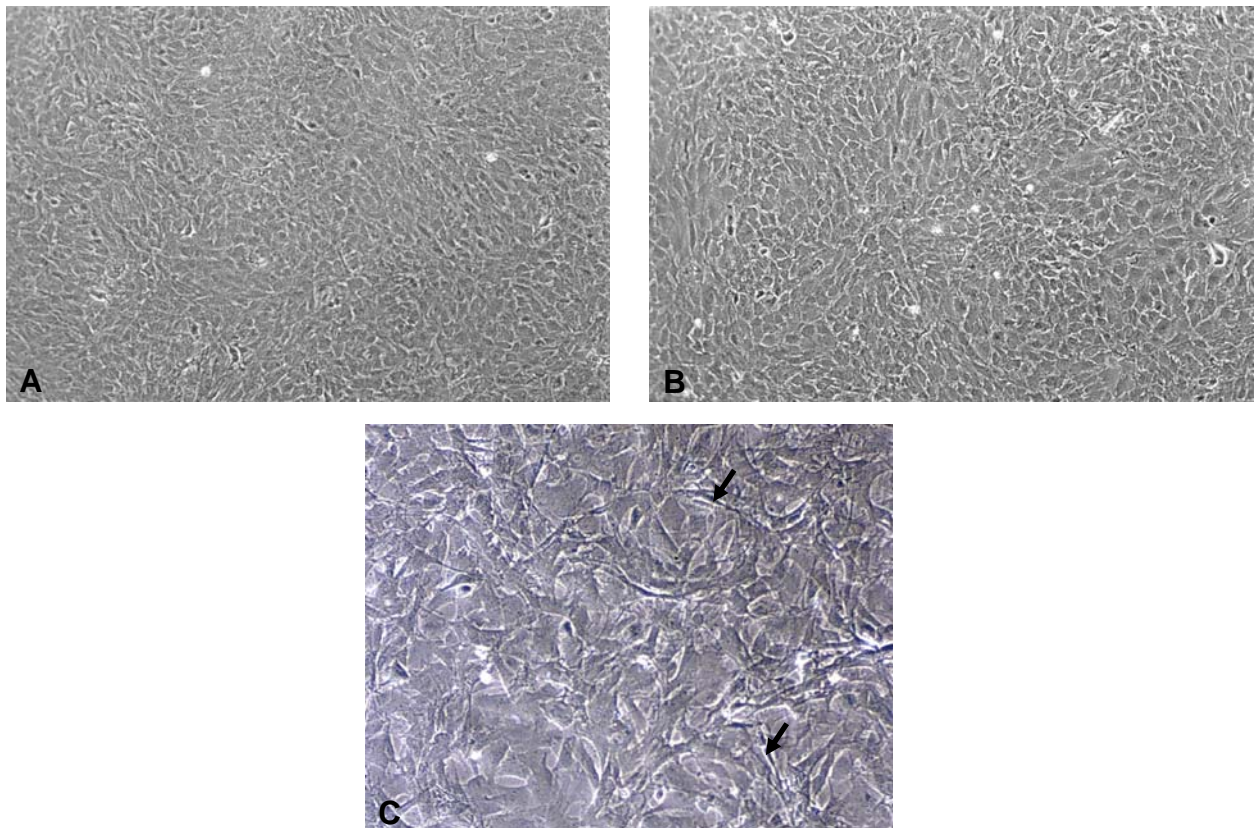
**Abb. 15: Densitometrische Analyse der Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung und der Suppression der ERK1/2-Proteinexpression durch PD98059.** Das ERK-Signal ist auf das Aktinsignal standardisiert (n=3). Schwarze Säulen: phosphorylierte ERK1/2, graue Säulen: ERK1/2-Protein, O.D.: optische Dichte, -C: Negativkontrolle (nicht operierte linke A. carotis communis), +C: Positivkontrolle (A. carotis 10 Minuten nach Ballonkatheterverletzung), \*: p<0,05, \*\*: p<0,01.

#### 5.4 Toxizitätsprüfung von PD98059 bei Behandlung von VSMC

Zum Ausschluss zytotoxischer Effekte von PD98059 auf Gefäßmuskelzellen und einer damit verbundenen Abnahme der ERK1/2-Proteinexpression wurden VSMC lichtmikroskopisch untersucht und Zellzählungen nach Färbung mit Trypanblau durchgeführt.

Zum Zwecke der lichtmikroskopischen Untersuchung wurden für 24 Stunden mit 50  $\mu$ M PD98059 inkubierte Zellen mit einer Kontrolle (für 24 Stunden mit DMSO inkubierte Zellen) lichtmikroskopisch verglichen. Sowohl die mit PD98059 behandelten Zellen als auch die Kontrolle wurden während des Versuches serumfrei mit VSMC-Medium mit 0 % FCS (*fetal calf serum*, fötales Rinderserum) inkubiert. Das lichtmikroskopische Bild zeigte keine Unterschiede in der Zellmorphologie, die Hinweise auf einen zytotoxischen Effekt geben könnten (**Abb. 16**).



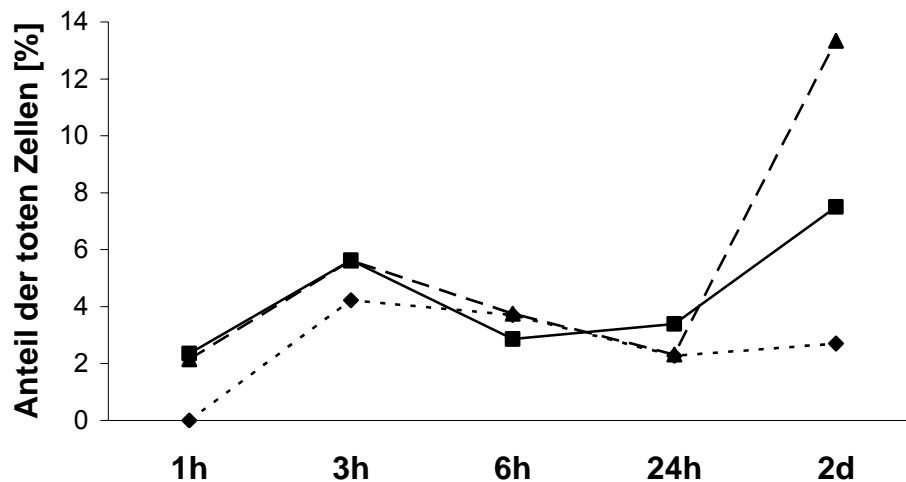


**Abb. 16: Morphologische Untersuchungen zur Zytotoxizität von PD98059.** VSMC (0 % FCS) wurden mit Wirkstoff oder mit Lösungsmittel für 24 Stunden behandelt und anschließend lichtmikroskopisch untersucht. A: DMSO (50x). B: PD98059 (50x). C: PD98059 (100x). Die Pfeile zeigen deutlich sichtbare PD98059-Kristalle.

Die Zellzählungen wurden nach Zellfärbung von VSMC derselben Ursprungsarterie und derselben Passage mit Trypanblau durchgeführt, wobei die lebenden Zellen farblos und die toten blau erschienen. Dazu wurde je 50  $\mu$ l Zellsuspension mit 50  $\mu$ l Trypanblau gemischt und jeweils 4 große Quadrate in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

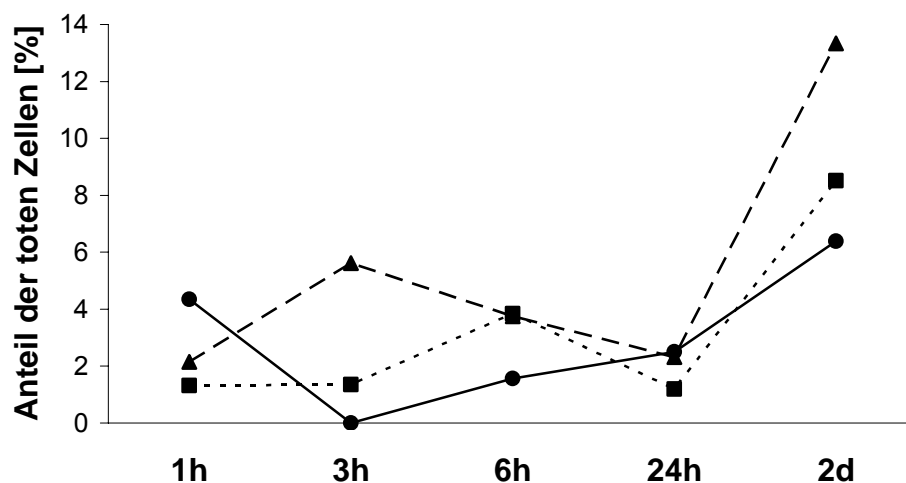
Zunächst wurden Zellen, die konstant mit 10 % FCS inkubiert wurden, mit Zellen verglichen, die für 1 Stunde, 3 Stunden, 6 Stunden, 1 Tag und 2 Tage serumfrei mit oder ohne Lösungsmittel (1 ‰ DMSO) behandelt worden waren.

Der Anteil der toten Zellen, der mit serumhaltigem Medium behandelten Fraktion, veränderte sich über die Zeit nicht erkennbar. Hingegen nahm der Anteil der toten Zellen der beiden serumfrei inkubierten Fraktionen nach 2 Tagen deutlich zu (**Abb. 17**).



**Abb. 17:** Anteil der toten Zellen im Zeitverlauf bei normaler Nährlösung und bei Serumentzug mit oder ohne Behandlung mit DMSO. Gepunktete Linie: 10 % FCS. Durchgezogene Linie: 0 % FCS. Gestrichelte Linie: 0 % FCS + DMSO.

Anschließend wurden mit DMSO behandelte Zellen mit PD98050-behandelten Zellen (10  $\mu$ M bzw. 25  $\mu$ M) verglichen, wobei alle drei Zellfraktionen serumfrei behandelt worden waren. Hierbei zeigten sich ähnliche Kurvenverläufe aller 3 Fraktionen mit deutlicher Zunahme des Anteils der toten Zellen nach 2 Tagen. Dabei lagen die beiden Kurven der mit dem MEK-Inhibitor behandelten Zellen im Endbereich unterhalb der nur mit Träger behandelten Zellen (**Abb. 18**).



**Abb. 18:** Anteil der toten Zellen im Zeitverlauf bei Behandlung mit DMSO oder PD98050. Gestrichelte Linie: 0 % FCS + DMSO. Durchgezogene Linie: 0 % FCS + 10  $\mu$ M PD98050. Gepunktete Linie: 0 % FCS + 25  $\mu$ M PD98050.

## 5.5 Verminderung der Ets-1-Proteinexpression durch PD98059

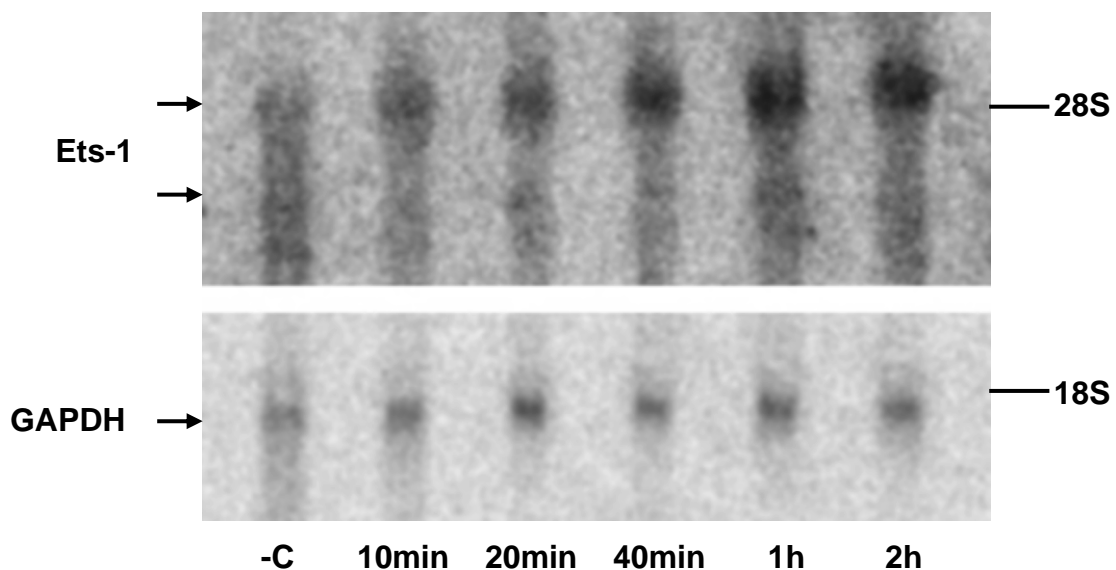
### 5.5.1 Verminderung der Ets-1-Proteinexpression durch PD98059 in vitro

Zunächst wurde mit Hilfe des Northern Blots gezeigt, dass Ets-1, ein Zielprodukt der MAPK-Kaskade, durch PMA in VSMC induziert werden kann.

Nach Stimulation der VSMC mit 10 ng/ml PMA für 10 Minuten, 20 Minuten, 40 Minuten, 1 Stunde und 2 Stunden erfolgte nach RNA-Isolierung die elektrophoretische Auftrennung von je 10 µg RNA. Als Sonde wurde eine *rat-Ets-1-DNA-Sonde* verwendet. Als Beladungskontrolle diente GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)-mRNA.

Im Northern Blot waren zwei Ets-1 Banden zu detektieren, wobei die kräftigere größer und die schwächere kleiner als die 28 S-Bande ist. Diese Signale entsprechen den für die Ratte bekannten Transkripten von 5,3 und 4 kb.

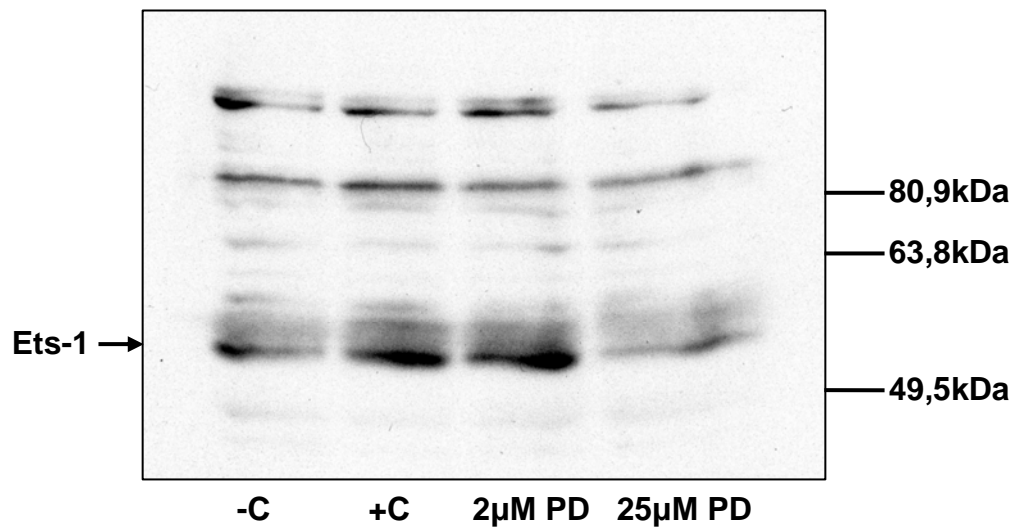
Bei der PMA-Stimulation zeigte sich schon nach 10 Minuten ein beginnender Anstieg der Ets-1-mRNA-Expression, der bis zu einer Stunde nach Stimulation weiter zunahm und erst nach 2 Stunden leicht rückläufig war (**Abb. 19**).



**Abb. 19:** Northern-Blot-Analyse des Zeitverlaufs der Ets-1-mRNA-Expression in vitro nach Stimulation mit 10 ng/ml PMA. GAPDH-mRNA dient als Beladungskontrolle. Pfeile markieren die Banden. Am rechten Bildrand finden sich Größenangaben der ribosomalen RNA: 28 S entspricht 5 kb, 18 S entspricht 1,9 kb. -C: Negativkontrolle (nicht stimulierte VSMC).

Anschließend wurde die Suppression der Ets-1-Proteinexpression mittels Western-Blot-Analysen untersucht. Die Zellen wurden für 1 Stunde mit 2 bzw. 25 µM PD98059

vorinkubiert und dann für 1 Stunde mit PMA stimuliert. Die Western-Blot-Analysen der Ets-1-Proteinexpression wurden nach Extraktion nukleärer Proteine aus VSMC-Lysat und elektrophoretischer Auftrennung von je 25 µg Protein mittels eines *Ets-1 monoclonal mouse-Antibody* durchgeführt. Die Ets-1-Banden waren bei 55 kDa zu detektieren. Bei einer Konzentration von 2 µM PD98059 erschien die Ets-1-Bande gleich stark wie die der Positivkontrolle. Bei 25 µM PD98059 war die Ets-1-Proteinexpression deutlich supprimiert (**Abb. 20**).



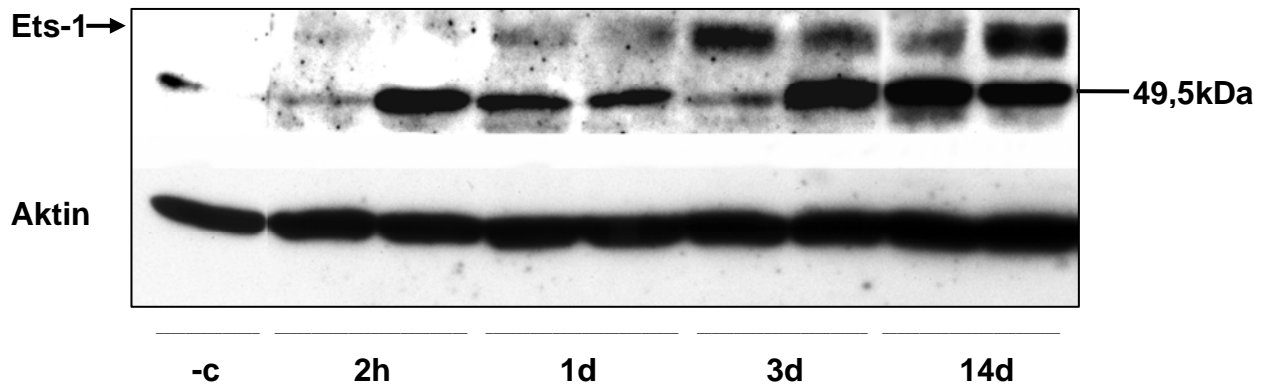
**Abb. 20:** Western-Blot-Analyse der Inhibition der Ets-1-Proteinexpression durch PD98059 *in vitro* nach Stimulation für 1 Stunde mit 10 ng/ml PMA. Der Pfeil markiert die Ets-1-Bande. Am rechten Bildrand finden sich die Vergleichsgrößen des Molekulargewichtsmarkers. -C: Negativkontrolle (nicht stimulierte VSMC), +C: Positivkontrolle (für 10 Minuten mit PMA stimulierte VSMC).

### 5.5.2 Verminderung der Ets-1-Proteinexpression durch PD98059 *in vivo*

Die Western-Blot-Analysen der Ets-1-Proteinexpression *in vivo* wurden nach der Extraktion nukleärer Proteine aus Gefäßlysat und elektrophoretischer Auftrennung von je 20 µg Protein durchgeführt.

Zunächst wurde die Ets-1-Proteinexpression zu den Zeitpunkten 2 Stunden, 1 Tag, 3 Tage und 4 Tage nach Ballonkatheterverletzung untersucht.

*In vivo* zeigte sich im Western Blot bei Inkubation mit dem *Ets-1 monoclonal mouse-Antibody* oberhalb einer unspezifischen Bande bei 50 kDa erstmals nach einem Tag ein schwaches und nach 3 Tagen ein deutliches Ets-1-Signal bei 55 kDa. Die Ets-1-Proteinexpression war auch am Tag 14 noch deutlich erhöht (**Abb. 21**).



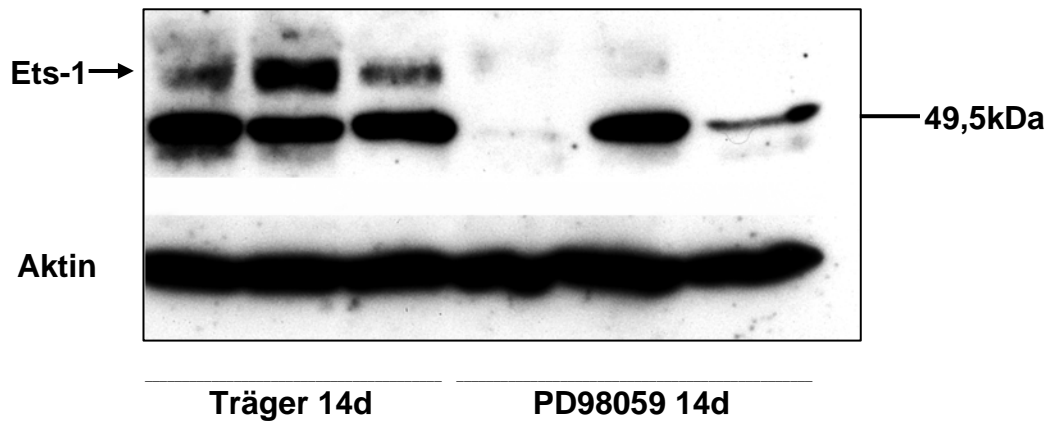
**Abb. 21: Western-Blot-Analyse des Zeitverlaufs der Ets-1-Proteinexpression in vivo nach Ballonkatheterverletzung.** Aktin dient als Beladungskontrolle. Der Pfeil markiert die Ets-1-Bande. Am rechten Bildrand findet sich die Vergleichsgröße des Molekulargewichtsmarkers. -C: Negativkontrolle (nicht operierte linke A. carotis communis).

Für die Untersuchung des Effektes von PD98059 auf die Ets-1-Proteinexpression wurden die Tiere nach Ballonkatheterverletzung entweder mit dem Wirkstoff (0,2 ml *Pluronic Gel* mit 50  $\mu$ M PD98059 und 1 ‰ DMSO) oder mit dem Träger (0,2 ml *Pluronic Gel* mit 1 ‰ DMSO) behandelt und die Gefäße 14 Tage nach Ballonkatheterverletzung entnommen.

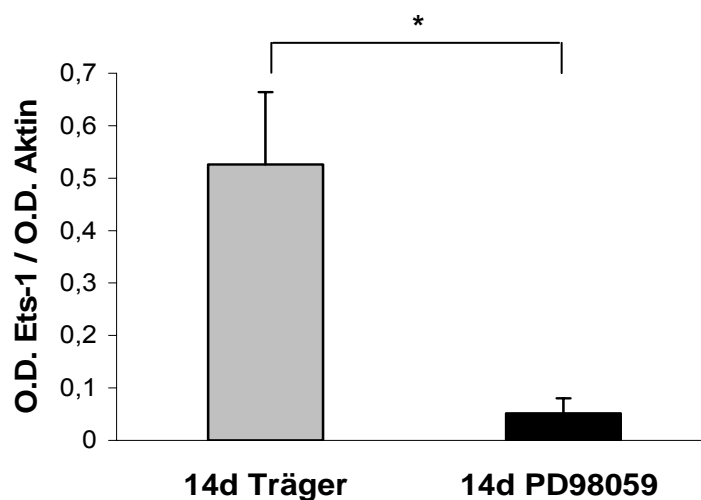
Im Western Blot zeigte sich eine starke Suppression der Ets-1-Proteinexpression bei den mit PD98059 behandelten Tieren im Vergleich zu den mit Träger behandelten Tieren. Die Aktinbanden erschienen gleichmäßig (**Abb. 22**).

Bei der quantitativen Auswertung der Suppression der Ets-1-Proteinexpression durch PD98059-Behandlung anhand der densitometrischen Analyse wurde wie bei der Auswertung des Effektes von PD98059 auf die ERK1/2-Phosphorylierung und ERK1/2-Proteinexpression in Kapitel 5.3.2 vorgegangen. Die optische Dichte des Aktinsignals zeigte eine Standardabweichung von kleiner als 10 % vom Mittelwert.

Das Ergebnis der densitometrischen Analyse ist in einem Säulendiagramm dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich durch die Behandlung mit PD98059 die Ets-1-Proteinexpression verglichen mit der mit Träger behandelten Kontrollgruppe signifikant um mehr als 85 % ( $p < 0,05$ ) senken ließ (**Abb. 23**).



**Abb. 22:** Western-Blot-Analyse der Suppression der Ets-1-Proteinexpression durch PD98059 in vivo 14 Tage nach Ballonkatheterverletzung. Aktin dient als Beladungskontrolle. Der Pfeil markiert die Ets-1-Bande. Am rechten Bildrand findet sich die Vergleichsgröße des Molekulargewichtsmarkers.



**Abb. 23:** Densitometrische Analyse der Suppression der Ets-1-Proteinexpression durch PD98059. Das Ets-1-Signal ist auf das Aktinsignal standardisiert (n=3). Graue Säule: mit Träger behandelte Kontrolltiere, schwarze Säule: mit Wirkstoff behandelte Tiere, O.D.: optische Dichte, \*:  $p < 0,05$ .

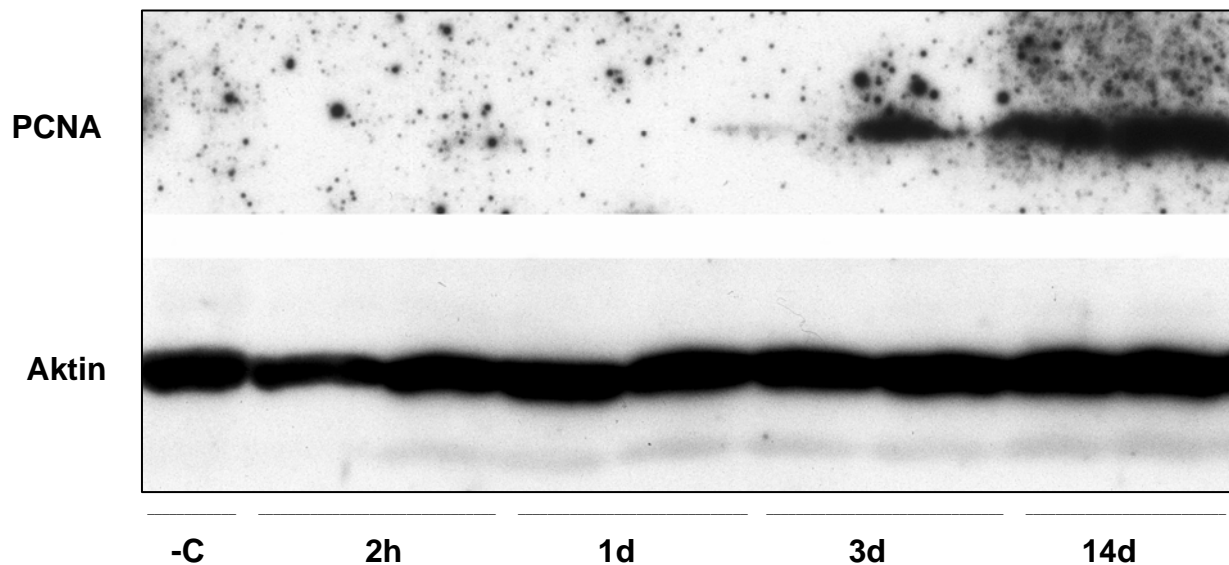
### 5.6 Verminderung der Zellproliferation durch PD98059 in vivo

Die proliferative Aktivität der Zellen nach Ballonkatheterverletzung wurde durch Western-Blot-Analysen der *proliferating-cell-nuclear-antigen* (PCNA)-Expression bestimmt. PCNA ist ein 37 kDa großes Protein, das mit der Polymerase  $\delta$  assoziiert ist und in der S-Phase des Zellzyklus, dem Zeitpunkt der DNA-Replikation, verstärkt im Zellkern zu finden ist. Nach der Extraktion nukleärer Proteine aus Gefäßlysaten und

elektrophoretischer Auftrennung von je 20 µg Protein wurden die Blots mit dem *PCNA monoclonal mouse-Antibody* inkubiert.

Zunächst wurde die PCNA-Proteinexpression 2 Stunden, 1 Tag, 3 Tage und 14 Tage nach Ballonkatheterverletzung untersucht.

Am Tag 3 wurde erstmals eine Bande bei 37 kDa detektiert, und am Tag 14 war die PCNA Expression gegenüber der Kontrolle und den frühen Zeitpunkten stark hochreguliert (**Abb. 24**).

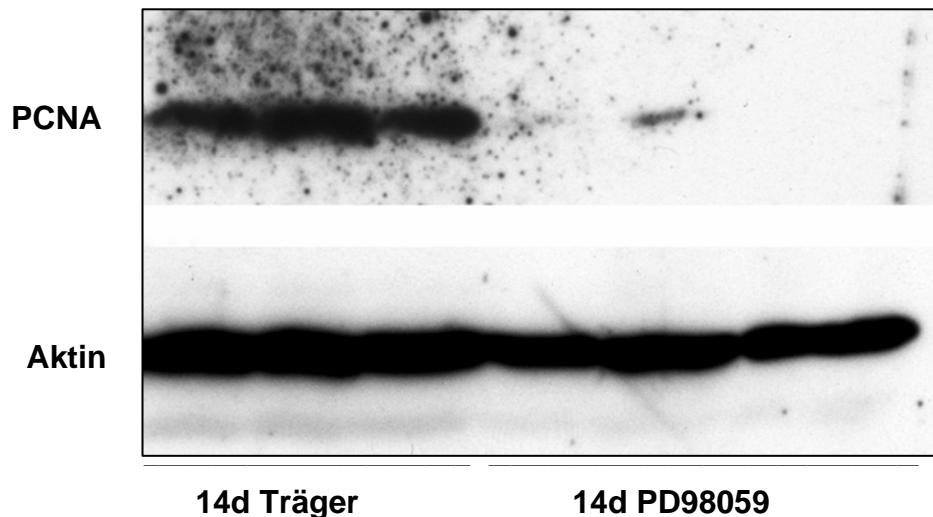


**Abb. 24:** Western-Blot-Analyse des Zeitverlaufs der PCNA-Proteinexpression *in vivo* nach Ballonkatheterverletzung. Aktin dient als Beladungskontrolle. -C: Negativkontrolle (nicht operierte linke A. carotis communis).

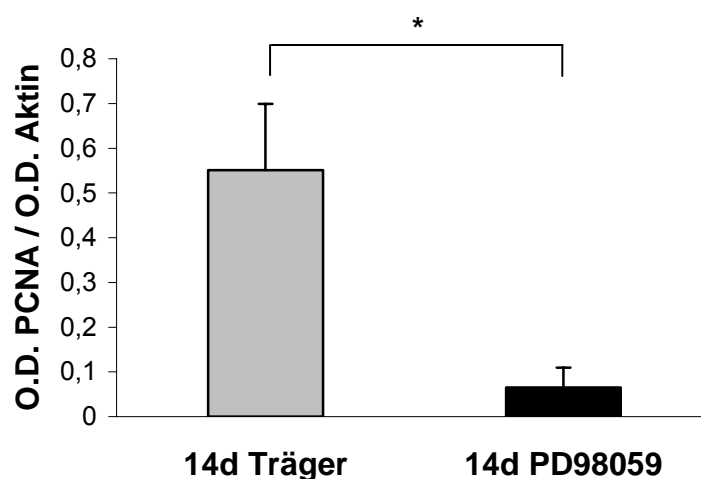
Der Effekt von PD98059 auf die PCNA-Expression 14 Tage nach Ballonkatheterverletzung wurde unter gleichen Bedingungen getestet wie der Effekt von PD98059 auf die Ets-1-Expression (s. Kapitel 5.5.2).

Im Western Blot stellte sich bei Behandlung mit PD98059 eine deutlich verminderte PCNA-Proteinexpression dar. Die Aktinbanden erschienen gleichmäßig (**Abb. 25**).

Die quantitative Analyse, die wie die Auswertung des Effektes von PD98059 auf ERK1/2-Phosphorylierung und ERK1/2-Proteinexpression in Kapitel 5.3.2 durchgeführt wurde, zeigte eine signifikante Verminderung der PCNA-Expression von mehr als 85 % ( $p < 0,05$ ) bei den mit 50 µM PD98059 behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die optische Dichte des Aktinsignals zeigte eine Standardabweichung von 12 % des Mittelwertes (**Abb. 26**).



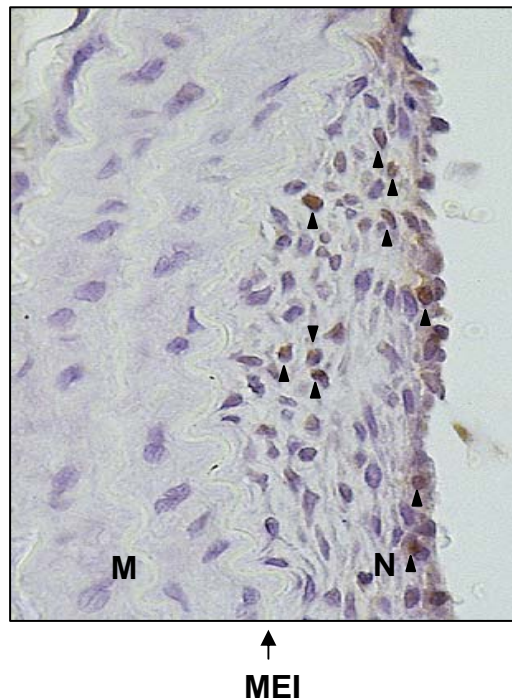
**Abb. 25:** Western-Blot-Analyse der Suppression der PCNA-Proteinexpression *in vivo* durch PD98059 14 Tage nach Ballonkatheterverletzung. Aktin dient als Beladungskontrolle.



**Abb. 26:** Densitometrische Analyse der Suppression der PCNA-Proteinexpression durch PD98059. Das PCNA-Signal ist auf das Aktinsignal standardisiert (n=3). Graue Säule: mit Träger behandelte Kontrolltiere, schwarze Säule: mit Wirkstoff behandelte Tiere, O.D.: optische Dichte, \*:  $p < 0,05$ .

Der Ort der erhöhten PCNA-Expression am Tag 14 nach Verletzung wurde immunhistochemisch mit dem *PCNA monoclonal mouse-Antibody* dargestellt. Es zeigten sich braun gefärbte Kerne, die PCNA enthielten, ausschließlich in der Neointima. In der Media wurden keine gefärbten Kerne gefunden (**Abb. 27**).





**Abb. 27: Lokalisation von PCNA in der Neointima 14 Tage nach Ballonkatheterverletzung durch immunhistochemische Färbung.** Braun gefärbte Zellkerne (Pfeilspitzen) markieren die PCNA-Expression. M: Media. N: Neointima. MEI: Membrana elastica interna (Pfeil) (400x).

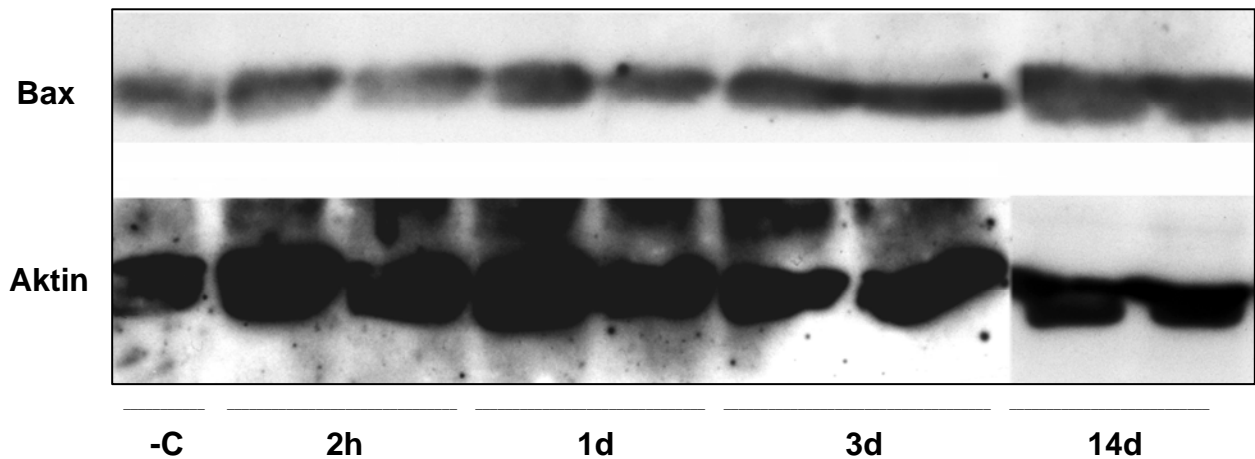
### 5.7 Effekte von PD98059 auf die Apoptose in vivo

Durch Detektion der Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (B-Zell-lymphom 2) und des pro-apoptotischen Proteins Bax (Bcl-assoziiertes X-Protein) wurde untersucht, ob die Behandlung mit PD98059 einen Einfluss auf die Apoptose hat.

Es wurden Western-Blot-Analysen nach der Extraktion nukleärer Proteine aus Gefäßlysat mittels eines *Bcl-2 polyclonal mouse-Antibody* und eines *Bax polyclonal rabbit-Antibody* durchgeführt. Nach elektrophoretischer Auftrennung von je 20 µg Protein ließen sich Banden für das 26 kDa große Protein Bcl-2 und das 23 kDa große Protein Bax detektieren.

Die Bax-Proteinexpression wurde zu den Zeitpunkten 2 Stunden, 1 Tag, 3 Tage und 14 Tage nach Ballonkatheterverletzung untersucht.

Bax-Protein, das auch in der Negativkontrolle eine deutliche Expression besaß, erschien nach dem dritten Tag hochreguliert, wobei die Bax-Expression am Tag 14 noch weiter zunahm (**Abb. 28**).



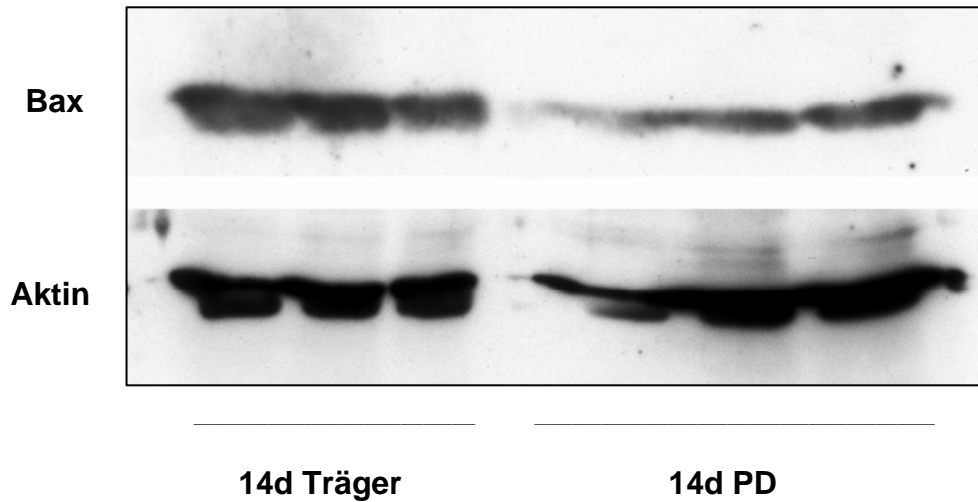
**Abb. 28: Western-Blot-Analyse des Zeitverlaufs der Bax-Proteinexpression in vivo nach Ballonkatheterverletzung.** Aktin dient als Beladungskontrolle. -C: Negativkontrolle (nicht operierte linke A. carotis communis).

Der Effekt von PD98059 auf die Bax-Expression 14 Tage nach Ballonkatheterverletzung wurde unter gleichen Bedingungen getestet wie die Effekte von PD98059 auf die Ets-1- (s. Kapitel 5.5.2) und die PCNA-Expression (s. Kapitel 5.6).

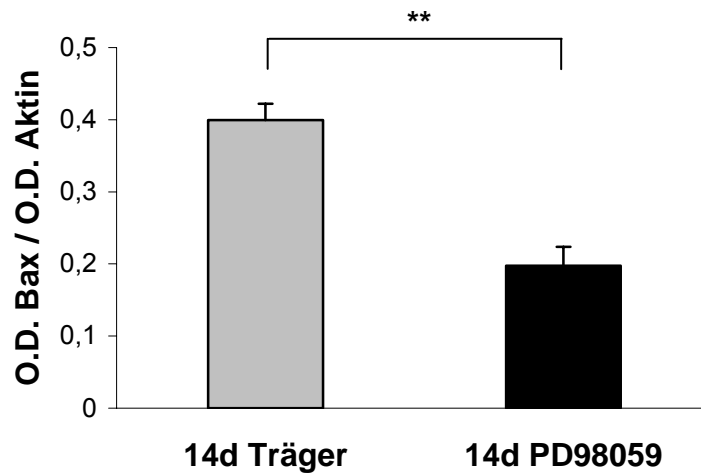
Die Western-Blot-Analysen zeigten 14 Tage nach Ballonkatheterverletzung eine verminderte Bax-Expression bei Tieren, die mit 50  $\mu$ M PD98059 behandelt worden waren, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für Aktin waren gleichmäßige Banden zu detektieren (**Abb. 29**).

Die quantitative Analyse, die wie die Auswertung des Effektes von PD98059 auf ERK1/2-Phosphorylierung und ERK1/2-Proteinexpression in Kapitel 5.3.2 durchgeführt wurde, zeigte eine hoch signifikante Verminderung der Bax-Expression von 50 % ( $p < 0,01$ ) bei den mit 50  $\mu$ M PD98059 behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die optische Dichte des Aktinsignals zeigte eine Standardabweichung von 15 % des Mittelwertes (**Abb. 30**).

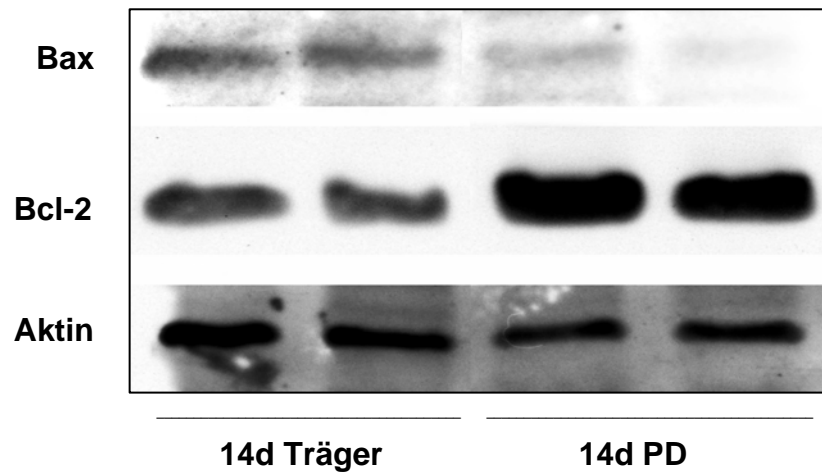
Auf das anti-apoptotische Onkogen Bcl-2 zeigte die Behandlung mit 50  $\mu$ M PD98059 einen Effekt, der dem Effekt von PD98059 auf das pro-apoptotische Protein Bax entgegengesetzt war. Die Bcl-2-Expression wurde 14 Tage nach Ballonkatheterverletzung durch Behandlung mit 50  $\mu$ M PD98059 im Vergleich zu den nur mit Trägerstoff behandelten Tieren deutlich hochreguliert (**Abb. 31**).



**Abb. 29:** Western-Blot-Analyse der Suppression der Bax-Proteinexpression in vivo durch PD98059 14 Tage nach Ballonkatheterverletzung. Aktin dient als Beladungskontrolle.



**Abb. 30:** Densitometrische Analyse der Suppression der Bax-Proteinexpression durch PD98059. Das Bax-Signal wurde auf das Aktinsignal standardisiert (n=3). Graue Säule: mit Träger behandelte Kontrolltiere, schwarze Säule: mit Wirkstoff behandelte Tiere, O.D.: optische Dichte, \*\*: p<0,01.



**Abb. 31:** Western-Blot-Analyse der Suppression der Bax-Proteinexpression und der Induktion der Bcl-2-Proteinexpression durch PD98059 *in vivo* 14 Tage nach Ballonkatheterverletzung. Aktin dient als Beladungskontrolle.

## 6 Diskussion

### 6.1 Zeitverlauf der ERK1/2-Aktivierung im Rattenmodell

In der vorliegenden Arbeit wurde die ERK1/2-Aktivität indirekt durch Nachweis der doppelt-phosphorylierten ERK1/2 (T-E-Y-Motiv) mittels eines phosphospezifischen Antikörpers im Western Blot untersucht. Diese Methode der Analyse der ERK-Aktivität ist durch die Beobachtungen begründet, dass ERK2 ausschließlich durch Phosphorylierung des T-E-Y-Motivs aktiviert wird (Canagarajah et al., 1997) und dass der Zeitverlauf der erhöhten ERK1/2-Enzymaktivität mit dem der gesteigerten Signalintensität von phosphorylierter ERK1/2 übereinstimmt (Koyama et al., 1998).

Der durch diese Arbeit bestätigte Befund der schnellen ERK1/2-Aktivierung 10 Minuten nach Stimulation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde bereits durch mehrere Studien dargestellt (Graf et al., 1997; Hu et al., 1997; Lille et al., 1997; Pyles et al., 1997). Die eigenen *in vivo*-Ergebnisse zeigten, wie von Watson et al. demonstriert, ein mehrphasiges Muster der ERK1/2-Aktivierung. In den immunhistologischen Untersuchungen von Watson et al. wurde ERK-Protein nach 30 Minuten und erneut nach 7 Tagen im Zellkern als Ausdruck der ERK-Aktivierung nachgewiesen (Watson et al., 2000). Im Vergleich dazu wurde in den eigenen Untersuchungen nach Normalisierung der ERK1/2-Aktivität am Tag 3 eine erneute ERK1/2-Aktivierung bereits am Tag 4 gefunden. Der Zeitpunkt der zweiten ERK1/2-Aktivierung am Tag 4 stimmte mit dem histomorphologisch erkennbaren Beginn der Neointimaprolieration im Rattenmodell überein (Heijenbrok et al., 1998). Da mit der vorliegenden Arbeit auch erstmals ein früher Abfall der ERK1/2-Aktivität *in vivo* auf basale Werte bereits 1 Stunde nach Ballonkatheterverletzung gezeigt werden konnte, ist insgesamt ein triphasiges Aktivierungsmuster mit erhöhter ERK-Aktivität nach 10 Minuten, nach 24 Stunden und am Tag 4 nach Ballonverletzung dargestellt worden.

Im Unterschied dazu beschrieben frühere Untersuchungen auf der Basis der ERK-Enzymaktivität mittels *in vitro kinase assay* lediglich ein monophasiges Muster mit anhaltend erhöhter Aktivität bis 11 Stunden (Lille et al., 1997) bzw. bis Tag 7 (Hu et al., 1997) oder Tag 14 (Lai et al., 1996). Die hier verwendete Darstellung der doppelt-phosphorylierten ERK1/2 im Western Blot zeigte hingegen nach einer Stunde, nach 3 Tagen und nach 7 Tagen einen Aktivitätsabfall *in vivo* bis auf Ausgangswerte. Möglicherweise misst der *in vitro kinase assay* eine unspezifische Kinaseaktivität,

sodass eine ERK1/2-Aktivierung vorgetäuscht wird. Jedoch können die unterschiedlichen Methoden die Diskrepanzen hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der ERK1/2-Aktivierung nicht vollständig erklären, da die Arbeitsgruppe von Koyama et al. sowohl im *in vitro kinase assay* als auch durch Darstellung der doppelt-phosphorylierten ERK1/2 im Western blot ein monophasiges Aktivierungsmuster fand (Koyama et al., 1998). Eine erhöhte Enzymaktivität und einen gleichzeitigen Anstieg des Phosphorylierungssignals beschrieben Koyama et al. nach 30 Minuten, 1 Stunde, 12 Stunden und 1 Tag in ihren Untersuchungen bis Tag 14. Ein unspezifisches Signal durch den hier verwendeten, hoch sensitiven monoklonalen Phospho-p44/42-MAPK-Antikörper konnte durch Reproduktion des Ergebnisses mit einem bereits in anderen Arbeiten (Koyama et al., 1998; Ahn et al., 2001) verwendeten polyklonalen Antikörper weitgehend ausgeschlossen werden.

Eine weiterer Erklärungsansatz für die widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der ERK1/2-Aktivierung sind Unterschiede in der praktischen Durchführung der Ballonkatheterverletzung der A. carotis nach Clowes (Clowes et al., 1983). Die schnelle ERK1/2-Aktivierung kann durch unterschiedliche Stimuli mit und ohne Setzen von strukturellen Läsionen erzielt werden. So zeigten Hu et al., dass bereits eine Längsdehnung der A. carotis communis um lediglich 10-15 % der Ausgangslänge ohne sichtbare Gefäßläsionen zu einer signifikanten schnellen ERK-Aktivierung führte (Hu et al., 1997). Ebenso verursachten zyklische Dehnung oder Scherkräfte *in vitro* eine schnelle Aktivierung der ERK in kultivierten VSMC (Hu et al., 1998). *In vivo* führten akute Blutdruckanstiege, entweder durch Stress oder durch hypertensive Substanzen verursacht, über eine Erhöhung der Scherkräfte und Dehnung der Gefäße auch zu einer ERK-Aktivierung (Xu et al., 1996). Die MAPK-Kaskade kann demnach sowohl durch übermäßige Dehnung der Gefäße bei der Präparation als auch durch hypertone Blutdruckwerte in Folge von Stresseinwirkung auf die Tiere ausgelöst werden. Eine durch Gefäßdehnung induzierte ERK-Aktivierung würde sich als Phosphorylierungssignal in der Western-Blot-Analyse der Negativkontrolle darstellen. Im Rahmen einer anderen Dissertationsarbeit aus dem Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie (A. Saxena, 2007) konnte gezeigt werden, dass die hier zur Anästhesie verwendete Kombination von (S)-Ketamin und Xylazin bei adulten Ratten zu einem signifikanten akuten Blutdruckanstieg mit einer frühen ERK1/2-Aktivierung in nicht operierten Kontrolltieren führen kann. In den eigenen Versuchen wurden keine Blutdruckmessungen vorgenommen. Jedoch zeigte sich in der Western-

Blot-Analyse der doppelt-phosphorylierten ERK1/2 der nicht operierten Kontrollgefäße keinerlei Aktivitätsanstieg. Demnach scheint ein deutlicher Blutdruckanstieg - in den Untersuchungen von Xu et al. führte ein Blutdruckanstieg von systolischen Werten von 120 mmHg auf 150-160 mmHg zu einer ausgeprägten Aktivierung von ERK2 (Xu et al., 1996) - ausgeschlossen zu sein.

Der Nachweis der schnellen ERK-Aktivierung lässt somit keine Rückschlüsse auf den Grad der Läsion zu. Durch immunhistochemische Untersuchungen mit Anti-von-Willebrand-Antikörper zeigten Watson et al., dass bei ihrem Versuchsaufbau das Endothel vollständig entfernt wurde. Nach deren Ergebnissen fand die frühe ERK-Aktivierung in den glatten Gefäßmuskelzellen der Media und die späte in denen der Neointima statt (Watson et al., 2000).

Ein leichter Abfall der ERK-Proteinexpression war nach 1 Stunde und am Tag 3 zu detektieren. Dieser wird jedoch von uns als bei Weitem nicht ausreichend angesehen, um das nahezu vollständige Verschwinden der phosphorylierten ERK zu diesen Zeitpunkten erklären zu können. Ein Gelbeladungsfehler ist dabei auch auszuschließen, da die Aktin-Expression konstante Werte zeigte und sich bei Wiederholung des Versuches das gleiche Bild ergab. Die MAPK-Kaskade scheint folglich in erster Linie durch die Phosphorylierung von Proteinen reguliert zu werden.

### **6.1.1 Einfluss der MKP-1 und MKP-3 auf die Regulierung der MAPK**

Um einen weitergehenden Einblick in die ERK-Regulierung zu bekommen, wurde die Proteinexpression der MKP-1 und der für ERK1 und ERK2 spezifischen MKP-3 untersucht.

In eigenen Zellkulturversuchen konnte, wie bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, keine basale Expression der MKP-1 in VSMC gezeigt werden (Brondello et al., 1997; Duff et al., 1995; Li et al., 1999). In den eigenen Experimenten war der Anstieg der MKP-1-Proteinexpression 30 Minuten bzw. 1 Stunde nach Stimulierung der VSMC mit PMA mit einer verminderten ERK1/2-Phosphorylierung bzw. einem Verlust der Phosphorylierung assoziiert. Dies wird auch durch die genannten publizierten Arbeiten gestützt, wobei die Angaben über die Dauer der MKP-1-Expression variieren. Duff et al. beschrieben eine MKP-1-RNA-Expression in VSMC 30 Minuten nach Stimulation mit Angiotensin II, die nach 2 Stunden wieder auf ein basales Niveau zurückkehrte. Wenn mechanischer Stress auf VSMC einwirkte, zeigte sich nach Li et al. eine erhöhte MKP-1-RNA-Expression ebenfalls 30 Minuten nach Stimulation, wobei die

MKP-1-Proteinexpression bis 4 Stunden nach Stimulation signifikant erhöht war. In Fibroblasten wurde MKP-1-Protein nach Beobachtungen von Brondello et al. bis 14 Stunden nach Stimulation mit FCS und bis 2 Stunden nach Stimulation mit PMA exprimiert. Weiterhin konnten Duff et al. zeigen, dass durch Hemmung von MKP-1 die Dephosphorylierung und Inaktivierung von ERK1/2 verzögert wird.

Li et al. und Brondello et al. demonstrierten zusätzlich, dass die MKP-1-Expression erst durch die Kinasen der ERK-Familie induziert wird und dadurch wiederum die MAPK im Sinne einer negativen funktionalen Rückkopplung dephosphoryliert und inaktiviert werden. Der Mechanismus der negativen Rückkopplung wird auch durch die bei Oozyten des Krallenfrosches (*Xenopus*) beobachtete posttranslatorische ERK-vermittelte Regulation gestützt. Dabei wird durch Phosphorylierung des Threoninrestes 168 die MKP-1-Degradation im Proteasom vermindert (Sohaskey et al., 2002). Der schnelle Anstieg der MKP-1-Proteinexpression in den eigenen Experimenten bereits 30 Minuten nach Stimulation ist möglicherweise auf die von Sohaskey et al. beschriebene Blockade des Proteinabbaus zurückzuführen.

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals auch eine erneute, jedoch wesentlich schwächere MKP-1-Expression 12 und 24 Stunden nach Stimulation *in vitro* zeigen. Da zu diesen Zeitpunkten keine aktivierte ERK1/2 mehr nachzuweisen war, könnte hier die von Li et al. beschriebene Aktivierung über die Stress-aktivierten Proteinkinasefamilien eine Rolle spielen (Li et al., 1999).

Bei den hier beschriebenen Versuchen am Rattenmodell zeigte sich wie in vorangegangenen Studien und im Gegensatz zu dem *in-vitro*-Modell das Vorhandensein einer basalen MKP-1-Proteinexpression (Lai et al., 1996; Koyama et al., 1998). Der Verlauf der MKP-1-Expression nach Ballonkatheterverletzung stellte sich wie bei Koyama et al. biphasig dar. Dabei zeigte sich hier der zweite Anstieg der MKP-1-Expression an den Tagen 3 bis 5 deutlich früher als bei Koyama et al., die am Tag 7 und 14 einen zweiten Anstieg assoziiert mit einer verminderten Replikationsrate glatter Gefäßmuskelzellen beschrieben. Der Anstieg der MKP-1-Proteinexpression *in vitro* wurde jeweils von einer ERK1/2-Inaktivierung gefolgt. Dem frühen Anstieg nach 10 Minuten folgte die ERK1/2-Inaktivierung nach 1 Stunde und dem zweiten Anstieg an den Tagen 3 bis 5 die ERK1/2-Inaktivierung an Tag 5. Die stark erhöhte MKP-1-Expression bereits 10 Minuten nach Gefäßverletzung lässt sich wie der schnelle Anstieg der MKP-1-Proteinexpression *in vitro* nicht durch Proteinneusynthese erklären.



Sie ist vielmehr auf die oben beschriebene Phosphorylierung und den dadurch verminderten Abbau im Proteasom zurückzuführen.

Im Vergleich zur MKP-1 ist über die MKP-3, die als einzige der 10 MAK-Phosphatasen nicht zu den so genannten *immediate early genes* gehört, wesentlich weniger bekannt. Untersuchungen an Kulturen glatter Gefäßmuskelzellen und am Rattenmodell der Restenose sind bisher nicht veröffentlicht worden.

Diese Studie konnte zeigen, dass kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen MKP-3 basal nicht exprimieren. Erst 3 Stunden nach Stimulation mit PMA konnte MKP-3-Protein eindeutig detektiert werden und war bis 12 Stunden nach Stimulation nachweisbar.

Nach Groom et al. (1996), die MKP-3 durch Screening einer humanen Hirn-cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)-Bank entdeckten, wird MKP-3 in menschlichen Fibroblasten konstitutiv exprimiert. In diesen Zellen war MKP-3 jedoch weder durch Hitze noch durch oxidativen Stress oder Wachstumsfaktoren induzierbar (Groom et al., 1996).

Für MKP-3 ist wie für MKP-1 in vitro eine posttranslationale Regulation beschrieben. Dabei wird MKP-3 in kultivierten Hamsterfibroblasten durch ERK1/2 an den Serinresten 159 und 197 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt jedoch im Gegensatz zu MKP-1 zu einer verstärkten Degradation im Proteasom und somit zu einer positiven Rückkopplung mit einer verminderten ERK-Inaktivierung (Marchetti et al., 2005). Die hier bei PMA-stimulierten VSMC beschriebene Kinetik der MKP-3-Proteinexpression mit Expression von MKP-3 nach 3, 6 und 12 Stunden lässt sich jedoch nicht durch diesen positiven Rückkopplungsmechanismus erklären, da MKP-3 erst nach vollständiger ERK1/2-Inaktivierung exprimiert wurde.

Im Rattenmodell war eine geringgradige basale MKP-3-Expression zu detektieren. Nach Ballonkatheterverletzung wurde MKP-3 erst am Tag 1 und Tag 2 eindeutig verstärkt exprimiert. Diese gesteigerte MKP-3-Proteinexpression fiel mit dem Zeitpunkt der zweiten ERK-Aktivierung zusammen und wurde von einer vollständigen ERK1/2-Inaktivierung am Tag 3 gefolgt. Der Verlauf der frühen ERK-Aktivierung korrelierte weder in vitro noch in vivo mit der MKP-3-Expression. Auch ist der oben beschriebene positive Rückkopplungsmechanismus mit MKP-3-Phosphorylierung durch ERK1/2 und verstärktem Abbau in vivo genau wie im in-vitro-Modell nicht zutreffend.

Die Korrelation der frühen MKP-1-Expression mit der ERK1/2-Inaktivierung in vitro legt nahe, dass MKP-1 für die Regulierung der MAPK-Kaskade in der Phase der frühen ERK1/2-Aktivierung eine entscheidende Rolle spielt. Auch in vivo wurde der frühe

Anstieg der MKP-1-Expression nach 10 Minuten durch einen Abfall von ERK1/2 auf basale Werte nach 1 Stunde gefolgt. Hingegen scheint die gesteigerte MKP-3-Expression am Tag 1 und 2 die ERK-Inaktivierung nach der zweiten Phase der Aktivierung zu bedingen. Die dritte ERK1/2-Aktivierung am Tag 4 und 5 könnte wieder durch die gesteigerte MKP-1-Expression terminiert worden sein.

Die Mechanismen der Regulation der MAPK-Kaskade werden zusätzlich durch die Beobachtung, dass MKP-3 nicht nur das zeitliche Muster der ERK-Aktivierung reguliert, sondern die Aktivierung der MAPK auch durch Regulation der subzellulären Kompartimentierung beeinflusst wird, noch weiter kompliziert. So kann MKP-3 ERK1/2 im Zytoplasma verankern und die Wirkung auf Transkriptionsfaktoren im Zellkern verhindern, ohne dass aktiviertes ERK1/2 vermindert nachweisbar ist (Karlsson et al., 2004).

## **6.2 Einfluss von PD98059 auf die ERK1/2-Aktivierung und die ERK1/2-Proteinexpression**

Der MEK-Inhibitor PD98059 hemmt die MEK1- und MEK2-Aktivierung durch Raf1 konzentrationsabhängig (Alessi et al., 1995) und führt somit zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der ERK-Aktivität (Reiners et al., 1998).

In dieser Studie zeigte bereits eine Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  PD98059 - nach Alessi et al. beträgt die  $\text{IC}_{50}$  für MEK1 2-7  $\mu\text{M}$  - im Zellkulturversuch eine deutlich verminderte ERK-Aktivität in TPA-stimulierten VSMC. Bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  PD98059 war in vitro keine ERK-Aktivität mehr zu erkennen, ohne dass PD98059 die ERK-Proteinexpression veränderte. Für die Versuche am Rattenmodell der Restenose wurden 200  $\mu\text{l}$  einer 50  $\mu\text{M}$  PD98059-Lösung - nach Alessi et al. entsprach dies der  $\text{IC}_{50}$  für MEK2 - verwendet. Da die MAPK-Kaskade innerhalb von Minuten nach Ballonkatheterverletzung aktiviert wird und der Wirkstoff nach der Verletzung auf die Adventitia aufgetragen wurde, kann ein Effekt auf die frühe ERK-Aktivierung als unwahrscheinlich ausgeschlossen werden. Daher wurde der Effekt auf die MAPK-Kaskade zum Zeitpunkt der zweiten ERK-Aktivierung 24 Stunden nach Stimulation untersucht. Genaue Untersuchungen zur PD98059-Diffusion durch die Gefäßwand und zu den Konzentrationsverläufen innerhalb der Gefäßwandschichten liegen jedoch bisher nicht vor. Untersuchungen von Koyama et al. an Sprague-Dawley-Ratten zeigten eine Reduktion der ERK-Aktivität nach 30 Minuten bei Injektion von 200  $\mu\text{l}$  einer 80  $\mu\text{M}$  PD98059-Lösung direkt in das Lumen der A. carotis communis 60 Minuten vor dem

Eingriff. Dabei wurde nach Abklemmen der proximalen A. carotis communis diese zunächst mit Ringer-Infusionslösung gespült, dann wurde der Wirkstoff injiziert und anschließend die distale A. carotis communis unterbunden. Die A. carotis communis wurde für 1 Stunde so belassen (Koyama et al., 1998). Nach Abschluss des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere Studie veröffentlicht, die den Effekt von PD98059 auf die ERK-Aktivität nach Einbringen in das Gefäß über einen Applikationskanal des Ballonkatheters untersuchte. Im Vergleich zu dieser Arbeit wurde eine PD98059-Lösung mit 200-fach höherer Konzentration (200 µl einer 10 mM PD98059-Lösung) direkt nach Ballonkatheterverletzung in die A. iliaca externa eines Kaninchens verabreicht. Dabei zeigte sich eine ca. 50-prozentige Reduktion der ERK-Enzymaktivität nach 5 Minuten, 30 Minuten und 2 Stunden. Ein Abklemmen der Gefäße wurde nicht beschrieben (Gennaro et al., 2003).

Die Gewebekonzentration bei Anwendung einer 50 µM PD98059-Lösung von außen auf das Gefäß direkt nach Ballonkatheterverletzung schien nach den Daten der vorliegenden Arbeit ausreichend zu sein, weil 24 Stunden später die ERK-Aktivierung fast vollständig verhindert wurde. Auch konnte im Rahmen anderer Dissertationsarbeiten aus diesem Institut (R. Real, A. Weinstrauch; Dissertationschriften in Vorbereitung) gezeigt werden, dass bei einmaliger lokaler Behandlung mit einer 50 µM PD98059-Lösung eine Reduktion des Neointima-Media-Verhältnisses um mehr als 60 % am Tag 14 erreicht wird.

Die sofortige Verabreichung des Inhibitors scheint hierbei entscheidend zu sein. Wenn Tiere am Tag 6 nach Ballondilatation behandelt wurden, wurde die Zellreplikationsrate am Tag 8 in der Media nicht aber in der Intima signifikant gesenkt (Koyama et al., 1998). Wurde hingegen sofort nach Katheterverletzung PD98059 verabreicht, war am Tag 7 die Neointimadicke bei behandelten Tieren signifikant geringer als bei nicht behandelten Tieren (Gennaro et al., 2003).

Neben der Inaktivierung von ERK1/2 durch PD98059 konnte erstmals gezeigt werden, dass die Behandlung zu einer hoch signifikanten Verminderung der ERK1/2-Proteinexpression um ca. 60 % führt. Hierbei scheint es sich nicht um unspezifische oder zytotoxische Effekte zu handeln, weil weder die Aktinexpression durch den Inhibitor beeinflusst wurde noch die Toxizitätsprüfung von PD98059 an VSMC Hinweise auf Zytotoxizität ergab. Auch zeigte sich kein Unterschied in der Zellkernanzahl bei dem Vergleich der Media von PD98059-behandelten mit der Media von Trägerstoff-behandelten Tieren 48 Stunden nach Katheterverletzung (Koyama et al., 1998).

Der Effekt von PD98059 auf die ERK-Proteinexpression könnte durch ein vermindertes Substratangebot an die MEK zu der Unterdrückung der Neointimabildung nach Katheterverletzung beitragen, wie es von Lui et al. durch die Anwendung von ERK1/2-Antisense-Oligonukleotiden am Schweinemodell der Restenose gezeigt wurde (Liu et al., 2002).

### 6.3 Wirkung von PD98059 auf die Ets-1-Expression

Die Expression des ERK-Zielproteins Ets-1 wurde bereits mehrfach durch Stimulationsversuche an glatten Gefäßmuskelzellen untersucht. 1 bis 2 Stunden nach Stimulation zeigte sich eine gesteigerte Expression in VSMC (Hultgardh-Nilsson et al., 1996; Naito et al., 1998; Goetze et al., 2001). Die vorliegende Arbeit konnte dies durch Darstellung maximaler Spiegel von Ets-1-Transkripten eine Stunde nach Stimulation von VSMC mit PMA bestätigen. Die ERK-Abhängigkeit der gesteigerten Ets-1-Proteinexpression 1 Stunde nach Stimulation ließ sich durch suffiziente Ets-1-Suppression durch 25 µM PD98059 belegen. Goetze et al. beschrieben ebenfalls eine ERK-abhängige Ets-1-Expression 1 Stunde nach Stimulation von VSMC mit dem Zytokin *tumor necrosis factor-α* (TNFα). Bei der Stimulation von Endothelzellen scheint der Stimulator einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung der MAPK zu haben. Wurden Endothelzellen der Maus durch einen mechanischen Reiz aktiviert, wurde Ets-1 via p38 MAPK induziert (Tanaka et al., 1998). Wurden sie jedoch durch den Wachstumsfaktor *basic fibroblast growth factor* (bFGF) stimuliert, kam es zu einer ERK-vermittelten Ets-1-Induktion (Tanaka et al., 1999). Nach Stimulation humaner Endothelzellen mit PMA wurde 3 Stunden später eine MAPK-vermittelte maximale Ets-1-Transkription beobachtet (Orzechowski et al., 2001).

Am Rattenmodell wird Ets-1 durch Ballonkatheterverletzung induziert, wobei in vorangegangenen Studien die Ets-1-Expression nach Verletzung der Aorta untersucht wurde (Hultgardh-Nilsson et al., 1996; Goetze et al., 2001). Nach Hultgardt-Nilsson et al. zeigte sich 2 Stunden nach Katheterverletzung eine gesteigerte Ets-1-Transkription, die bis Tag 3 anhielt. Immunhistochemische Untersuchungen derselben Studie zeigten vermehrt Ets-1-Protein in der inneren Mediaschicht der Aorta 2 Stunden nach Dilatation mit Normalisierung 1 Tag später. Unsere Ergebnisse weichen in der Kinetik der gesteigerten Ets-1-Proteinexpression davon ab. Eine Ets-1-Expression war erst ab Tag 1 nach Ballonkatheterverletzung der A. carotis communis zu erkennen und erschien am Tag 3 und Tag 14 noch ausgeprägter. Die Ets-1-Expression am Tag 14

ließ sich mit PD98059 signifikant um mehr als 85 % senken. Diese Beobachtungen lassen auf eine ERK-abhängige Regulierung des Ets-1-Transkriptionsfaktors auch *in vivo* schließen.

Durch immunhistochemische Untersuchungen von Goetze et al. am Tag 14 nach Gefäßverletzung wurden die Transkriptionsfaktoren Ets-1, *early growth response gene-1* (Egr-1) und c-fos in VSMC der Neointima dargestellt. Hierbei wird durch Kolo-kalisation der genannten Faktoren mit dem Zytokin TNF- $\alpha$  und mit aktivierter ERK ebenfalls die ERK-Abhängigkeit der Zytokin-induzierten Stimulation der Transkriptionsfaktoren nahe gelegt (Goetze et al., 2001).

Wie in der Einleitung dargestellt, reguliert Ets-1 als Transkriptionsfaktor die Genexpression der Matrixmetalloproteinasen (MMP). Bei Inhibition der MMP durch das synthetische Hydroxamat GM 6001 zeigte sich bei Zellkerndarstellung mit einem Histon H1-Antikörper, der die Membrana elastica interna nicht überwindet, eine 97-prozentige Reduktion der in die Intima migrierten SMC 4 Tage nach Ballonkatheterverletzung (Bendeck et al., 1994). MMP-9-deletierte Mäuse zeigten verglichen mit Mäusen vom Wildtyp nach Gefäßverletzung eine verminderte Neointimabildung an den Tagen 14 und 28, weniger in die Intima migrierte SMC am Tag 6 und eine verminderte Replikationsrate der SMC am Tag 8 (Cho et al., 2002). In Zellkulturexperimenten führten für 15 Stunden auf SMC wirkende Scherkräfte über eine Herabregulation des PDGF-Rezeptors- $\beta$  zu einer verminderten MMP-Expression, zu einer verminderten Replikation und Migration (Palumbo et al., 2000). Diese Beobachtungen lassen den Einfluss von MMP auf das Remodeling mit Neointimabildung nach Katheterverletzung erkennen. Es ist anzunehmen, dass die PD98059-abhängige Ets-1-Unterdrückung durch verminderte MMP-Expression einen wichtigen Anteil an der Neointimareduktion bei behandelten Tieren hat.

#### **6.4 PD98059 als Proliferationshemmer glatter Gefäßmuskelzellen**

Nach Gefäßverletzung ist die Gefäßmuskelzellproliferation, wie in der Einleitung beschrieben, hauptverantwortlich für die Neointimabildung.

In dieser Studie wurde die proliferative Aktivität der glatten Muskelzellen anhand von Western-Blot-Analysen der *proliferating-cell-nuclear-antigen* (PCNA)-Expression verbunden mit einer immunhistochemischen Analyse untersucht. Dabei zeigte sich bei Versuchen am Rattenmodell am Tag 3 nach Ballonkatheterverletzung eine gesteigerte proliferative Aktivität, die am Tag 14 noch größer war. Die immunhistochemische

Untersuchung am Tag 14 ließ erkennen, dass die Proliferation zu diesem Zeitpunkt ausschließlich in VSMC der Neointima stattfindet. Diese gesteigerte proliferative Aktivität am Tag 14 war durch Behandlung der Tiere mit PD98059 signifikant um mehr als 85 % zu senken. Die Unterdrückung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen scheint demnach der entscheidende Effekt des MEK-Inhibitors PD98059 für die Reduktion der Neointimabildung zu sein.

Eine verminderte mediale Muskelzellproliferation durch PD98059-Behandlung am Tag 2 und Tag 7 nach Verletzung wurde durch Untersuchung des Einbaus von 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) in die DNA nachgewiesen (Koyama et al., 1998; Gennaro et al., 2003).

Es kann davon ausgegangen werden, dass alle Methoden, die eine antiproliferative Wirkung auf VSMC haben, zu einer Reduktion der Neointimabildung und somit zu einer Verringerung der Gefahr der Restenosierung führen. So kam es beispielsweise durch Verhinderung der Progression des Zellzyklus durch gesteigerte Expression eines *cyclin-depend-kinase-2* (cdk2)-Inhibitors zu einer verminderten Neointimabildung 2 Wochen nach Katheterverletzung (Chen et al., 1997). Eine im klinischen Alltag in der interventionellen Kardiologie angewandte Methode zur Vermeidung der Restenosierung nach PTCA ist der Einsatz beschichteter Stents. Diese medikamentenbeschichteten Stents (*drug eluting stents*, DES) sollen durch Freisetzung eines Zytostatikums (Paclitaxel) oder eines antiproliferativ wirkenden Immunsuppressivums (Sirolimus) verhindern, dass die Drahtprothese durch Proliferation VSMC überwuchert wird und es zur Restenosierung kommt. Seit 2002 werden Sirolimus (Rapamycin)-beschichtete Stents immer häufiger verwendet (Ong et al., 2005). Sirolimus ist ein Makrolidantibiotikum, das ursprünglich als Antimykotikum Anwendung finden sollte. Aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung - es inhibiert die Zytokin-induzierte Proliferation von Lymphozyten und wirkt synergistisch mit Cyclosporin A - kam Sirolimus zunächst in dieser Funktion nach Organtransplantation zum Einsatz, bis seine antiproliferativen Effekte auf VSMC entdeckt wurden (Marx und Marks, 2001). In der randomisierten, doppelblinden, multizentrischen Studie RAVEL, die 238 Patienten mit einer de-novo-Stenose einschloss, wurden Sirolimus-beschichtete Stents mit unbeschichteten Metallstents (*bare metal stents*, BMS) verglichen. Dabei war nach 6 Monaten der Lumenverlust bei der Gruppe, die beschichtete Stents erhalten hatten, signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe. Restenosen mit mehr als 50 % Lumenverlust kamen bei der Sirolimus-Gruppe nicht vor, verglichen mit 26,6 % bei der

Kontrollgruppe. Zu so genannten *major adverse cardiac events* (MACE: kardialer Tod, nicht-tödlicher Myokardinfarkt, Bypass-Operation, Re-PTCA) kam es bei 5,8 % der Sirolimus-Gruppe und bei 28,8 % der Kontrollgruppe (Morice et al., 2002). Auch in Untersuchungen über einen Zeitraum von 2 oder 3 Jahren schienen sich zunächst die Vorteile der beschichteten Stents mit verminderten Lumenverlust und besserem klinischen Outcome zu bestätigen (Fajadet et al., 2005; Sousa et al., 2003). Erst seit Frühjahr 2006 gab es, wie in Kapitel 6.7 beschrieben, erste Hinweise für ein erhöhtes Risiko von tödlichen Spätthrombosen bei DES.

### 6.5 Effekt von PD98059 auf die Apoptose

In atherosklerotischen Läsionen und in Regionen der Restenose nach Angioplastie sind neben proliferierenden glatten Muskelzellen gehäuft apoptotische VSMC zu finden (Isner et al., 1995). Im Rattenmodell der Neointima wurde eine frühe, sehr ausgeprägte Apoptose in der Media bereits 30 Minuten nach Katheterverletzung beschrieben (Perlman et al., 1997; Pollman et al., 1999). Nach Durand et al. zeigte sich beim Kaninchen sowohl in der Media als auch in der Neointima die größte Proliferationsrate 3 Tage nach Katheterverletzung und die größte Apoptoserate 4 Tage später. Zu den apoptotischen Zellen zählten vor allem VSMC, seltener auch Makrophagen. Der nach Katheterverletzung resultierende Stenosegrad korrelierte invers mit der Apoptoserate in der Neointima (Durand et al., 2002). Das Verhältnis von Apoptose zu Proliferation bestimmt also den Grad der Neointimabildung und Stenose nach Katheterverletzung. Ein Medikament, das die Neointimabildung hemmt, kann folglich über eine gesteigerte Apoptose, eine verminderte Proliferation oder beides wirken.

Wie in Kapitel 6.4 dargelegt, besteht der Haupteffekt von PD98059, der zu einer Neointimareduktion nach Ballonkatheterverletzung führt, in der Proliferationshemmung. Ob PD98059 zusätzlich seine Wirkung über die Erhöhung der Apoptoserate entfaltet, wie es unter anderem für die Antihypertensiva Nifedipin und Captopril beschrieben wurde (Holm et al., 2000; Lemay et al., 2001), wurde durch Western-Blot-Analysen der Expression des anti-apoptotischen Onkogens Bcl-2 und des pro-apoptotischen Proteins Bax untersucht. Das Onkogen Bcl-2 ist ein integrales Membranprotein, das in Membranen von Zellorganellen (z. B. Mitochondrium, endoplasmatisches Retikulum) und in der Kernmembran lokalisiert ist (Krajewski et al., 1993). Es unterdrückt die Apoptose durch Hemmung der Cysteinprotease Caspase (Renvoize et al., 1997). Das Bcl-2-assoziierte Protein Bax reagiert hingegen als Stimulator der Caspase. Das

Verhältnis von Bcl-2 zu Bax bestimmt demnach über Überleben oder Zelltod nach Einwirken von Apoptose-Stimuli (Cheng et al., 1997).

In dieser Arbeit konnte eine gesteigerte Apoptoserate am Rattenmodell nach Katheterverletzung durch eine erhöhte Bax-Proteinexpression am Tag 3 und noch deutlicher am Tag 14 dargestellt werden. Damit bestätigten sich die Ergebnisse vorangegangener Arbeiten, die eine erhöhte Apoptoserate bis Tag 14 beschrieben (Durand et al., 2002; Malik et al., 1998). In mit PD98059-behandelten Tieren wurde im Vergleich zu nicht behandelten Tieren am Tag 14 eine signifikante, um 50 % verminderte Bax-Expression bei gesteigerter Bcl-2-Expression gefunden. Dieses Resultat schließt eine Apoptoseinduktion durch MEK-Inhibition nicht nur aus, vielmehr scheint die Apoptoserate bei PD98059-behandelten Tieren 14 Tage nach Katheterverletzung sogar niedriger zu sein als bei unbehandelten Tieren. Der zur Neointimareduktion führende Effekt der MEK-Inhibition beruht demnach ausschließlich auf der Proliferationshemmung, nicht aber auf Apoptose glatter Muskelzellen.

### **6.6 Grenzen des verwendeten Rattenmodells**

Die Übertragbarkeit von Ergebnissen tierexperimenteller endovaskulärerer Studien auf das menschliche System ist ein viel diskutiertes Problem. Eine Alternative zum Tierversuch ist die Forschung an Zellkulturen, die in letzter Zeit einen erheblichen Aufschwung erfahren hat. Molekulare Mechanismen lassen sich an kultivierten Zelllinien sehr gut untersuchen, die Versuche sind jederzeit reproduzierbar, und es gibt keine interindividuellen Schwankungen. Der gravierende Unterschied eines Zellmonolayers in einer Kulturschale gegenüber einem vitalen Organismus besteht darin, dass ein Organismus aus über 200 unterschiedlich ausdifferenzierten Zellen besteht, deren Zusammenspiel in Organen und Gewebeverbänden koordiniert wird (Exner et al., 2004). In-vitro-Versuche an Zellkulturen haben grundlegende Erkenntnisse der Pathophysiologie der Atherosklerose und der Restenose erbracht. Mit ihnen kann jedoch das komplexe Zusammenspiel der beteiligten Faktoren, wie es in vivo in der durchbluteten Arterie geschieht, nicht vollständig simuliert werden (Johnson et al., 1999).

Die Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse aus dem hier verwendeten Rattenmodell auf die Restenose beim Menschen ist zum einen dadurch limitiert, dass das verletzte Gefäß (A. carotis communis) strukturell von der menschlichen Koronararterie abweicht. Die Koronararterie des Menschen ist eine Arterie von muskulärem Typ, hingegen zählt



die A. carotis communis der Ratte zu den elastischen Arterien. Zum anderen waren die Versuchstiere junge, gesunde Ratten. Die KHK-Patienten, die sich einer PTCA unterziehen müssen, sind hingegen meist ältere Menschen, deren Gefäße atherosklerotisch verändert sind. Häufig liegen zusätzlich die für die KHK bekannten Risikofaktoren vor. Zu den wichtigsten vermeidbaren Risikofaktoren der KHK zählen nach der *American Heart Association* Rauchen, Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Bewegungsmangel, Übergewicht und Diabetes mellitus.

Entscheidend ist die Frage, ob die PD98059-vermittelte MEK-Inhibition eine Restenose auf dem Boden einer Plaqueläsion verhindern kann. Bisher sind Tierversuche nur bei Vorliegen von einzelnen Risikofaktoren oder von Atherosklerose alleine durchgeführt worden.

Seit Längerem ist bekannt, dass ein erhöhter arterieller Blutdruck die MAPK-Kaskade in der Arterienwand aktiviert und somit zu Muskelzellproliferation und Remodeling führen kann (Xu et al., 1996). *Spontaneously hypertensive rats* (SHR) zeigten bei kurzfristiger PD98059-Behandlung eine Verminderung der konstitutiv erhöhten ERK-Aktivität in den kleinen viszeralen Arterien mit Verbesserung der Endothel-vermittelten Relaxation und Herabsetzung der Kontraktilität. Der Blutdruck und die Morphologie der Gefäße wurde nicht beeinflusst (Touyz et al., 2002).

Bei immunhistochemischen Untersuchungen an mit Fructose-gefütterten LDL-Rezeptor-defizienten Ratten zeigte sich in den atherosklerotischen Läsionen ebenso wie in der Neointima gesunder Tiere eine TNF $\alpha$ -induzierte ERK-Aktivierung. Diese Aktivierung war mit einer gesteigerten Expression von den von ERK1/2 phosphorylierten Transkriptionsfaktoren Ets-1, Egr-1 und c-fos verbunden. Die gesteigerte ERK-Aktivität ließ sich sowohl in Kulturen neointimaler VSMC als auch in Makrophagenkulturen aus atherosklerotischen Läsionen durch PD98059 signifikant hemmen (Goetze et al., 2001). Eine Reduktion der Restenose durch PD98059-vermittelte MEK-Inhibition am Tiermodell der koronaren Atherosklerose wurde bisher noch nicht gezeigt.

Die altersabhängig gesteigerte Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen führt zu einer erhöhten Prävalenz und einem gesteigerten Schweregrad der Atherosklerose (Folkow und Svanborg, 1993). Ebenso ist das Altern mit einer gesteigerten Muskelzellproliferation nach Ballonkatheterverletzung am Rattenmodell verbunden (Stemerman et al., 1982). Bei Stimulation VSMC (gewonnen aus der Aorta von Kaninchen) mit Serum zeigte sich bei Zellen älterer Tiere nach 5 und 30 Minuten eine um ca. 50 % höhere ERK-Aktivität und nach 24 Stunden eine um 80 % höhere Proliferationsrate als bei

Zellen jüngerer Tiere. Nach Inkubation der Zellen für 24 Stunden mit einer 50  $\mu$ M PD98059-Lösung zeigte sich bei jungen und alten VSMC eine deutliche Reduktion der ERK-Aktivität und der Proliferation, wobei die Aktivität und die Proliferationsrate bei den alten Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten über der bei den jungen Zellen lag. Nach Katheterverletzung der A. femoralis beim Kaninchen wurde gezeigt, dass der gesteigerten Proliferation und Neointimabildung bei älteren Tieren eine erhöhte ERK-Aktivität zu Grunde liegt, welche durch eine im Vergleich mit dieser Arbeit 200-fach höheren Dosis PD98059 signifikant gehemmt wurde (Gennaro et al., 2003).

Der MEK-Inhibitor PD98059 scheint folglich auch bei atherosklerotischen Gefäßen und bei Vorliegen von Risikofaktoren seine Wirksamkeit über die ERK-Inhibition und anschließende Proliferationshemmung, wie die vorliegende Arbeit es für Gefäße junger und gesunder Sprague-Dawley Ratten zeigte, zu entfalten. Somit haben Experimente an gesunden Tieren durchaus ihre Berechtigung und sind eine gute Möglichkeit, grundlegende Daten zu eruieren. Welche Einschränkungen im Einzelnen bei der Übertragbarkeit der tierexperimentellen Daten auf den KHK-Patienten zu beachten sind, wird erst die weitere Forschung zeigen können.

### **6.7 Mögliche klinische Bedeutung der MEK-Inhibition für die pharmakologische Prävention der Restenose**

Ob die Anwendung von MEK-Inhibitoren eine Alternative zu den Sirolimus-beschichteten Stents darstellt, wird erst durch weitere Untersuchungen gezeigt werden können. Bisher schien der Sirolimus-beschichtete Stent anderen Konkurrenzprodukten, wie dem Paclitaxel-freisetzendem Stent, überlegen zu sein, wie zwei randomisierte klinische Studien aus dem Jahr 2005 zeigten (Dibra et al., 2005; Windecker et al., 2005). Bis im März 2006 auf der Jahrestagung des *American College of Cardiology* die Ergebnisse der BASKET-LATE-Studie vorgestellt wurden, nahm die Verbreitung der DES im Vergleich zu den BMS immer weiter zu (Richartz und Silber, 2006). Im Jahr 2005 lag der Anteil der DES in den USA und der Schweiz bei 90 % (Carlsson, 2007). Die BASKET-LATE-Studie wies jedoch auf ein erhöhtes Risiko tödlicher Spätthrombosen in DES hin. Sowohl die Rate des kombinierten Endpunktes Herztod und nicht tödlicher Herzinfarkt (4,9 % versus 1,3 %) als auch die der dokumentierten Stentthrombosen (2,6 % versus 1,3 %) war, nachdem 6 Monate nach Stentimplantation Clopidogrel abgesetzt wurde, in der DES-Gruppe signifikant höher als in der BMS-Gruppe (Pfisterer et al., 2006). Die Untersuchungen des Schwedischen

Patientenregisters (*Swedish Coronary Angiography and Angioplasty Registry, SCAAR*) mit 13.738 Patienten bestätigten die Bedenken der BASKET-LATE-Studie (Lagerqvist et al., 2007). Es sind noch weitere Langzeitbeobachtungen randomisierter klinischer Studien abzuwarten, um den Langzeiteffekt DES abschließend beurteilen zu können.

Aber nicht nur die postulierte erhöhte Spätthromboserate sondern auch die hohen Kosten eines Sirolimus-beschichteten Stents - ca. 2000 € kostet der *cypher® Sirolimus-eluting Coronary Stent* von Johnson & Johnson - legen nahe, nach Alternativen zu suchen.

Der von uns untersuchte MEK-Inhibitor PD98059 wird zur Reduktion der Restenose nach Ballonkatheterverletzung lokal verabreicht. In der vorliegenden Studie wurde der Inhibitor nach Katheterverletzung außen auf das Gefäß aufgetragen. In anderen Studien wurde der Wirkstoff wie in Kapitel 6.2 beschrieben direkt in das Gefäß appliziert (Gennaro et al., 2003) bzw. das Gefäß in einer Studie zusätzlich für 1 Stunde nach Injektion von PD98059 abgeklemmt (Koyama et al., 1998). Diese lokale Anwendung des MEK-Inhibitors PD98059 wäre wie der Einsatz beschichteter Stentsystems in der klinischen Verwendung nur zum Zeitpunkt des Eingriffes möglich. Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass PD98059 auch systemisch anwendbar ist. *Spontaneously hypertensive rats* (SHR) zeigten bei subkutaner Applikation von 20 mg/kgKG PD98059 eine verminderte ERK-Aktivierung (Touyz et al., 2002). Bei intravenöser Verabreichung von PD98059 in einer Dosierung von 10 mg/kgKG wurde die Angiotensin II-induzierte ERK-Aktivierung in der Aorta der Ratte gehemmt (Daigle et al., 2004). Inwieweit sich ERK-Aktivierung und die Neointimabildung nach Katheterverletzung durch systemische PD98059-Behandlung hemmen lassen und welche negativen Effekte eine systemische Applikation haben könnte, muss noch gezeigt werden.

Als vielversprechend erscheint der neue oral zu applizierende MEK-Inhibitor PD0185625 bei Untersuchungen am Rattenmodell der Restenose. Er führte wie PD98059 zu einer konzentrationsabhängigen ERK1/2-Inhibition sowohl in vitro als auch in vivo. Erhielten die Tiere PD0185625 in einer Dosierung von 200 mg/kgKG per os ab 2 Tage vor dem Eingriff für maximal 14 Tage, zeigte sich am Tag 7 eine verminderte Proliferationsrate in Media und Neointima ohne Erhöhung der Apoptoserate. Am Tag 14 und Tag 28 stellte sich eine signifikante Neointimareduktion bei behandelten Tieren dar (Gennaro et al., 2004). Ein systemisch zu verabreichender MEK-Inhibitor könnte sich durch möglicherweise geringere Kosten, einfache und zeitlich unbegrenzte Verabreichung und Anwendbarkeit auch in schwierigen Situationen

(Mehrfäßkrankungen, schwierige anatomische Verhältnisse, Erkrankung der kleinen Gefäße) gegenüber beschichteten Stents auszeichnen.

Ein weiterer Vorteil der MEK-Inhibitoren ist ihre Wirkungsweise. PD98059 wirkt, wie die vorliegende Arbeit zeigen konnte, nur proliferationshemmend und nimmt keinen Einfluss auf die Apoptose. Das Gleiche gilt für den oralen MEK-Inhibitor PD0185625 (Gennaro et al., 2004). Die beiden gängigen, zur Stentbeschichtung eingesetzten Medikamente Sirolimus und Paclitaxel haben hingegen sowohl zytostatische als auch zytotoxische Effekte und greifen folglich viel aggressiver in die pathophysiologischen Regulationsmechanismen nach PTCA ein. Eine systemische Anwendbarkeit dieser beiden Medikamente zur Vermeidung der Restenose nach PTCA ist aufgrund der Nebenwirkungen nicht vertretbar. Ob die nur proliferationshemmenden MEK-Inhibitoren bessere Langzeitergebnisse als die DES haben werden, bleibt abzuwarten.

Zellkulturversuche zum Wirkungsmechanismus von Sirolimus zeigten, dass die Proliferation von VSMC und die Matrixsynthese in einer ERK-unabhängigen Weise gehemmt werden (Park et al., 2005). Vielmehr verhinderte Sirolimus in vitro und bei in-vivo-Versuchen am Rattenmodell die Aktivierung von p38 MAPK und JNK und könnte dadurch die nach 14 Tagen beobachtete Neointimareduktion vermitteln (Omura et al., 2005). Im Rahmen einer anderen Dissertationsarbeit aus diesem Institut (R. Real, Dissertationsschrift in Vorbereitung) konnte gezeigt werden, dass durch p38-Inhibition in vivo am Rattenmodell der Restenose nach 14 Tagen eine ca. 25-prozentige Reduktion des Neointima-Media-Verhältnisses und ein Lumengewinn von ca. 10 % erreicht werden. Dabei wurde eine 60 µM SB203580-Lösung, ein p38-Inhibitor der ersten Generation, einmalig nach Katheterverletzung von außen auf das Gefäß appliziert. Da bei immunhistochemischen Untersuchungen von SB203580 in vivo am Tag 14 ein Anstieg der apoptischen Zellen um 50 % nachweisbar war, wird die gezeigte Neointimareduktion durch p-38-Inhibition auf gesteigerte Apoptose zurückgeführt. Auch die systemische Anwendung des p38-Inhibitors SB239063 der zweiten Generation führte bei Anwendung von 2 Tagen vor Ballonkatheterverletzung bis Tag 28 zu einer ca. 25-prozentigen Reduktion des Neointima-Media-Verhältnisses und zu einem Lumengewinn von ca. 15 %. SB239063 wurde bei dieser Studie in einer Dosis von 50 mg/kgKG täglich intravenös appliziert (Ju et al., 2002). Die Inhibition von JNK durch den JNK-Inhibitor SP600125 wurde bisher nur in vitro im Zellkultorexperiment untersucht. Bei Inkubation von VSMC mit 30 µM SP600125-Lösung zeigte sich eine um ca. 50 % verminderte Migration der Zellen nach Stimulation mit Angiotensin II (Kyaw et al., 2004).

Sirolimus und MEK-Inhibitoren haben also einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus. Bei einer Kombination dieser beiden Wirkstoffe könnte eine geringere Konzentration des zytostatisch und zytotoxisch wirksamen Sirolimus zur Vermeidung von Restenosen nach PTCA ausreichend sein und dadurch das Risiko tödlicher Spätthrombosen in DES möglicherweise gesenkt werden.

Bewahrheiten sich die genannten Vorteile in weiteren Studien, dann könnten systemisch anwendbare MEK-Inhibitoren in der Zukunft eine geeignete Prävention der in-Stent-Restenose, entweder als Alternative zu einem beschichteten Stentsystem oder in Kombination mit diesem, darstellen.

## 7 Zusammenfassung

Bei der Angioplastie atherosklerotischer Gefäße stellt die Restenose durch neointimale Hyperplasie auch bei Stentimplantation eine häufige Spätkomplikation dar, die durch den Einsatz spezifischer Medikamente verhindert werden soll. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass pharmakologische Inhibition der ERK/MAP-Kinasen durch lokale Applikation von PD98059 die Neointimabildung im Verletzungsmodell der A. carotis der Ratte mittels Proliferationshemmung glatter Gefäßmuskelzellen supprimiert.

Western-Blot-Analysen des Zeitverlaufs der ERK1/2-Phosphorylierung und damit der Aktivierung von ERK1/2 zeigten ein triphasiges Muster mit Nachweis einer Phosphorylierung nach 10 Minuten, nach 24 Stunden und nach 4 bis 5 Tagen. Für die Regulierung der MAPK-Kaskade scheint MKP-1 in der Phase der frühen und der späten ERK1/2-Aktivierung und MKP-3 in der Phase der zweiten Aktivierung nach 24 Stunden eine entscheidende Rolle zu spielen.

Bei den in-vivo-Untersuchungen wurde ein Gel mit 50  $\mu$ M PD98059 einmalig unmittelbar nach Ballonkatheterverletzung auf die Adventitia des Gefäßes gegeben, wodurch die ERK-Phosphorylierung einen Tag nach Katheterverletzung fast vollständig verhindert wurde. Unerwartet wurde eine Verminderung der ERK-Proteinexpression um ca. 60 % beobachtet, die zur Unterdrückung der Neointimabildung beitragen könnte. Die Proteinexpression des ERK-Zielgens Ets-1, das durch Genregulation der MMP einen entscheidenden Anteil an der Neointimabildung hat, ließ sich durch PD98059 sowohl in vitro als auch in vivo hemmen. In vivo sank die Ets-1-Proteinexpression bei behandelten Tieren an Tag 14 um mehr als 85 %.

Da das Verhältnis von Apoptose zu Proliferation den Grad der Neointimaproliferation nach Angioplastie bestimmt, wurde die Expression des Proliferationsmarkers PCNA untersucht. PCNA wurde am Tag 14 ausschließlich in der Neointima nachgewiesen und durch Behandlung mit PD98059 um mehr als 85 % vermindert. Eine Apoptoseinduktion durch PD98059-Behandlung wurde durch Untersuchungen der Bax- und bcl-2-Proteinexpression ausgeschlossen. Der zur Neointimareduktion führende Effekt von PD98059 beruht demnach nur auf der Proliferationshemmung.

Im Unterschied zu Sirolimus und Paclitaxel, die derzeit in *drug-eluting stents* eingesetzt werden, haben wir für den hier untersuchten MEK-Inhibitor PD98059 keine Hinweise auf Zytotoxizität gefunden.

Eine pharmakologische MEK-Inhibition stellt nach den hier vorgelegten Ergebnissen eine Option zur Prävention der in-Stent-Restenose beim Menschen dar.

## 8 Literaturverzeichnis

**Ahn NG**, Nahreini TS, Tolwinski NS, Resing KA. Pharmacologic inhibitors of MKK1 and MKK2. *Methods Enzymol.* **2001**; 332: 417-31.

**Alfke H**, Boger RH, Bode-Boger SM. Restenosis after percutaneous transluminal angioplasty: I. Etiology and clinical significance. *Vasa.* **1996**; 25(1): 13-20.

**Alessi DR**, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* **1995**; 270(46): 27489-94.

**Bendeck MP**, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res.* **1994**; 75(3): 539-45.

**Bhat NK**, Komschlies KL, Fujiwara S, et al. Expression of ets genes in mouse thymocyte subsets and T cells. *J Immunol.* **1989**; 142(2): 672-8.

**Brondello JM**, Brunet A, Pouyssegur J, McKenzie FR. The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *J Biol Chem.* **1997**; 272(2): 1368-76.

**Camps M**, Nichols A, Arkininstall S. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J.* **2000**; 14(1): 6-16.

**Canagarajah BJ**, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith EJ. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell.* **1997**; 90(5): 859-69.

**Carlsson J**. Medikamentenbeschichtete Stents. Verwirrung und Ernüchterung in der invasiven Kardiologie. *Deutsches Ärzteblatt.* **2007** 104(3): 86-7.

**Casscells W**. Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. *Circulation.* **1992**; 86(3): 723-9.

**Chen D**, Krasinski K, Sylvester A, Chen J, Nisen PD, Andres V. Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27(KIP1), an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery. *Clin Invest.* **1997**; 99(10): 2334-41.

**Cheng EH**, Kirsch DG, Clem RJ, et al. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science.* **1997**; 278(5345): 1966-8.

**Cho A**, Reidy MA. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ Res.* **2002**; 91(9): 845-51.

**Clowes AW**, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest.* **1983**; 49(2): 208-15.



**Cohen P.** The search for physiological substrates of MAP SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol.* **1997**; 7(9): 353-61.

**Daigle C,** Martens FM, Girardot D, Dao HH, Touyz RM, Morceau P. Signaling of angiotensin II-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries in vivo. *BMC Cardiovasc Disord.* **2004**; 4:6.

**Dekker LV,** Parker PJ. Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci.* **1994**; 19(2): 73-7.

**Dibra A,** Kastrati A, Mehilli J, et al. Paclitaxel-eluting or sirolimus-eluting stents to prevent restenosis in diabetic patients. *N Engl J Med.* **2005**; 353(7): 663-70.

**Dudley DT,** Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1995**; 92(17): 7686-9.

**Duff JL,** Monia BP, Berk BC. Mitogen-activated protein (MAP) kinase is regulated by the MAP kinase phosphatase (MKP-1) in vascular smooth muscle cells. Effect of actinomycin D and antisense oligonucleotides. *J Biol Chem.* **1995**; 270(13): 7161-6.

**Durand E,** Mallat Z, Addad F, et al. Time courses of apoptosis and cell proliferation and their relationship to arterial remodeling and restenosis after angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. *J Am Coll Cardiol.* **2002**; 39(10): 1680-5.

**Exner C,** Bode HJ, Blumer K, Giese C. Deutsche Forschungsgemeinschaft. Tierversuche in der Forschung. *Lemmens Vertrags- & Mediengesellft.* **2004**.

**Fajadet J,** Morice MC, Bode C, et al. Maintenance of long-term clinical benefit with sirolimus-eluting coronary stents: three-year results of the RAVEL trial. *Circulation.* **2005**; 111(8): 1040-4.

**Favata MF,** Horiuchi KY, Manos EJ, et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem.* **1998**; 273(29): 18623-32.

**Folkow B,** Svanborg A. Physiology of cardiovascular aging. *Physiol Rev.* **1993** ; 73(4): 725-64.

**Gennaro G,** Menard C, Giasson E, et al. Role of p44/p42 MAP kinase in the age-dependent increase in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2003**; 23(2): 204-10.

**Gennaro G,** Menard C, Michaud SE, Deblois D, Rivard A. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation in injured arteries by a novel, oral mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase inhibitor. *Circulation.* **2004**; 110(21): 3367-71.

**Goetze S,** Kintscher U, Kaneshiro K, et al. TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis.* **2001**; 159(1): 93-101.

**Graf K**, Xi XP, Yang D, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. **1997**; 29(1 Pt 2): 334-9.

**Groom LA**, Sneddon AA, Alessi DR, Dowd S, Keyse SM. Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *EMBO J*. **1996**; 15(14): 3621-32.

**Ju H**, Nerurkar S, Sauermelch CF, Olzinski AR, et al. Sustained activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to the vascular response to injury. *J Pharmacol Exp Ther*. **2002**; 301(1): 15-20.

**Hattori Y**, Kakishita H, Akimoto K, Matsumura M, Kasai K. Glycated serum albumin-induced vascular smooth muscle cell proliferation through activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*. **2001**; 281(4): 891-6.

**Heijenbrok FJ**, van der Wal AC, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. Morphologic and functional consequences of intimal hyperplasia in the rat carotid artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. **1998**; 357(2): 133-142.

**Holm AM**, Andersen CB, Haunso S, Hansen PR. ACE-inhibition promotes apoptosis after balloon injury of rat carotid arteries. *Cardiovasc Res*. **2000**; 45(3): 777-82.

**Hu Y**, Cheng L, Hochleitner BW, Xu Q. Activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/JNK) and AP-1 transcription factor in rat carotid arteries after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **1997**; 17(11): 2808-16.

**Hu Y**, Bock G, Wick G, Xu Q. Activation of PDGF receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress. *FASEB J*. **1998**; 12(12): 1135-42.

**Hultgardh-Nilsson A**, Cercek B, Wang JW, et al. Regulated expression of the ets-1 transcription factor in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Circ Res*. **1996**; 78(4): 589-95.

**Ip JH**, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol*. **1990**; 15(7): 1667-87.

**Isner JM**, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*. **1995**; 91(11): 2703-11.

**Johnson GJ**, Griggs TR, Badimon L. The Utility of Animal Models in the Preclinical Study of Interventions to Prevent Human Coronary Artery Restenosis: Analysis and Recommendations. *Thromb Haemost*. **1999**; 81(5): 835-43.

**Johnson GL**, Vaillancourt RR. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol*. **1994**; 6(2): 230-8.

**Ju H**, Nerurkar S, Sauermelch CF, et al. Sustained activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to the vascular response to injury. *J Pharmacol Exp Ther.* **2002**; 301(1): 15-20.

**Karlsson M**, Mathers J, Dickinson RJ, Mandl M, Keyse SM. Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. *J Biol Chem.* **2004**; 279(40): 41882-91.

**Kazlauskas A**, Cooper JA. Protein kinase C mediates platelet-derived growth factor-induced tyrosine phosphorylation of p42. *J Cell Biol.* **1988**; 106(4): 1395-402.

**Keyse SM**. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol.* **2000**; 12(2): 186-92.

**Koyama H**, Olson NE, Dastvan FF, Reidy MA. Cell replication in the arterial wall: activation of signaling pathway following in vivo injury. *Circ Res.* **1998**; 82(6): 713-21.

**Krajewski S**, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* **1993**; 53(19): 4701-14.

**Kyaw M**, Yoshizumi M, Tsuchiya K, et al. Src and Cas are essentially but differentially involved in angiotensin II-stimulated migration of vascular smooth muscle cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Mol Pharmacol.* **2004**; 65(4): 832-41.

**Laemmli UK**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **1970**; 227(5259): 680-5.

**Lagerqvist B**, James SK, Stenestrand U, Lindback J, Nilsson T, Wallentin L; SCAAR Study Group. Long-term outcomes with drug-eluting stents versus bare-metal stents in Sweden. *N Engl J Med.* **2007**; 356(10): 1009-19.

**Lai K**, Wang H, Lee WS, Jain MK, Lee ME, Haber E. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in rat arterial smooth muscle cell proliferation. *J Clin Invest.* **1996**; 98(7): 1560-7.

**Lemay J**, Tea BS, Hamet P, deBlois D. Regression of neointimal lesions in the carotid artery of nifedipine-treated SHR and WKY rats: possible role of apoptosis. *J Vasc Res.* **2001**; 38(5): 462-70.

**Li C**, Hu Y, Mayr M, Xu Q. Cyclic strain stress-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Ras/Rac-MAPK pathways. *J Biol Chem.* **1999**; 274(36): 25273-80.

**Libby P**, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. *Circulation.* **1992**; 86(6 Suppl): III47-52.

**Lille S**, Daum G, Clowes MM, Clowes AW. The regulation of p42/p44 mitogen-activated protein kinases in the injured rat carotid artery. *J Surg Res.* **1997**; 70(2): 178-86.

**Liu B**, Fisher M, Groves P. Down-regulation of the ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases using antisense oligonucleotides inhibits intimal hyperplasia in a porcine model of coronary balloon angioplasty. *Cardiovasc Res.* **2002**; 54(3): 640-8.

**Liu WS**, Heckman CA. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal.* **1998**; 10(8): 529-42.

**Lowe HC**, Oesterle SN, Khachigian LM. Coronary in-stent restenosis: current status and future strategies. *J Am Coll Cardiol.* **2002**; 39(2): 183-93.

**Malik N**, Francis SE, Holt CM, et al. Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty. *Circulation.* **1998**; 98(16): 1657-65.

**Marchetti S**, Gimond C, Chambard JC, et al. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. *Mol Cell Biol.* **2005**; 25(2): 854-64.

**Marquardt B**, Frith D, Stabel S. Signalling from TPA to MAP kinase requires protein kinase C, raf and MEK: reconstitution of the signalling pathway in vitro. *Oncogene.* **1994**; 9(11): 3213-8.

**Marx SO**, Marks AR. Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis. *Circulation.* **2001**; 104(8): 852-5.

**McCarthy SA**, Chen D, Yang BS, et al. Rapid phosphorylation of Ets-2 accompanies mitogen-activated protein kinase activation and the induction of heparin-binding epidermal growth factor gene expression by oncogenic Raf-1. *Mol Cell Biol.* **1997**; 17(5): 2401-12.

**Morice MC**, Serruys PW, Sousa JE, et al. Randomized Study with the Sirolimus-Coated Bx Velocity Balloon-Expandable Stent in the Treatment of Patients with de Novo Native Coronary Artery Lesions. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med.* **2002**; 346(23): 1773-80.

**Muda M**, Theodosiou A, Gillieron C, et al. The mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 N-terminal noncatalytic region is responsible for tight substrate binding and enzymatic specificity. *J Biol Chem.* **1998**; 273(15): 9323-9.

**Naito S**, Shimizu S, Maeda S, Wang J, Paul R, Fagin JA. Ets-1 is an early response gene activated by ET-1 and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* **1998**; 274(2 Pt 1): C472-80.

**Omura T**, Yoshiyama M, Izumi Y, et al. Involvement of c-Jun NH2 terminal kinase and p38MAPK in rapamycin-mediated inhibition of neointimal formation in rat carotid arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* **2005**; 46(4): 519-25.

**Ong AT**, Serruys PW. Drug-eluting stents: current issues. *Tex Heart Inst J*. **2005**; 32(3): 372-7.

**Orzechowski HD**, Gunther A, Menzel S, et al. Transcriptional mechanism of protein kinase C-induced isoform-specific expression of the gene for endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells. *Mol Pharmacol*. **2001**; 60(6): 1332-42.

**Palumbo R**, Gaetano C, Melillo G, Toschi E, Remuzzi A, Capogrossi MC. Shear stress downregulation of platelet-derived growth factor receptor-beta and matrix metalloprotease-2 is associated with inhibition of smooth muscle cell invasion and migration. *Circulation*. **2000**; 102(2): 225-30.

**Park J**, Ha H, Ahn HJ, et al. Sirolimus inhibits platelet-derived growth factor-induced collagen synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *Transplant Proc*. **2005**; 37(8): 3459-62.

**Pauletto P**, Sartore S, Pessina AC. Smooth-muscle-cell proliferation and differentiation in neointima formation and vascular restenosis. *Clin Sci (Lond)*. **1994**; 87(5): 467-79.

**Perlman H**, Maillard L, Krasinski K, Walsh K. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation*. **1997**; 95(4): 981-7.

**Pfisterer M**, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, et al.; BASKET-LATE Investigators. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol*. **2006**; 48(12): 2584-91.

**Pollman MJ**, Hall JL, Gibbons GH. Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype. *Circ Res*. **1999**; 84(1): 113-21.

**Popma JJ**, Califf RM and Topol EJ Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty. *Circulation*. **1991**; 84 (3): 1426-36.

**Pyles JM**, March KL, Franklin M, Mehdi K, Wilensky RL, Adam LP. Activation of MAP kinase in vivo follows balloon overstretch injury of porcine coronary and carotid arteries. *Circ Res*. **1997**; 81(6): 904-10.

**Ray LB**, Sturgill TW. Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*. **1988**; 263(25): 12721-7.

**Reidy MA**, Fingerle J, Lindner V. Factors controlling the development of arterial lesions after injury. *Circulation*. **1992**; 86(6 Suppl): III43-6.

**Reiners JJ Jr**, Lee JY, Clift RE, Dudley DT, Myrand SP. PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Pharmacol*. **1998**; 53(3): 438-45.

- Renvoize C**, Roger R, Moulian N, Bertoglio J, Breard J. Bcl-2 expression in target cells leads to functional inhibition of caspase-3 protease family in human NK and lymphokine-activated killer cell granule-mediated apoptosis. *J Immunol.* **1997**; 159(1): 126-34.
- Richartz B**, Silber S. Die BASKET-LATE-Studie. Basel Stent Cost-Effectiveness Trial-Late Thrombotic Events Trial. *Herz.* **2006**; 31: 259.
- Ross R**. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Engl J Med.* **1986**; 314(8): 488-500.
- Santa Cruz Biotechnology, Inc.** General solutions protocol. **2006**. (Accessed December 12, 2006, at <http://www.scbt.com/protocols.php>).
- Schwartz SM**, Campbell GR, Campbell JH. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res.* **1986**; 58(4): 427-44.
- Sohaskey ML**, Ferrell JE Jr. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK), but not c-Jun NH(2)-terminal kinase, induces phosphorylation and stabilization of MAPK phosphatase XCL100 in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell.* **2002**; 13(2): 454-68.
- Sousa JE**, Costa MA, Sousa AG, et al. Two-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up after implantation of sirolimus-eluting stents in human coronary arteries. *Circulation.* **2003**; 107(3): 381-3.
- Statistisches Bundesamt.** Gesundheitswesen Todesursachen in Deutschland 2003. *Destatis.* **2005**, Fachserie: 12; Reihe: 5.
- Stemerman MB**, Weinstein R, Rowe JW, Maciag T, Fuhro R, Gardner R. Vascular smooth muscle cell growth kinetics in vivo in aged rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1982**; 79(12): 3863-6.
- Tanaka K**, Abe M, Sato Y. Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis. *Jpn J Cancer Res.* **1999**; 90(6): 647-54.
- Tanaka K**, Oda N, Iwasaka C, Abe M, Sato Y. Induction of Ets-1 in endothelial cells during reendothelialization after denuding injury. *J Cell Physiol.* **1998**; 176(2): 235-44.
- Tanoue T**, Yamamoto T, Nishida E. Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases. *J Biol Chem.* **2002**; 277(25): 22942-9.
- Tian W**, Zhang Z, Cohen DM. MAPK signaling and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* **2000**; 279(4): F593-604.
- Touyz RM**, Deng LY, He G, Wu XH, Schiffrin EL. Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J Hypertens.* **1999**; 17(7): 907-16.

**Touyz RM**, Deschepper C, Park JB, et al. Inhibition of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase improves endothelial function and attenuates Ang II-induced contractility of mesenteric resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. **2002**; 20(6): 1127-34.

**Trojanowska M**. Ets factors and regulation of the extracellular matrix. *Oncogene*. **2000**; 19(55): 6464-71.

**Wasylyk B**, Hagman J, Gutierrez-Hartmann A. Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem Sci*. **1998**; 23(6): 213-6.

**Watson L**, Herdegen T, Buschmann T, et al. JNK and c-Jun but not ERK and c-Fos are associated with sustained neointima-formation after balloon injury. *Eur J Clin Invest*. **2000**; 30(1): 11-7.

**Widmann C**, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*. **1999**; 79(1): 143-80.

**Windecker S**, Remondino A, Eberli FR, et al. Sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents for coronary revascularization. *N Engl J Med*. **2005**; 353(7): 653-62.

**Xu Q**, Liu Y, Gorospe M, Udelsman R, Holbrook NJ. Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest*. **1996**; 97(2): 508-14.

**Yang CM**, Chien CS, Hsiao LD, et al. Mitogenic effect of oxidized low-density lipoprotein on vascular smooth muscle cells mediated by activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway. *Br J Pharmacol*. **2001**; 132(7): 1531-41.

**Yordy JS**, Muise-Helmericks RC. Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene*. **2000**; 19(55): 6503-13.

## 9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.





## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Meike Fahrenholz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Einfluss der pharmakologischen MEK-Inhibition auf Phosphorylierung und Expression der extrazellulär-regulierten Kinasen ERK1/2 und deren Substrate nach intraluminarer Verletzung der Arteria carotis der Ratte“ selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe, und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

19.09.2007