

Aus der Klinik für Innere Medizin-Kardiologie
des Deutschen Herzzentrums Berlin

DISSERTATION

**Einfluss von Hypoxie und Deferoxamine auf die Beta-1-
Integrin- abhängigen Funktionen der Gefäßmuskelzelle**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Oliver Christian Hintz

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. Graf
2. Prof. Dr. rer. nat. J. W. Fischer
3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Dechend

Datum der Disputation: 11.7. 2008

Die in der Dissertation aufgeführten Ergebnisse sind bereits zum Teil in wissenschaftlichen Zeitschriften publiziert sowie auf Kongressen vorgetragen worden. Ein Hinweis entsprechend der Dissertationsordnung der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin ist erfolgt.

1. Blaschke F, Hintz O, Kappert K, Fleck E, Graf K

Hypoxia increases beta(1)-integrin-mediated adhesion and spreading of human VSMCs by activation of focal adhesion kinase and MAP Kinase. *Circulation Supplement II*. 2000;102;18;P42636(abstract)

2. Blaschke F, Hintz O, Kappert K, Dörr G, Graf K (2001):

Hypoxia increases beta(1)-integrin adhesion and spreading by activating intracellular signaling pathways. *High Blood Pressure Council 2001, Washington (Poster)*

3. Blaschke F, Hintz O, Kappert K, Dörr G, Graf K (2001):

Hypoxia increases beta(1)-integrin adhesion and spreading by activating intracellular signaling pathways. *American Heart Association Congress 2001, Los Angeles (Vortrag und Poster)*

4. Blaschke F, Hintz O, Kappert K, Doerr G, Schmidt G, Fleck E, Graf K

Vascular beta (1)-integrin-mediated functions are enhanced by hypoxia, *European Heart Journal 21: 635-635 P3497 Suppl. S, Aug-Sep 2000*

5. Blaschke F, Stawowy P, Gotze S, Wollert-Wulf B, Hintz O, Kappert K, Fleck E, Graf K

Central role of MAPK pathway in hypoxia induced adhesion, spreading and proliferation of human vascular smooth muscle cells, *Hypertension 38 (3): 513-513 P127 Sep 2001*

6. Blaschke F, Stawowy P, Goetze S, Hintz O, Gräfe M, Kintscher U, Fleck E, Graf K

Hypoxia activates β_1 -Integrin via ERK1/2 and p38 Map kinase in human vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications 2002; 296; P890-896*

7. Blaschke F, Stawowy P, Goetze S, Kintscher U, Kappert K, Hintz O, Graf K

Hypoxie induziert eine Zunahme der Adhäsion und Proliferation humaner glatter Muskelzellen durch Aktivierung von ERK1/2 und p38 MAPK

Z Kardiol. 91: 1-180; 2002

8. Blaschke F, Hintz O, Goetze S, Stawowy P, Fleck E, Graf K

Cobalt increases adhesion of human vascular smooth muscle cells by protein kinase C dependent activation of beta 1-integrin *Hypertension 42 (3): 434-434 P155 Sep 2003*

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 4 |
| 1.1 Integrine, Expression und Funktion | 4 |
| 1.2 Pathophysiologie vaskulärer Integrine, Bedeutung von β 1- Integrinen | 6 |
| 1.2.1 Adhäsion | 7 |
| 1.2.2 Spreading | 7 |
| 1.2.3 Migration der Gefäßmuskelzelle | 7 |
| 1.3 Signaltransduktion durch Integrine | 9 |
| 1.3.1 „outside-in-signaling“ | 9 |
| 1.3.2 „Inside-out-Signaling“ und Integrinaktivierung | 10 |
| 1.3.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) | 11 |
| 1.3.3.1 ERK 1/2 | 12 |
| 1.3.3.2 p38 | 12 |
| 1.3.4 Proteinkinase C | 13 |
| 1.4 Über die Rolle von Hypoxie in Gefäßwänden | 13 |
| 1.5 Deferoxamine als Hypoxieimitator | 15 |
| 1.6. Studienziele | 16 |
| 1.6.1 Charakterisierung des Effektes systemischer Hypoxie und des Hypoxieimitators DFO auf die β 1-Integrin abhängigen Zellfunktionen | 16 |
| 1.6.2 Vergleich der Wirkungen von DFO und Hypoxie | 16 |
| 1.6.3 Untersuchung des Einflusses von Hypoxie und DFO auf die intrazellulären Enzyme Proteinkinase C und MAP-Kinase | 16 |
| 1.6.4 Untersuchung der Auswirkungen auf Integrinexpression und -konformation | 17 |
| 2. Material und Methoden | 18 |
| 2.1 Materialien | 18 |
| 2.1.1 Matrixkomponenten | 18 |
| 2.1.2 Inhibitoren | 18 |
| 2.1.3 Wachstumsfaktoren | 18 |
| 2.1.4 Hypoxie-Exposition | 18 |
| 2.1.5 Antikörper und Western-Blot-Reagentien | 19 |
| 2.2 Methoden | 20 |
| 2.2.1 Zellkultur | 20 |
| 2.2.2 Adhäsion | 20 |
| 2.2.3 Spreading | 21 |
| 2.2.4 Migration | 22 |
| 2.2.5 Durchflußzytometrie | 23 |
| 2.2.6 RT-PCR | 23 |
| 2.2.7 Western Blot | 24 |
| 2.2.8 Statistik | 24 |
| 3. Ergebnisse | 25 |
| 3.1 Effekt von DFO | 25 |
| 3.1.1 Effekt von DFO auf die Adhäsion glatter Muskelzellen | 25 |
| 3.1.1.1 Einfluss unterschiedlicher Wirkstoffkonzentrationen auf die Adhäsion von glatten Muskelzellen der Ratte (rVSMC) | 25 |
| 3.1.1.2 Einfluss der Inkubationszeit auf die Adhäsion | 27 |
| 3.1.1.3 Adhäsion auf unterschiedlichen Proteinkonzentrationen | 28 |
| 3.1.2 Spreading | 29 |
| 3.1.2.1 Spreadingverlauf auf Kollagen Typ I und Fibronectin | 29 |

| | |
|--|----|
| 3.1.2.2 Spreading auf unterschiedlichen Matrixkonzentrationen | 31 |
| 3.1.3 Migration | 33 |
| 3.1.3.1 Migrationsverlauf auf Kollagen Typ I | 33 |
| 3.1.4 Abhängigkeit der gezeigten Effekte von β_1 - und β_3 - Integrinen | 34 |
| 3.1.4.1 Inhibition von β_1 -Integrin verhindert den DFO-induzierten Anstieg des Spreadings | 34 |
| 3.1.4.2 Der DFO-induzierte Migrationsanstieg ist β_1 - und β_3 - Integrin vermittelt..... | 36 |
| 3.1.5 Integrinexpression | 37 |
| 3.2 Signaltransduktion der gezeigten Effekte | 37 |
| 3.2.1 Rolle der Proteinkinase C | 37 |
| 3.2.2 Beteiligung der MAP-Kinase an der Signaltransduktion | 41 |
| 3.3 Effekt von Hypoxie | 44 |
| 3.3.1 Einfluss von Hypoxie auf die Adhäsion glatter Muskelzellen | 44 |
| 3.3.1.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die Adhäsion | 44 |
| 3.3.1.2 Adhäsionsanalysen nach unterschiedlicher Adhäsionsdauer | 45 |
| 3.3.1.3 Adhäsion auf unterschiedlichen extrazellulären Matrixkonzentrationen | 47 |
| 3.3.1.4 Einfluss der Reoxygenierung | 49 |
| 3.3.2 Hypoxie beeinflusst das Spreading glatter Muskelzellen | 50 |
| 3.3.3 Hypoxie stimuliert die Migration von rVSMC | 53 |
| 3.3.3.1 Migrationsverlauf glatter Muskelzellen auf Kollagen Typ I | 53 |
| 3.3.4 Abhängigkeit von Integrinen | 54 |
| 3.3.4.1 Adhäsion auf Fibronektin und Kollagen I wird durch β_1 -Integrine vermittelt | 54 |
| 3.3.4.2 Spreading auf Kollagen I ist β_1 -Integrin vermittelt | 55 |
| 3.3.5 Unveränderte Integrinexpression nach Hypoxieexposition | 56 |
| 3.3.6 Hypoxie induziert die Aktivierung des β_1 -Integrins | 57 |
| 3.4 Signaltransduktion der hypoxischen Effekte | 59 |
| 3.4.1 Rolle der MAP-Kinase | 59 |
| 3.4.1.1 Beteiligung von ERK 1/2 und p38 | 59 |
| 3.4.1.2 Hypoxie bewirkt die Aktivierung der ERK 1/2- und p38- MAPK in VSMC | 61 |
| 3.4.2 Beteiligung der Proteinkinase C | 63 |
| 3.4.2.1 Die Blockade der Proteinkinase C verhindert den hypoxieinduzierten Adhäsionsanstieg | 63 |
| 3.4.2.2 Der Anstieg von Spreading und Migration tritt unter Blockierung der PKC nicht ein | 64 |
| 3.4.2.3 Hypoxie bewirkt eine Aktivierung von PKC-Epsilon in rVSMC | 65 |
| 4. Diskussion | 66 |
| 4.1 Hypoxie und Integrine | 66 |
| 4.2 Signaltransduktion | 72 |
| 4.3 Technisch-experimentelle Überlegungen | 74 |
| 5. Zusammenfassung..... | 77 |
| 6. Literaturverzeichnis..... | 78 |
| 7. Abkürzungsverzeichnis..... | 89 |
| 8. Danksagung..... | 92 |
| 9. Lebenslauf | 93 |
| 10. Eidesstattliche Erklärung | 93 |

Meinen Eltern gewidmet

1. Einleitung

1.1 Integrine, Expression und Funktion

Eine Zelle ist von Bindegewebe und anderen Zellen umgeben und mit diesen Strukturen durch eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine der Zellmembran verbunden. Die Zusammensetzung dieser Membranproteine ist vom Zelltyp und vom Typ des Bindegewebes abhängig. Eine erst seit verhältnismäßig kurzer Zeit bekannte Klasse von Membranproteinen sind die Integrine, die in allen zellulären Bestandteilen des kardiovaskulären Systems vorkommen¹. Sie wurden erst Anfang der 80er Jahre entdeckt, als gezielt nach einer vermuteten Verbindung zwischen dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin und dem Zytoskelett gesucht wurde². Aufgrund ihrer Funktion als transmembranäres Bindeglied zwischen extrazellulärer Matrix und dem Zytoskelett gab man diesen Proteinen den Namen „Integrine“³. Durch die Fähigkeit von Integrinen, Zellen mit der extrazellulären Matrix zu verbinden und dadurch zu einer Gewebestruktur zu verhelfen, zählt man Integrine zu den sogenannten Adhäsionsmolekülen. Zu dieser Gruppe zählen neben Integrinen unter anderem noch Cadherine und Selektine⁴. In vaskulären glatten Muskelzellen wird der Kontakt zur extrazellulären Matrix überwiegend durch Integrine hergestellt^{5, 6}.

Integrine sind heterodimere Glykoproteine, die aus einer α - und einer β - Untereinheit bestehen, welche nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Obwohl gegenwärtig 18 α - und 8 β -Einheiten bekannt sind, konnten bisher lediglich 25 verschiedene Integrine identifiziert werden, die als Rezeptoren fungieren. Eine uneingeschränkte Paarung der einzelnen Untereinheiten miteinander scheint nicht möglich zu sein⁷. Jede Integrin-Untereinheit besitzt eine lange extrazelluläre Domäne, die zwischen 700 und 1100 Aminosäuren (AS) umfaßt, und eine kurze, 20 bis 60 Aminosäuren große intrazelluläre Domäne. Diese Abschnitte sind über einen kurzen, einsträngigen transmembranären Teil miteinander verbunden. Das N-terminale Ende der Aminosäurenkette liegt extrazellulär, der C-Terminus befindet sich im Zytoplasma. Die α -Untereinheit ist mit 120-180 kDa etwas schwerer als die β - Einheit mit 90 -110 kDa⁸.

Innerhalb der Integrinstruktur spielen verschiedene Regionen auf beiden Untereinheiten bei der Ligandenbindung eine Rolle. Besonders wichtig scheinen die drei folgenden Regionen zu sein:

1. eine Serie von sieben Wiederholungen einer 60 AS umfassenden Sequenz in der N-Terminalen Region der α -Kette, die sich zu einer β -Propeller Struktur zusammenlagern, deren sieben Blätter radial und pseudosymmetrisch um eine zentrale Achse und parallel zur Plasmamembran angeordnet sind. Die Ligandenbindung erfolgt an der Oberseite des Rezeptors, während sich an der Unterseite mehrere Calcium-Bindungsstellen befinden ⁹.
2. eine eingefügte Domäne (I-Domäne) von ungefähr 200 AS, die in mehreren α -Ketten gefunden wird und eine Nukleotid-Bindungsfalte sowie eine Koordinierungsstelle für divalente Kationen (vor allem Ca^{2+}) besitzt. Diese Koordinierungsstelle wird auch metal-ion-dependent adhesion-site (MIDAS) genannt.
3. eine der I-Domäne ähnliche Struktur in der amino-terminalen Region der β -Untereinheit, die aus etwa 250 AS besteht ¹⁰ und vermutlich ebenfalls eine Kationen-Koordinierungsstelle besitzt ¹¹. Im Unterschied zur korrespondierenden Struktur der α -Kette konnte hier jedoch bis jetzt noch keine direkte Bindung von Metallionen nachgewiesen werden ¹⁰.

Diese drei Bindungsstellen stehen miteinander in Kontakt und grenzen teilweise aneinander. So weisen die I-Domäne der α -Kette und die ihr ähnliche Struktur der β -Kette die gleiche Peptidsequenzen auf, die auch in die Ligandenbindung involviert sind. Dies führte zu der Hypothese, dass beide Regionen sowohl strukturell als auch funktionell verbunden sind ¹². Ein voll funktionsfähiger Integrinrezeptor besteht immer aus einer α - und einer β -Kette. Einzelne Untereinheiten sind nicht in der Lage, die Aufgaben des Heterodimers zu übernehmen. Ein bestimmter $\alpha\beta$ -Heterodimer bildet den Rezeptor für einen Liganden der extrazellulären Matrix. Dieser Rezeptor muß jedoch nicht spezifisch für das entsprechende Matrixprotein sein, vielmehr ist bekannt, dass ein Integrinrezeptor oft in der Lage ist, mehr als einen Liganden zu binden. Dabei erkennt der Rezeptor nicht das ganze Matrixprotein, die Bindung erfolgt eher an einzelnen Peptidsequenzen. Zu nennen wäre hier die RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp), die beispielsweise in Fibronectin, Vitronectin, Osteopontin und Laminin vorkommt und von mehreren Integrinen erkannt wird ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$) ^{13, 6, 14, 15}.

Die Adhäsion auf Fibronectin und Kollagen Typ I erfolgt dabei besonders durch die Integrine $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ sowie $\alpha_5\beta_1$ ⁷. Die Integrin-Untereinheit β_1 ist an allen diesen Heterodimeren beteiligt und daher für die Adhäsion auf diesen Matrixproteinen besonders wichtig.

Zwar kommen Integrine in den Zellmembranen aller zellulären Bestandteile des kardiovaskulären Systems vor, die verschiedenen Integrine sind jedoch hierbei nicht gleichmäßig verteilt, ihre Zusammensetzung ist vielmehr vom Zelltyp abhängig. Verschiedene Integrine überneh-

men unterschiedliche Funktionen, womit ihre Expression auf der Zellmembran je nach Funktion der Zelle variiert. Zum Beispiel wird das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ nur auf Thrombozyten gefunden, wo es eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaktivierung und -aggregation miteinander spielt ¹⁶.

In glatten Gefäßmuskelzellen hat die β_1 -Untereinheit besondere Bedeutung für die Interaktionen mit der extrazellulären Matrix. Es ist die Untereinheit, die in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) am häufigsten exprimiert wird ¹⁷. Das Integrinexpressionsmuster von VSMC variiert *in vivo* und *in vitro*. Für kultivierte VSMC ist das Vorhandensein von $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, bekannt ¹⁸. Die β_1 -Untereinheit stellt in den hier genannten Kombinationen mit verschiedenen α -Untereinheiten insbesondere Kontakte zu den Kollagenen I-IV und Laminin her. $\alpha_5\beta_1$ ist dagegen vor allem als Rezeptor für Fibronectin bekannt ^{19, 17}. $\alpha_v\beta_1$ vermittelt vornehmlich Kontakte zu Vitronectin ¹⁹.

1.2 Pathophysiologie vaskulärer Integrine, Bedeutung von β_1 -Integrinen

Integrine sind als transmembranäre Proteine an zahlreichen biologischen Funktionen beteiligt. Die Herstellung geordneter dreidimensionaler Gewebestrukturen setzt die genaue Einfügung der einzelnen Zelle in den Gewebeverband voraus. Hierfür sind eine Vielzahl von Adhäsionsmechanismen und deren Zusammenspiel mit dem Zytoskelett verantwortlich ²⁰. Ein großes Spektrum dieser Aufgaben übernehmen Integrine, die sowohl Kontakte der Zelle zu den Proteinen der umgebenden extrazellulären Matrix als auch Zell-Zell-Interaktionen vermitteln. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Organentstehung, einem komplexen dynamischen Vorgang, der von zellulären Interaktionen mit Regulierungsfaktoren und Adhäsionselementen abhängig ist ¹. Auch die Entstehung und Neubildung von Blutgefäßen wäre ohne Integrine nicht möglich ²¹. Aus diesem großen Aufgabengebiet resultiert eine Vielzahl pathologischer Vorgänge bei Integrin-Dysfunktion. Beispielsweise wäre auch die bei Tumorwachstum notwendige Neubildung von Blutgefäßen ohne die Integrine nicht möglich ²¹. Das auf Thrombozyten vorkommende Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist ein wichtiger Bestandteil des Gerinnungssystems, dessen Fehlen als Glanzmann Thrombasthenie bekannt ist ¹⁶. Außerdem nehmen Integrine an der Steuerung der Zellproliferation und der Apoptose teil ¹.

Durch ihre Eigenschaft, die Proliferation und Migration der VSMC zu vermitteln, kommt Integrinen und hier besonders dem β_1 -Integrin eine wichtige Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques zu ^{22, 23, 24}. Auch bei der durch das Einwandern von VSMC bedingten

Hyperplasie der Intima nach Ballonkatheter mit möglicher Restenosierung kommt es zu einer gesteigerten Expression von Integrinen^{25, 26}. Integrine wurden daher in den letzten Jahren zunehmend Gegenstand klinischer Forschung.

1.2.1 Adhäsion

Die Adhäsion der einzelnen Zelle ist für die geordnete Struktur des Gewebeverbands von entscheidender Bedeutung. Sie ist kein starrer Vorgang, sondern durch die kontinuierliche Erneuerung der Zellen und dem damit zusammenhängenden Umbau der Gewebearchitektur vielmehr einer stetigen Dynamik unterworfen²⁰. Zellen passen ihre Adhäsionsfähigkeit an veränderte äußere Gegebenheiten an. Bei Verlust der Adhäsion und damit des Kontaktes zur umgebenden extrazellulären Matrix werden apoptotische Prozesse ausgelöst, so dass umgekehrt auch der Verlust von Integrinen zur Apoptose führen kann²⁷.

1.2.2 Spreading

Der Begriff „spreading“ beschreibt das ungerichtete Ausbreiten der abgerundeten Zelle auf der extrazellulären Matrix, wie es beispielsweise nach der Mitose oder nach dem (auch experimentellen) Ablösen der Kontakte zur Matrix (z.B. durch Trypsinierung) vorkommt²⁸. Dafür ist das Zusammenspiel des Adhäsionssystems mit dem Zytoskelett erforderlich²⁰. Beim Ausbreiten der Zelle wird der größtmögliche Zell-Matrixkontakt hergestellt. An Endothelzellen wurde beobachtet, dass der programmierte Zelltod (Apoptose) nicht nach Verlust der Adhäsion an extrazellulären Matrixproteinen, sondern dann erfolgte, wenn das Spreading der Zelle nicht möglich war^{29, 30}.

1.2.3 Migration der Gefäßmuskelzelle

Die Fähigkeit zur Fortbewegung besitzen grundsätzlich alle Zellen, da sie sich im Rahmen der Organentstehung und bei regenerativen Prozessen im dreidimensionalen Gewebeverband an die richtige Stelle bewegen müssen. Innerhalb der Fortbewegung werden Spreading und Migration unterschieden. Während das „Spreading“ die ungerichtete Ausbreitung einer Zelle beschreibt, bezieht sich der Begriff „Migration“ auf die Fortbewegung entlang eines chemischen Gradienten einer chemotaktisch wirksamen Substanz. Inzwischen ist eine große Zahl an

chemotaktisch wirksamen Stoffen identifiziert, darunter Wachstumsfaktoren wie PDGF, VEGF und Angiotensin II³¹. Die Rolle des β_1 -Integrins bei der Migration von Zellen unter Kulturbedingungen wurde von mehreren Autoren betont^{19, 17, 32}. Neben diesem Integrin ist aber auch β_3 an der Migration beteiligt^{5, 19, 33}.

Zu Beginn der Migration bilden sich feine Ausläufer der Zellmembran, die in zwei Arten vorkommen. Breite, blattartige Ausbuchtungen werden als Lamellipodia bezeichnet. Hiervon unterscheidet man Filopodien, schmale, zylindrische, nadelartige Ausläufer. Beide Strukturen enthalten keinerlei Zellorganellen. Sie besitzen dagegen eine hohe Dichte von Actinfilamenten³⁴. Die Migration der Zelle im engeren Sinne wird durch folgende Mechanismen ermöglicht: Der gesamte Prozeß der Vorwärtsbewegung kann in zwei Etappen unterteilt werden. Zuerst erfolgt ein Vorwärtstasten, anschließend wird der Rest des Zellkörpers nachgezogen. Während des ersten Teiles bilden sich am vorderen Ende der Zelle Lamellipodien und Filopodien, wodurch die Zelle asymmetrisch und eine Vorwärtsbewegung eingeleitet wird. Diese Bewegung wird durch verstärkte Adhäsionsfähigkeit unterstützt: mit Videomethoden konnte anhand von Antikörpern gegen das β_1 -Integrin gezeigt werden, dass an diesem vorderen Ende ein erhöhter Einbau von β_1 stattfindet³⁵. Bei migrierenden Fibroblasten wurde durch Interferenz-Reflektions-Mikroskopie verdeutlicht, dass am vorderen Ende der Fibroblasten neue Adhäsionsplaques entstanden und bestehen blieben, bis diese Stellen das Ende der Zelle erreicht hatten³⁶.

Der zweite Teil der Vorwärtsbewegung, das Nachziehen des Zellrestes, wird durch die Kontraktion des Myosinapparates erreicht³⁴. Eine effektive Fortbewegung der Zelle ist nur möglich, wenn die Adhäsion des hinteren Teiles der Zelle stark verringert wird. Das bedeutet, dass die hier vorhandenen Integrine entfernt werden müssen. Dies kann auf zwei Arten geschehen: Die Integrine werden zum einen durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und an Stellen transportiert, an denen sie benötigt werden, beispielsweise den vorderen Anteil der Zelle (Integrin-Recycling)³⁷. Zum anderen werden die Integrine aus der Membran ausgeklinkt und im Extrazellularraum zurückgelassen. Der Bedarf an Integrinen wird durch Neusynthese gedeckt. Dieses Ausklinken von Integrinen wurde von verschiedenen Gruppen an unterschiedlichen Zelltypen beobachtet^{38, 35, 39}.

Die eben beschriebenen Vorgänge sind auch wichtige Bestandteile pathophysiologischer Prozesse. Es ist heute bekannt, dass das Einwandern glatter Muskelzellen von der Media in die Intima eine Schlüsselrolle bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques einnimmt. Auch im Rahmen der Restenosierung von Koronargefäßen nach Ballondilatationen kommt der Migration der VSMC eine entscheidende Funktion zu^{25, 26}.

Der Einfluss von Hypoxie auf die Migrationsfähigkeit der Zelle wurde an anderen Zellen bereits untersucht, hier wurde eine Steigerung der Migration durch den hypoxischen Reiz gesehen⁴⁰. Für VSMC fehlen solche Daten bisher.

1.3 Signaltransduktion durch Integrine

1.3.1 outside-in-signaling

Während man bei der Entdeckung der Integrine von einer reinen Funktion als Adhäsionsmolekül ausging, dessen Aufgabe in der Verankerung der Zelle in der Umgebung bestünde³, wurde seit Anfang der 90er Jahre vermehrt von einer wichtigen Rolle in der Signaltransduktion berichtet^{8, 41}. Bindet ein Ligand extrazellulär an ein Integrin, setzt dieses eine Reihe von intrazellulären Signalkaskaden in Gang, was als outside-in-signaling bezeichnet wird und Zellfunktionen beeinflusst. Dazu gehören sowohl Änderungen der Zellmorphologie und Zellfunktionen wie Migration und Proliferation als auch die Induktion von Stoffwechselwegen, die das Überleben der Zelle sicherstellen⁴². Integrine selbst besitzen keine enzymatische Aktivität und müssen zur Weiterleitung von Informationen nachgeschaltete Moleküle aktivieren^{43, 44}. Es konnte gezeigt werden, dass der intrazelluläre Teil des Integrins sowohl mit Bestandteilen des Zytoskeletts wie α -Aktinin und Talin als auch mit einer großen Zahl zytoplasmatischer Moleküle in Verbindung steht⁴⁵.

Der Kontakt zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix wird nicht von allen Teilen der Zellmembran gleichmäßig hergestellt. Vielmehr existieren spezialisierte Strukturen, die punktförmig über die Zelloberfläche verteilt sind und „focal adhesions“ oder „Adhäsionsplaques“ genannt werden⁴⁶. Voraussetzung für die Bildung der „focal adhesions“ ist die Aggregation mehrerer Integrine durch Bewegungen innerhalb der Zellmembran, das sogenannte Integrin-Clustering. Neben den Integrinen beteiligen sich eine Reihe von Plaques-Proteinen, die überwiegend mit dem zytoplasmatischen Teil der β -Untereinheit der Integrine in Kontakt stehen, am Aufbau der Adhäsionsplaques⁴⁷. Manche dieser Plaque-Proteine (z.B. Talin, α -Aktinin und Filamin^{48, 49, 50}) stellen die strukturelle Verbindung zwischen Membranrezeptoren und Aktin-Zytoskelett her, während andere (beispielsweise die focal adhesion kinase⁵¹) als Signaltransduktionsmoleküle fungieren⁴⁷.

1.3.2 Inside-out-Signaling und Integrinaktivierung

Die Aktivität der Integrine kann aber auch durch Liganden, die an andere Membranproteine binden, beeinflusst werden. Diese Nicht-Integrin-Rezeptoren setzen Prozesse in Gang, in deren Folge ein Integrin-Aktivierungskomplex an den intrazellulären Abschnitt des Integrins bindet¹. Dieser gibt die Information durch die Membran an den extrazellulären Teil weiter, was zu Konformationsänderungen extrazellulärer Domänen und zum Übergang der Integrine von einem Zustand niedriger zu hoher Aktivität führt¹. Diese Art der Signaltransduktion wird entsprechend als inside-out-signaling bezeichnet¹⁶. Die Änderungen des Aktivitätszustandes modulieren dann zwei unterschiedliche Vorgänge, die Avidität und die Affinität des Integrins. Beide führen zur stärkeren Bindung eines Liganden.

Der Begriff Avidität bezeichnet die Gruppierung mehrerer Integrine innerhalb der Zellmembran, die dann gemeinsam einen Liganden binden, was zu einer Verstärkung der Bindung führt. Auch dadurch können Konformationsänderungen ausgelöst werden¹⁶.

Affinität beschreibt die Fähigkeit eines einzelnen Rezeptors, einen Liganden zu binden, welche durch verschiedene Mechanismen variiert werden kann. Führt dies zu einer höheren Affinität des Rezeptors, spricht man von Integrin-Aktivierung, die auf verschiedene Arten erfolgen kann. Diese Fähigkeit zur stärkeren Bindung eines Liganden könnte durch Konformationsänderungen des Integrins ausgelöst werden, die *in vitro* durch immunologische Methoden sichtbar gemacht wurden^{52, 53, 54}. Veränderungen der Affinität einer Bindungsstelle können theoretisch auf unterschiedliche Mechanismen beruhen⁵⁵:

1. Bewegung von Domänen, wodurch Bindungsstellen der Integrine freigelegt werden.
2. Änderungen in der Tertiärstruktur, die Form und Ladungseigenschaften der Bindungsstelle verändern.
3. Schließlich ist auch denkbar, dass sich die Struktur des gesamten Integrins ändern könnte, somit also eine Änderung der Quartärstruktur erfolgen würde.

Ein hypothetisches Modell für eine Konformationsänderung wurde von der Betrachtung der heterotrimeren G-Proteine abgeleitet. Demnach liegt innerhalb der α -Kette die I-Domäne an der Spitze der β -Propellerstruktur und blockiert im inaktiven Zustand des Integrins deren Bindungsstellen. Im hochaffinen Zustand löst sich die Bindungsstelle der β -Kette von ihren Verbindungen zum β -Propeller, was zu Formveränderungen der I-Domäne und zur Freilegung der auf allen drei Strukturen gelegenen Bindungsstellen führt¹⁰. Tatsächlich gibt es Hinweise, wonach die Integrin-Aktivierung zu einer Rotationsbewegung der I-Domäne auf der α -Kette

führt, wodurch die Bindungsstellen im Bereich des β -Propellers der α -Kette freigelegt und gleichzeitig die I-Domäne durch Formveränderungen aktiviert werden¹⁰.

Ein Integrin kann sowohl durch Einflüsse des Intra- als auch des Extrazellularraum aktiviert werden⁵⁵. Über Art und Entstehung des intrazellulären Aktivierungssignal gibt es noch keine Erkenntnisse. Es existieren lediglich Hinweise, dass Talin zu den proximalen Regulatoren der zytoplasmatischen Integrin-Aktivierung gehört⁵⁶. So geht beispielsweise eine bestimmte Peptidsequenz in der Kopfreion von Talin enge Bindungen mit einer Sequenz des β -Schwanzes ein, deren Mutation den Verlust der Aktivierbarkeit des Integrins bedeutet⁵⁷. Diese Bindung zwischen Talin und dem β -Schwanz erfolgt unabhängig von Phosphorylierungen⁵⁸. Die Übertragung dieses Signals scheint durch eine Verlängerung des zytoplasmatischen Abschnitts des Integrins um einige Aminosäuren zu erfolgen, die durch die Bewegung dieser AS aus dem transmembranären Integrinabschnitt erreicht wird^{59, 55}.

1.3.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Unter den Wegen, auf denen extrazelluläre Matrixproteine Signale über Integrine in die Zelle übertragen, spielt eine Kaskade von Proteinkinasen eine große Rolle, die sogenannte mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade^{44, 60, 61}. Sie ist ein komplexes Geflecht von Enzymen, in dem sich unterschiedliche Pfade gebildet haben, die alle aus einer dreistufigen Kaskade bestehen. Das zentrale Element in diesen Pfaden bildet das „Modul“ der MAP-Kinase, von der bisher mehrere, von Art zu Art unterschiedliche Formen entdeckt wurden. In allen Säugetieren kommen die folgenden vier Formen der MAP-Kinase vor: die „extracellular regulated kinase“ (ERK), von der zwei Isoformen existieren, Jun amino-terminale Kinasen (JNK 1/2/3), p38 Proteine und ERK 5⁶². Diese MAP-Kinasen werden durch spezifische MAP-Kinase-Kinasen (MAPKK) phosphoryliert, die ihrerseits von mehreren MAPKK-Kinasen (MAPKKK) phosphoryliert und damit aktiviert werden können⁶¹. Durch die Aktivierung der MAP-Kinasen werden im Nukleus Prozesse ausgelöst, an deren Ende die Aktivierung von sogenannten Transkriptionsfaktoren steht. MAP-Kinasen sind daher in wichtige zelluläre Prozesse wie die Regulierung der Genaktivität, die Kontrolle der Zellproliferation und des programmierten Zelltodes sowie der Zellbewegung eingebunden⁶³. In VSMC spielen unter anderem zwei Pfade der MAPK-Kaskade, eine wichtige Rolle: der sogenannte ERK 1/2 –Pfad und die p38- Kaskade, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

1.3.3.1 ERK 1/2

ERK kommt ubiquitär in zwei Isoformen vor, die weitgehend identisch sind und deren Verteilung von Zelltyp zu Zelltyp schwankt. Sie ist die älteste bekannte MAP-Kinase⁶⁴, deren Aktivierung sich durch den pharmakologischen Inhibitor PD 98059 verhindern läßt^{65, 62}. Ihr als MAPKK vorgeschaltet ist die MAP/ERK-Kinase MEK, die ebenfalls in zwei Isoformen vorliegt und nach heutigem Wissensstand außer ERK1/2 kein weiteres Substrat umsetzt. Beide MEKs sind *in vitro* in der Lage, ERK 1/2 vollständig zu aktivieren^{66, 64}.

MEK 1/2 werden von der MAPKKK Raf phosphoryliert. Die Proteinkinase-Familie raf besteht aus mehreren Isoformen, von denen Raf-1 am besten untersucht ist. Im Gegensatz zu den JUN- und p38-Kaskaden, deren MAPKK von mehr als einem Dutzend MAPKKKs stimuliert werden können, werden MEK 1/2 nur von der Raf-Familie phosphoryliert⁴⁴.

Der ERK 1/2-Signalweg der MAPK-Kaskade wird durch das monomere G-Protein Ras ausgelöst, das im aktivierten Zustand außerdem mit vielen weiteren Liganden interagiert. Die Funktionen, die über diesen Pfad vermittelt werden, konnten durch die Beobachtung von knock-out-Mäusen, denen Gene für bestimmte Enzyme dieser Kaskade fehlten, genauer bestimmt werden. Hierbei zeigte sich, dass ein Fehlen von Raf und MEK-1 zum Tod der Mäuse in der Embryonalzeit führte⁶⁷. Generell fand man verzögertes embryonales Wachstum, Defekte der Lungenreifung und Lungenöffnung (besonders bei Fehlen von Raf-1). Auch die Gefäßbildung war deutlich beeinträchtigt, was häufig zur Unterfunktion der Plazenta und zum Tod der Embryonen führte⁶⁸. Außerdem wurde eine verringerte Dicke von Dermis und Epidermis bei MEK1-defizienten Mäusen beschrieben^{69, 70}.

1.3.3.2 p38

Die Mitglieder der p38-Familie, die vier Isoformen alpha, beta, gamma und delta, werden durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert. Dazu zählen Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, Hitze- und osmotischer Schock sowie andere Faktoren, die zellulären Streß verursachen. Sie werden von den MEKs 3 und 6 phosphoryliert, die allerdings nicht für p38 spezifisch sind, sondern außerdem noch Isoformen anderer MAP-Kinasen aktivieren können. Sie werden von einer großen Zahl übergeordneter MAPKKKs phosphoryliert, so dass hier eine eindeutige Zuordnung wie beim ERK-Pfad nicht möglich ist. Ein Fehlen von p38 α war in Tierexperimenten nicht mit dem Leben vereinbar, diese Mäuse starben bereits während der

Embryogenese⁷¹. Diese Tatsache könnte durch mangelhafte Plazentabildung bedingt sein, wie Adams et al. zeigen konnten⁷². Außerdem ist p38 für die Erythropoetinbildung erforderlich⁷³. Dieser Pfad der MAP-Kinase kann durch die pharmakologische Substanz SB 203580 selektiv gehemmt werden⁷⁴.

1.3.4 Proteinkinase C

Als Proteinkinase C (PKC) wird eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen bezeichnet, zu der 11 Mitglieder gehören⁷⁵. In verschiedenen Arten von VSMCs wurden bisher die PKC Isoformen α , β I, β II, δ , ϵ , γ , η und ζ identifiziert⁷⁶. Mit Hilfe von Aktivatoren und Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die Enzyme der PKC-Familie an Integrin vermittelten Funktionen wie Adhäsion und Spreading sowie an der Bildung von Adhäsionsplaques beteiligt sind^{77,78}. Beim Spreading von VSMC kommt es unter anderem zu einer Translokation der PKC-Isoformen α und ϵ in die Adhäsionsplaques, wodurch das Ausmaß des Spreadings reguliert werden kann⁷⁹. Ng beobachtete eine wichtige Rolle von PKC α bei der Wiederverwertung des β 1-Integrins während der Migration³⁷. Berra beschrieb, dass die Vermittlung der mitogenen Signale in Fibroblasten über die Isoform PKC ζ erfolgt⁸⁰. Auch an der Regulation der Kontraktilität glatter Muskelzellen ist die PKC in starkem Maße beteiligt⁷⁶.

Die PKC steht im mehreren Zelltypen unter bestimmten Bedingungen mit der MAP-Kinase in Verbindung und liegt innerhalb der Signalkette oberhalb von dieser^{81, 82, 83}.

Auch in VSMC gibt es Hinweise auf eine Verbindung zwischen PKC und MAP-Kinase, da Experimente mit Inhibitoren zeigten, dass sowohl Aktivierung als auch Translokation der MAP-Kinase PKC-abhängig sind⁸⁴.

1.4 Über die Rolle von Hypoxie in Gefäßwänden

Schon lange ist bekannt, dass die Proliferation und Migration der Gefäßmuskelzellen in der Media eine Schlüsselrolle bei der Atheroskleroseentstehung spielt⁸⁵. Bei der Erörterung der Frage, welche äußeren Einflüsse auf VSMCs migrations- und proliferationsfördernd wirken, fiel unter anderem die ungünstige Sauerstoffversorgung glatter Muskelzellen in der Media auf und führte zur Formulierung der anoxämischen Theorie der Atheroskleroseentstehung durch Hueper et al.⁸⁶.

Die Sauerstoffversorgung der Zellen der Gefäßwand erfolgt vorwiegend über Diffusion aus dem Gefäßlumen und von den Gefäßen der Adventitia. Da die Media auf halbem Weg zwischen diesen beiden Sauerstoffquellen liegt und damit das letzte Glied der Sauerstoffversorgung darstellt, ist sie für Schwankungen des O₂-Angebotes besonders sensibel. Aufgrund dieser physiologischen Schwachstelle wurde bereits 1944 spekuliert, dass eine O₂-Unterversorgung der Gefäßmuskelzellen zur Atheroskleroseentstehung beitragen könnte⁸⁶. Der von Hueper formulierten „anoxämischen Theorie der Atheroskleroseentstehung“ zufolge verschärft sich durch die Bildung des atherosklerotischen Plaques und die daraus resultierende Größenzunahme der Gefäßwand deren O₂-Unterversorgung zusätzlich. Die Umstellung des Stoffwechsels der Zellen auf die anaerobe Glykolyse führt zu verstärktem Zellstress, die einsetzenden zellulären Adaptionsmechanismen verschlechtern die atherosklerotische Gesamtsituation.

Diese Theorie wird durch die Beobachtung gestützt, dass eine durch Verlegung der vasa vasorum erzeugte lokale Hypoxie im Tiermodell zur Hyperplasie der Intima führt⁸⁷.

Nachdem das tatsächliche Vorkommen hypoxischer Areale in atherosklerotischen Gefäßen lange Zeit in Frage gestellt wurde, gelang es Bjornheden et al., mittels Immunhistochemie erstmals *in vivo* hypoxische Areale in der Media und in atherosklerotischen Plaques nachzuweisen⁸⁸.

Die Adaption des Körpers auf das verminderte Sauerstoffangebot geschieht über eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen, unter anderem durch die Bildung von Erythropoetin und die Induktion von Enzymen der Glykolyse. Alle diese zellulären Antworten werden über den heterodimeren Transkriptionsfaktor hypoxia inducible factor (HIF) vermittelt, der aus den Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β besteht. HIF-1 β geht Bindungen mit mehreren anderen Proteinen ein, wogegen HIF-1 α die biologische Aktivität des Transkriptionsfaktors bestimmt^{89, 90}. Beide Untereinheiten werden permanent synthetisiert, HIF-1 α hat jedoch unter normoxischen Bedingungen nur eine sehr kurze Halbwertszeit, so dass sich die Wirkung des Transkriptionsfaktors unter normalen Sauerstoffverhältnissen nicht entfalten kann⁹¹. Bei Hypoxie wird der Abbau von HIF-1 α gehemmt. Durch die nun gewährleistete Wirkung des Transkriptionsfaktors beginnt die Adaptation des Organismus an den erniedrigten O₂-Gehalt, z.B. durch die Bildung von Erythropoetin, VEGF und glykolytische Enzyme^{92, 93, 94}.

Systemische Hypoxie wurde mit erhöhter Proliferation glatter Muskelzellen der Pulmonalarterienwand in Verbindung gebracht, was zur pulmonalen Hypertonie führt. Durch Rauchen, Kohlenmonoxid und chronische Schlafapnoe bedingte systemische Hypoxie geht mit einem

erhöhten Risiko für Atherosklerose und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse einher^{95, 96, 97}.

1.5 Deferoxamine als Hypoxieimitator

Deferoxamine (DFO) ist ein Chelatbildner, der im klinischen Alltag beispielsweise bei Eisenintoxikationen als Medikament (Desferal[®]) Verwendung findet. Darüber hinaus wird DFO auch experimentell als Hypoxieimitator eingesetzt, seit bekannt ist, dass durch seine Gegenwart zum einen dieselben Gene induziert werden wie unter hypoxischen Bedingungen, zum anderen der Transkriptionsfaktor HIF-1 α stabilisiert wird⁹⁸. Die genauen Mechanismen, über die DFO diese Hypoxie imitierende Wirkung entfaltet, sind aber weitgehend unbekannt.

Trotz einer großen Zahl von Berichten über identische Wirkungen von DFO und Hypoxie im Inneren der Zelle gibt es bisher nur sehr wenige Publikationen, in denen die Effekte auf zelluläre Funktionen in der Interaktion mit der extrazellulären Matrix verglichen wurden. In dieser Arbeit soll daher unter anderem untersucht werden, ob die funktionellen Konsequenzen der Hypoxieimitation mit denen der Hypoxie übereinstimmen.

1.6. Studienziele

1.6.1 Charakterisierung des Effektes systemischer Hypoxie und des Hypoxieimitators DFO auf die β_1 -Integrin abhängigen Zellfunktionen.

Die Bedeutung des β_1 -Integrins der Gefäßmuskelzelle bei Signaltransduktion und Zell-Bindegewebskontakten ist im Rahmen physiologischer und pathologischer Prozesse wie der Atheroskleroseentstehung allgemein akzeptiert. In den letzten Jahren mehren sich Anzeichen, dass eine Sauerstoffunterversorgung der Gewebe zu einem erhöhten Atheroskleroserisiko führen könnte. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob Hypoxie die β_1 -Integrin-vermittelten Zellfunktionen Adhäsion, Spreading und Migration auf den Matrices Kollagen I und Fibronektin zu modulieren vermag.

1.6.2 Vergleich der Wirkungen von DFO und Hypoxie

Der Chelatbildner DFO ist als Hypoxieimitator bekannt. Diese Aussage leitet sich von intrazellulären biochemischen Reaktionsmustern ab, bisher fehlen allerdings zellexperimentelle Daten. Daher wird im Folgenden ein Vergleich zwischen Hypoxie- und DFO-Effekten durchgeführt.

1.6.3 Untersuchung des Einflusses von Hypoxie und DFO auf die intrazellulären Enzyme Proteinkinase C und MAP-Kinase

Integrine beteiligen sich in erheblichem Umfang an der Signaltransduktion zwischen VSMC und umgebendem Bindegewebe. Dies geschieht besonders über die intrazellulären Enzymkaskaden MAP-Kinasen und Proteinkinase C. Es ist bekannt, dass diese Enzymkaskaden integrinvermittelte Zellfunktionen modulieren können. Daher soll im Folgenden mittels rt-PCR und den Zellfunktionsexperimenten Adhäsion, Spreading und Migration untersucht werden, ob Hypoxie und DFO diese Enzyme beeinflussen und ob ein Zusammenhang zwischen Enzymmodulation und den β_1 -Integrin-vermittelten Zellfunktionen besteht.

1.6.4 Untersuchung der Auswirkungen auf Integrinexpression und -konformation

Die Funktion von Integrinen kann grundsätzlich auf zwei Arten verändert werden. Dies kann zum einen durch gesteigerte Expression des Proteins, zum anderen durch eine erhöhte Aktivität des einzelnen Rezeptors geschehen, welche mit einer Konformationsänderung des Integrins einhergeht. Die Wirkung von Hypoxie auf diese Vorgänge ist bisher nicht zufriedenstellend dargestellt. In der vorliegenden Arbeit werden daher Integrinexpression und -konformation mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Matrixkomponenten

Die verwendeten Materialien waren dermales humanes Kollagen Typ I von Vitrogen und Fibronectin von Gibco.

2.1.2 Inhibitoren

Phorbol 12-Myristate 13-Azetat (PMA), ein zeitabhängiger Stimulator bzw. Inhibitor der Proteinkinase C stammte von Sigma. Der pharmakologische ERK 1/2-MAPK-Inhibitor PD 98059 sowie der p38 MAPK-Inhibitor SB 203580 waren von Calbiochem.

2.1.3 Wachstumsfaktoren

Rekombinantes humanes PDGF-BB wurde von Biosource erworben.

2.1.4 Hypoxie-Exposition

Als Hypoxiekammer diente ein befeuchteter Inkubator mit Temperaturkontrolle (Modellnummer 3165) der Firma Forma Scientific, Labotect, Göttingen. Dieses Gerät erlaubt die Einstellung der O₂-Konzentration im Inneren des Inkubators auf einen Wert zwischen 0 und 21% bei gleichzeitig konstantem CO₂-Gehalt von 5%. Während der Experimente wurden die VSMCs bei einer Temperatur von 37°C einem Gasgemisch ausgesetzt, das aus 1% O₂, 5% CO₂ und 94% N₂ bestand. Normoxie wurde als 95% Raumluft und 5% CO₂ definiert. Die VSMC wurden vor der Hypoxiebehandlung mindestens 24h durch Serumentzug synchronisiert, als „serumfrei“ galt hierbei ein FKS- Gehalt von 0,4% bei hVSMC und 0,0 % bei rVSMC. Unmittelbar vor Beginn des Hypoxieexperimentes wurde bei der normoxischen und hypoxischen Versuchsgruppe das Medium erneuert. Die Lebensfähigkeit der VSMCs wurde mittels Trypanblau-

Ausschlußfärbung und Laktatdehydrogenaseaktivität bestimmt und durch die Hypoxie nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

2.1.5 Antikörper und Western-Blot-Reagentien

Der Antikörper gegen β_1 - (P5D2) wurde bei der Developmental Studies Hybridoma Bank gekauft. Die Firma Centocor, Malvern, PA, stellte freundlicherweise den Antikörper gegen β_3 - Integrin (7E3) zur Verfügung. FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markierte Sekundärantikörper (anti-Ziege, anti-Maus, anti-Hase) waren von Sigma. Als Kontrollimmunoglobulin diente ein unspezifisches IgG der Maus (ebenfalls von Sigma). Der gegen das aktivierungsabhängige Epitop des β_1 -Integrins gerichtete Antikörper 9EG7 kam von Pharmingen. Anti- α -smooth-muscle-actin kam von DAKO.

Antikörper gegen phosphospezifische (Thr202/Tyr204) und Gesamt-ERK1/2 waren von Promega, Antikörper gegen phosphospezifische (Thr180/Tyr182) und gegen Gesamt-p38 - MAPK kamen von Cell Signaling. Antikörper gegen phosphorylierte PKC ϵ und Gesamt PKC ϵ wurden von Upstate erworben.

Western-Blot-Detektions-Reagentien kamen von Amersham Life Science.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Wir gewannen humane vaskuläre glatte Muskelzellen der Arteria (HIASMCs) und Vena iliaca (HIVSMCs) und der Aorta (aVSMCs) aus dem Lebertransplantationsprogramm des Universitätsklinikums Charité, Campus Rudolf-Virchow-Klinikum. Die Genehmigung zur Aufarbeitung der menschlichen Zellen erfolgte am 17.11.1997 durch die Ethikkommission. Aortale glatte Muskelzellen aus Sprague-Dawley-Ratten wurden in Kooperation mit der gefäßchirurgischen Abteilung aus explantierten Aorten für Experimente gezüchteter erwachsener Tieren gewonnen.

Das Präparieren aller glatten Muskelzellen erfolgte nach der Auswachsmethode von Ross und Kariya („explant technique“) ⁹⁹. Die Zellen wurden bei 37° C und 5% CO₂ in Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM) kultiviert. Dieses enthielt 10% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 200 mmol/l L-Glutamin. Das Medium wurde etwa alle drei Tage erneuert. Die Identifizierung der glatten Muskelzellen erfolgte anhand ihrer charakteristischen Hügel- und Tal- Struktur sowie durch regelmäßig durchgeführte immunhistochemische Färbungen mit einem gegen alpha-smooth-muscle-actin gerichteten Antikörper, die eine Spezifität von etwa 90% zeigten. Wenn die Vermehrung der glatten Muskelzellen in der Kulturschale zur Konfluenz geführt hatte (etwa alle drei Wochen), wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 bzw. 1:4 passagiert.

Experimente mit subkonfluenten Zellen, die vorher 24h durch Serumentzug synchronisiert worden waren, fanden bei hVSMC zwischen der 3. und 7. ,bei rVSMCs zwischen der 3. und 9. Passage statt.

2.2.2 Adhäsion

Die Bestimmung der Fähigkeit glatter Muskelzellen, an einer bestimmten Matrixkomponente zu adhären, erfolgte durch die Methode nach Liaw (Quantifizierung der Zellzahl) ¹⁰⁰.

Versuchsplatten mit 96 Kammern wurden mit Fibronectin bzw. Kollagen Typ I (100µl je Kammer) bedeckt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurde das Protein abgesaugt und während einer Stunde durch eine 10% Lösung bovines Serumalbumin (BSA) in Phosphat gepufferter Saline (PBS) bei 37°C ersetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu

blockieren. Bei Experimenten, die den Einfluss von Pharmaka, Inhibitoren oder Antikörpern untersuchten, wurden diese Substanzen anschließend appliziert und 30 min vorinkubiert. Die Zellen wurden durch Trypsinieren (0,25% Trypsin (Gibco) in PBS) gelöst, dieser Vorgang wurde nach wenigen Minuten durch kurzes Antagonisieren mit Antitrypsin enthaltendem 10% FKS- Medium beendet. Nun wurden die Zellen zentrifugiert (4 min bei 1200 Umdrehungen/min), das Zentrifugat (Pellet) in serumfreiem Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in serumfreiem Medium resuspendiert. Nach Auszählen der Zellen in einer Neubauerkammer wurden sie in geeigneter Weise verdünnt, so dass eine Kammer 10000 (rVSMCs) bzw. 30000 (hVSMCs) Zellen in 100µl Serum enthielt. Die Dauer des Adhäsionsvorgangs bei 37°C betrug 60 min (hVSMCs) bzw. 30 min (rVSMCs). Jetzt wurden nicht-adherente Zellen mit PBS ausgewaschen, adhärenente Zellen mit 4% Paraformaldehyd 5 min fixiert, weitere 5 min mit 0,5% Toluidinblau in 4% Paraformaldehyd gefärbt und anschließend dreimal mit sterilem H₂O gewaschen. Unmittelbar vor der Messung wurden in jede Kammer 100µl 1% Natriumdodecylsulfat (SDS) pipettiert, was die Auflösung der Zellen und das Freisetzen des Farbstoffes zur Folge hatte. Das Messen der Absorption in einem ELISA - Reader bei 590nm erlaubte die indirekte Quantifizierung der Zahl adhärirter Zellen. Experimente wurden mindestens zweimal wiederholt, Ergebnisse eines repräsentativen Experiments sind als Durchschnittswerte ± Standardabweichung (SD) abgebildet.

2.2.3 Spreading

Das ungerichtete Ausbreiten (Spreading) glatter Muskelzellen wurde durch den von Yamamoto beschriebenen Versuchsaufbau untersucht¹⁰⁰, bei dem der prozentuale Anteil ausgebreiteter Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt wird. Die initialen Arbeitsschritte gleichen denen der Adhäsion bis zur Phase des Trypsinierens. Nach dem Auszählen der Zellen wurden hier 2000 Zellen pro Kammer in 100µl serumfreiem Medium ausgesetzt. Nun folgte die Inkubation bei 37°C, die je nach verwendetem Zelltyp 15 min (rVSMC) bzw. 40 min (hVSMC) dauerte, während der die Zellen auf der Matrixkomponente adhärirten und sich ausbreiten konnten. Wenn bei einem Experiment Pharmaka oder Antikörper verwendet wurden, so wurden diese nach einer Zeit von 5 bzw. 10 min hinzupipettiert, um den initialen Anheftungsvorgang nicht zu beeinflussen. Nach Ablauf der Spreadingzeit wurden die Kammern ausgewaschen und die verbleibenden Zellen mit 2% Formaldehyd 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit 0,5% Toluidinblau in 4% Paraformaldehyd für 5 min.

Nach dreimaligem Waschen mit sterilem H₂O begann die mikroskopische Auswertung des Versuchs. Bei 320facher Vergrößerung wurde in vier zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern pro Kammer die Anzahl ausgebreiteter Zellen und deren Gesamtzahl bestimmt. Als ausgebreitete Zellen galten Zellen, bei denen ein Zellkern sichtbar und/ oder deren Form nicht rund war. Experimente wurden mindestens zweimal wiederholt, jeder Ansatz erfolgte im Duplikat. Durchschnittswerte +/- SD eines repräsentativen Experiments sind abgebildet.

2.2.4 Migration

Zur Untersuchung der Migration glatter Muskelzellen diente die modifizierte Methode mit der Boyden - Kammer ¹⁰¹. Diese besteht aus einer Kammer, in die ein kleinerer Filter aus Polycarbonat gehängt wird, der 8µm große Poren besitzt, wodurch ein zweites, inneres Kompartiment entsteht. Nach Beschichten mit Kollagen Typ I respektive Fibronectin bei 4°C über Nacht wurden die präkonfluenten Zellschalen wie oben beschrieben trypsiniert, in PBS gewaschen, ausgezählt und 30000 Zellen in 200µl serumfreiem Medium in die innere Kammer gefüllt, wogegen die äußere Kammer 0,7 ml reinen Mediums (ohne Zellen) enthielt. Nun folgte zur Adhäsion das Inkubieren der Kammer bei 37°C für 60 min bzw. 30 min bei rVSMC. An dieser Stelle wurden gegebenenfalls Antikörper und Pharmaka hinzugefügt und 30 min gewartet. Die Induktion der Migration erfolgte durch Gabe von 10 ng/ml PDGF-BB in 0,7 ml in die äußere Kammer. Nach 5 h begann die Fixierung der Zellen durch Absaugen des Mediums, Gabe von Methanol und 20 minütigem Kühlen der Boyden- Kammer bei -20°C mit anschließender Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Die Anzahl der zur Unterseite des Filters migrierten Zellen ließ sich durch Auszählen von vier Gesichtsfeldern bei 320facher Vergrößerung ermitteln. Als „migriert“ wurden Zellen definiert, die auf ihrem Weg in den unteren Teil Poren des Filters steckengeblieben oder auf der Unterseite des Filters zu sehen waren. Dies war durch Fokussieren in der Porenebene klar zu erkennen. Alle Experimente wurden mindestens zweimal mit unterschiedlichen Zelllinien wiederholt, Durchschnittswerte eines repräsentativen Experiments ± SD sind abgebildet.

2.2.5 Durchflußzytometrie

Die Expression von Integrinen an Zelloberflächen wurde, wie von Slepian beschrieben, mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt³³. Trypsinierte Zellen wurden mit 4°C kaltem PBS gewaschen und zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen 20 min in kaltem FACS-PBS, das keine Calcium- und Magnesiumionen enthielt, mit 5% BSA unter ständiger Bewegung auf Eis inkubiert. Es folgte die 20minütige Inkubierung der Zellen mit Primärantikörpern, dann erneutes Waschen mit FACS-PBS und 20minütige Behandlung mit der FITC-markierten Sekundärantikörper-Lösung. Die Zellen wurden anschließend mit 4% Paraformaldehyd fixiert und darauf in FACS-PBS gewaschen und resuspendiert. Zum Messen der Fluoreszenz diente ein FACScalibur-Flußzytometer von Becton-Dickinson, zur Kontrolle wurde ein unspezifisches Maus-IgG benutzt. 97% der Fluoreszenz dieses IgG wurden als unspezifische Bindung definiert, die als M1 gerastert wurde. Das Raster M2 war definitionsgemäß die Fluoreszenz der spezifischen Bindung, welche M1 gegenübergestellt wurde. Die Differenzierung toter und beschädigter von lebenden intakten Zellen geschah durch eine Fluoreszenzanalyse, bei der die Zellgröße gegen die mittlere Fluoreszenz aufgetragen wurde. Um eine bestimmte Menge von Zellen, welche lebenden Zellen entsprachen, wurde ein Raster gelegt und zur weiteren Analyse verwendet. Die Fluoreszenz wurde logarithmisch auf der x-Achse, die Anzahl der Zellen auf der y-Achse linear aufgetragen. Experimente wurden mindestens zweimal wiederholt.

2.2.6 RT-PCR

Die Isolierung der Gesamt-RNA gelang mit Hilfe von Trizol (Gibco). Jede Probe wurde mit 200µl Chloroform pro 1000µl Trizol gemischt und mit einer Geschwindigkeit von 120000 1U/min während 10 min bei 4°C zentrifugiert. Um die RNA zu präzipitieren, wurde die farblose obere Phase mit 500µl Isopropanol pro 1000µl Trizol gemischt und in gleicher Weise zentrifugiert. Das RNA-Zentrifugat wurde zweimal mit 1000µl Ethanol (75%) pro 1000µl Trizol gewaschen und erneut in gewohnter Weise 8 min zentrifugiert, anschließend getrocknet und in Diethylprocarbonatwasser (DEPC) resuspendiert. Die RNA-PCR erfolgte in beschriebener Weise¹⁰². 1µg RNA wurde durch Gabe von 200 µl Superscript TM (Gibco) in 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol (Gibco); 0,5 mM Deoxynukleo-

tidtriphosphat (dNTP, Gibco) und 100ng/20µl zufälligem Hexamer revers transkribiert. In einem Gesamtvolumen von 25 µl waren in diesem Mix 2µl des cDNA Produktes, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 8 pmol jeden Primers und 1,5 U Taq DNA-Polymerase enthalten.

Die PCR erfolgte in einem PTC-100 Thermal Cycler der Firma Biozym als „hot start“- PCR. Nach einer fünfminütigen initialen Denaturierung bei 95°C folgte die PCR-Amplifizierung durch Denaturierungsschritte von 30 s bei 95°C. Anschließend erfolgten Anheftungsschritte für 40 s bei 58°C, Primer-Erweiterung für 30s bei 72°C und eine zehnminütige finale Erweiterung bei 72°C. β₁ wurde 30 Zyklen, β₃ in 31 Zyklen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden durch Gel-Elektrophorese (2% Agarose Gel) getrennt und per Ethidiumbromid- Färbung dargestellt.

2.2.7 Western Blot

Nachdem die Zellen durch Serumentzug (24 oder 48h) synchronisiert worden waren, wurden sie für die jeweils angegebene Dauer der Hypoxie ausgesetzt. Bei Experimenten, in denen Inhibitoren verwendet wurden, erfolgte deren Zugabe 30 min vor Beginn der Hypoxiebehandlung. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe eines Gemisches aus Radioimmunoprecipitations - Puffer und Proteinaseinhibitoren 20 min auf Eis gekühlt. Gleiche Mengen an Protein (30µg) wurden durch SDS-PAGE (7,5% Standardgel) aufgeteilt und die Western-Blot Analyse gemäß Standardprotokollen²⁴ durchgeführt. Proteine wurden auf Nitrocellulosemembranen geblottet und dann mit Antikörpern inkubiert. Antikörper wurden in den Verdünnungen 1:500 (phospho p38 MAPK), 1:2000 (ERK 1/2) und 1:5000 (phospho ERK 1/2) verwendet. Immunoreaktive Banden wurden mit Meerrettichperoxidase-konjugierte Sekundäranantikörper (Verdünnung 1:1000) dargestellt. Die Peroxidase-Reaktion wurde durch ein ECL-Detektionssystem entwickelt (Amersham Corp.).

2.2.8 Statistik

Die Ergebnisse der Zellfunktionsexperimente (Adhäsion, Migration, Spreading) und der Durchflußzytometrie sind als Prozent der Kontrollgruppe angegeben. Zur Bestimmung der Signifikanz diente ein zweiseitiger Student's t-Test. Als signifikant wurden Werte von $p < 0,05$ angesehen. Bei der Analyse der Durchflußzytometrie erfolgte die Signifikanzbestimmung über einen Kolmogorov-Smirnov-Test, als signifikant galt hier ein D/s(n) - Wert $> 10^{-3}$.

3. Ergebnisse

3.1 Effekt von DFO

3.1.1 Effekt von DFO auf die Adhäsion glatter Muskelzellen

3.1.1.1 Einfluss unterschiedlicher Wirkstoffkonzentrationen auf die Adhäsion von glatten Muskelzellen der Ratte (rVSMC)

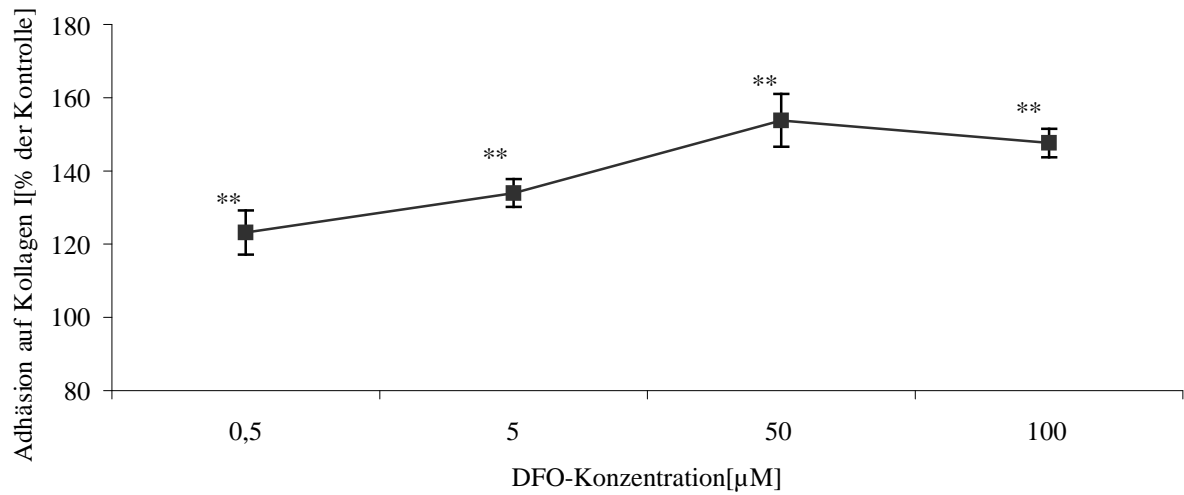
Es wurde untersucht, in welcher Weise sich unterschiedliche DFO-Konzentration auf die Adhäsion glatter Muskelzellen auswirken. Bei einer Inkubationszeit von 24h wurde als kleinste Konzentration 0,5µM, als größte 100 µM ausgewählt. In Abb. 1A sind die Ergebnisse eines beispielhaften Experiments dargestellt.

Man erkennt eine signifikante und konzentrationsabhängige Steigerung der Adhäsion auf beiden Matrices. Sowohl bei Kollagen I als auch bei Fibronectin konnte ein bogenförmiger Verlauf dokumentiert werden.

Bei der Adhäsion auf Kollagen Typ I (20µg/ml) zeigt sich das Maximum mit 154% ($\pm 15\%$, $p < 0,001$) der unbehandelten Kontrollgruppe bei einer DFO-Konzentration von 50 µM. Bereits bei 0,5 µM DFO erreicht die Kurve 124% (± 11 , $p < 0,01$), anschließend steigt sie über 135% ($\pm 8\%$, $p < 0,01$) bei 5µM DFO auf das schon beschriebene Maximum bei 50µM an, worauf die Adhäsion bei 100 µM leicht auf 148% ($\pm 9\%$, $p < 0,01$) absinkt.

Ein ähnliches Bild ergibt sich auf Fibronectin (20µg/ml). Hier erreicht die Verlaufskurve im untersuchten Bereich bereits ab 5µM DFO ein Plateau mit einem Maximum von 169% ($\pm 7\%$, $p = 0,01$) der Kontrollgruppe bei 5µM, jedoch wurden auch bei einer Konzentration von 50µM noch 163% ($\pm 5\%$, $p = 0,01$) erreicht. Etwas niedriger lag die Adhäsion bei 0,5µM (153% $\pm 5,1\%$, $p = 0,04$) sowie bei 100µM (125% der Kontrollgruppe ($\pm 4\%$, $p = 0,1$)). Diese Ergebnisse sind in Abb. 1b dargestellt. In der Folgeexperimenten wurden 50 µM DFO als potenteste Konzentration verwendet.

a.



b.

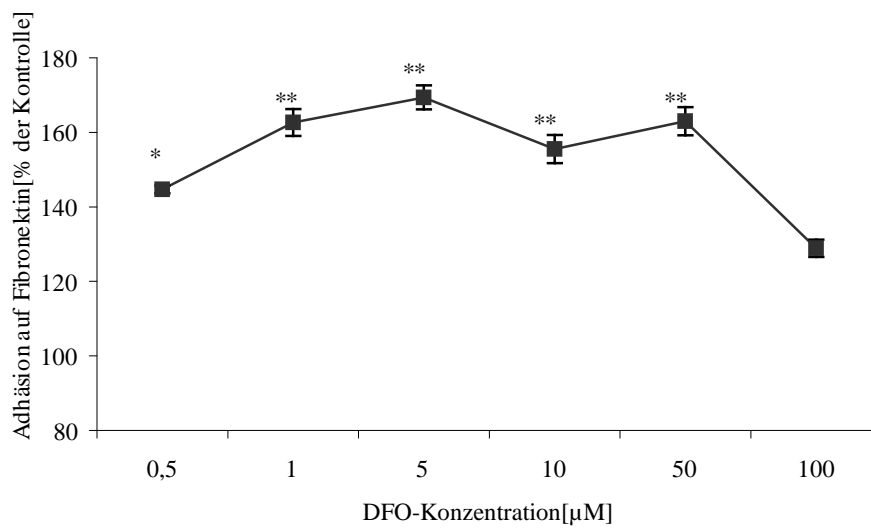


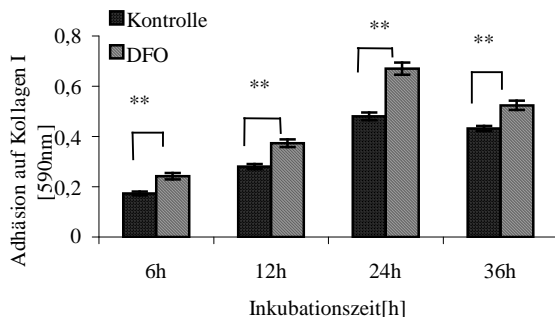
Abbildung 1: DFO steigerte die Adhäsion von rVSMC auf Kollagen I (a.) und Fibronektin (b.) in konzentrationsabhängiger Weise. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$ gegenüber Kontrolle.

3.1.1.2 Einfluss der Inkubationszeit auf die Adhäsion

Abbildung 2 zeigt, dass der Effekt von DFO auf die Adhäsion glatter Muskelzellen zeitabhängig ist.

Die DFO-Inkubationszeit in mehreren Einzelerperimenten betrug zwischen sechs und 36h. Bereits nach sechs Stunden ist ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten auf Kollagen I zu erkennen. DFO erreicht hier eine Absorption von $0,242(\pm 0,013; p=0,002)$. Dies entspricht 140% der Kontrollgruppe. Mit zunehmender Inkubationsdauer tritt ein kontinuierlicher Anstieg der Absorption mit einem Maximum bei 24h ein ($0,670 \pm 0,024, p < 0,0001$). Die Größenordnung des Effektes ändert sich auch bei längeren Inkubationszeiten nur geringfügig, die Verlaufskurve gelangt nach 24h mit 143% ($\pm 7\%, p=0,001$) der Kontrollgruppe an ihren höchsten Punkt. Ein deutlicher Abfall der Adhäsion ist erst bei 36h zu beobachten ($0,505 \pm 0,034, 115\%$ der Kontrollgruppe $p < 0,05$).

a.



b.

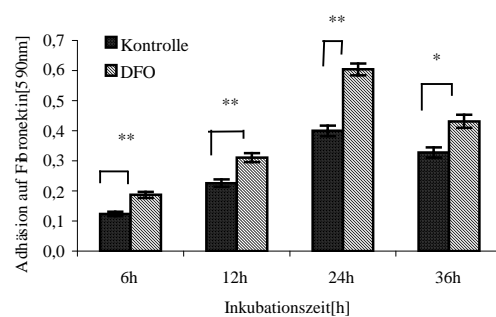


Abbildung 2: Einfluss der DFO-Inkubationszeit auf die Adhäsion von rVSMC auf Kollagen I (a.) und Fibronectin (b.). Auf beiden Matrices tritt nach 24 Stunden Inkubationszeit maximale Absorption ein. Prozentual ändert sich der Absorptionsunterschied zwischen 6h und 24 h Hypoxie nicht signifikant. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe.

3.1.1.3 Adhäsion auf unterschiedlichen Proteinkonzentrationen

Die Konzentration an extrazellulärem Matrixprotein beeinflusst Zell-Matrix-Interaktionen. Dieser Einfluss wurde im Bereich zwischen 0,5 und 50 $\mu\text{g/ml}$ untersucht (Abbildung 3).

Bei 0 und 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen Typ I konnte nur ein geringer Anstieg der Absorption festgestellt werden. Bereits hier ist jedoch ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten unter DFO zu beobachten. Bei weiter zunehmender Kollagen-I-Konzentration kommt es zu einem deutlichen konzentrationsabhängigem Anstieg der Absorption. Maximale Adhäsion konnte bei 50 $\mu\text{g/ml}$ gemessen werden ($0,796 \pm 0,041$ vs. $0,671 \pm 0,031$, $p < 0,05$). Die größte prozentuale Steigerung der DFO-Gruppe wurde jedoch zwischen 5 $\mu\text{g/ml}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen I gemessen ($0,758 \pm 0,025$ vs. $0,614 \pm 0,030$; dies entspricht 130% der Kontrollgruppe, $p < 0,001$) weshalb die nachfolgenden Experimente auf 20 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen Typ I ausgeführt wurden.

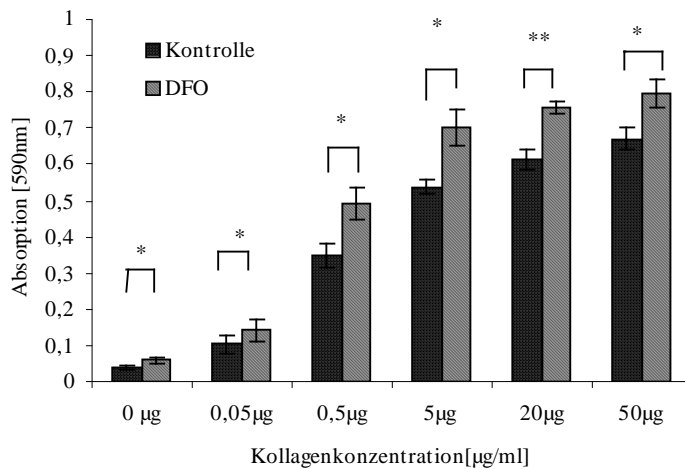


Abbildung 3: Der Anstieg der Adhäsion von rVSMC ist von der Kollagen-I-Konzentration abhängig. DFO führt bei allen Konzentrationen zu einer signifikanten Zunahme der Absorption. Prozentual ist dieser Unterschied bei allen Kollagenkonzentrationen vergleichbar und im Bereich von 20 $\mu\text{g/ml}$ am stärksten ausgeprägt. *= $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$ gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.1.2 Spreading

3.1.2.1 Spreadingverlauf auf Kollagen Typ I und Fibronektin

Das Ausbreiten der abgerundeten Zellen auf proteinbeschichteten Matrizes ist ein essentieller Schritt bei der Neuorganisation der Zell-Matrix-Verbindungen, den alle adhärierenden Zellen durchlaufen. Daraus ist ersichtlich, dass das Ausmaß des Spreadings nach oben begrenzt ist, da nach einer gewissen Zeit alle Zellen ausgebreitet sind, womit der Anteil gespreadeter Zellen dann 100% beträgt. Eine Fotografie dieser späten Phase des Spreadings ist in Abbildung 4 dargestellt.

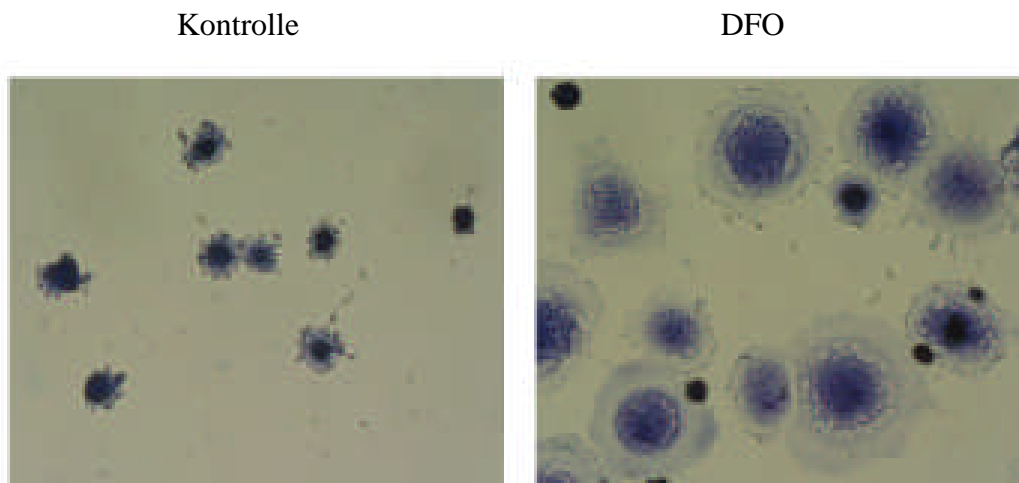


Abbildung 4: Spreading von VSMC auf Kollagen I {20 μ g/ml}. Die Aufnahme zeigt das Spreading nach 30 min. Alle Zellen zeigen bereits Zellausläufer und sind daher als „gespreadet“ zu werten. Die mit DFO vorinkubierten Zellen befinden sich bereits in einem deutlich fortgeschrittenen Stadium.

Der Anteil ausgebreiteter Zellen an der Gesamtzahl der rVSMCs wurde nach 15, 30, 60 und 90 Minuten untersucht. DFO stimulierte das Spreading von rVSMC in Abhängigkeit der Zeit. Betrachtet man die Spreading-Verlaufskurve auf Kollagen Typ I in Abbildung 5a, so fällt auf, dass die Kurven zu Beginn einen steilen Anstieg beschreiben, der ab 30 Minuten abflacht. Vorinkubation mit DFO führt zu einer Linksverschiebung. Der deutlichste Unterschied besteht nach 15 Minuten, wo schon 77 ± 6 % DFO-Zellen im Gegensatz zu 43 ± 4 % der Kontrollgruppe ausgebreitet sind. Nach 30 min sind die vorbehandelten Zellen zum Großteil ausgebreitet (94 ± 3 %), und auch die unbehandelte Kontrollgruppe erreicht 92 ± 5 % (alle

p<0,0001). Im folgenden steigt der Anteil gespreadeter Zellen nur noch gering, bis schließlich nach 90 Minuten alle Zellen ausgebreitet sind. Die Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen sind zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant p=0,08).

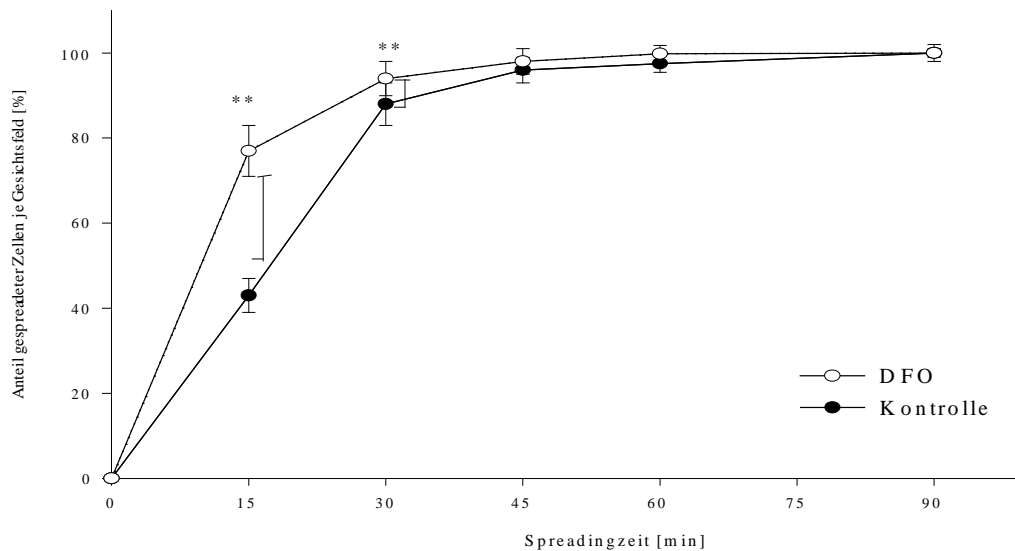


Abbildung 5a: Spreadingverlauf auf Kollagen I {20µg/ml} bei ansteigenden Spreadingzeiten. Durch Einfluss von DFO kommt es zu einer Linksverschiebung der Verlaufskurve. **= p<0,001 gegenüber der Kontrollgruppe.

Der Verlauf auf Fibronectin ist der Form nach ähnlich, die Ausbreitung der Zellen erfolgt hier jedoch langsamer (Abbildung 5b). Nach 15 min liegt die Spreading-Rate von DFO erst bei 55 % (± 3%), wogegen die Kontrollgruppe erst zu 31% ausgebreitet ist (± 5%). Nach einer halben Stunde ist dieser Anteil auf 50% (± 4%) angestiegen, die Werte für DFO liegen nun aber bereits bei 76 % (± 4%, alle p<0,01). Erst nach 60 Minuten nähern sich die beiden Kurven an (Kontrolle: 82% ± 5%, DFO 92% ± 2%), nach 90 Minuten erreicht die Kontrollgruppe 96,0% (± 2%), DFO 99,0% (± 1%).

Bei den anschließenden Spreading-Experimenten wurden die Zellen auf Kollagen Typ I nach 15 Minuten, auf Fibronectin nach 30 Minuten fixiert.

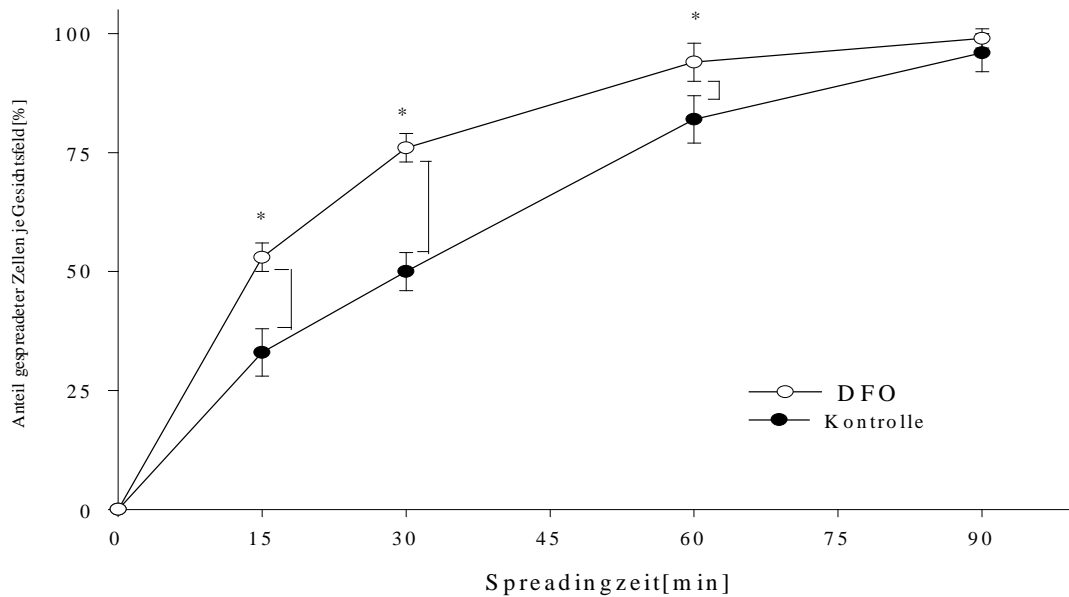


Abbildung 5b: Unter Einwirkung von DFO kommt es, wie schon auf Kollagen I (Abb. 4a) ,zu einer Beschleunigung des Spreadings auf Fibronectin {20µg/ml} mit Linksverschiebung der Verlaufskurve. *=p<0,05 gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

3.1.2.2 Spreading auf unterschiedlichen Matrixkonzentrationen

Wie schon die Adhäsion wurde auch das Spreading der VSMC durch ansteigende Konzentrationen der extrazellulären Matrix stimuliert (Abbildung 6a). Die Konzentrationen der extrazellulären Matrixproteine Kollagen Typ I und Fibronectin lagen zwischen 0,5 und 50 µg/ml, die Fixierung erfolgte auf Kollagen Typ I nach 15 min, auf Fibronectin nach 30 min Spreadingzeit.

Bei einer Kollagenkonzentration von 0,5 µg/ml ist schon ein Unterschied in der Spreadingfähigkeit zu erkennen, die DFO-behandelten Zellen sind um 20 % ($\pm 6\%$, $p=0,004$) stärker ausgebreitet als die Kontrollgruppe. Durch zunehmende Kollagenkonzentrationen wird dieser relative Unterschied größer und erreicht bei 5µg/ml 140% ($\pm 8\%$, $p=0,003$). Der größte Unterschied zur Kontrollgruppe findet sich bei einer Kollagenkonzentration zwischen 10 und 20 µg/ml. Die Werte liegen hier bei 158% ($\pm 7\%$, $p<0,01$) respektive 162% ($\pm 8\%$ $p<0,008$). Bei weiter ansteigenden Kollagenkonzentrationen verringert sich die Differenz, da nun auch die Kontroll-

gruppe besser spreadet und sich so den DFO-Werten nähert. Bei 50µg/ml beträgt der Spreadinganteil der DFO-Gruppe 118% ($\pm 6\%$, $p < 0,005$).

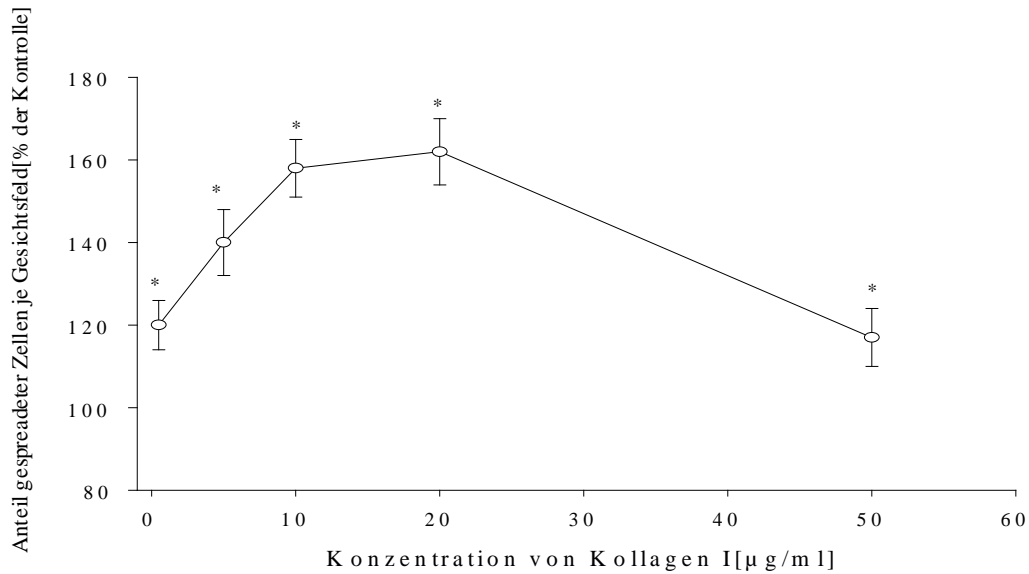


Abbildung 6a: Die Konzentration von Kollagen I vermochte das Spreading von mit DFO inkubierten rVSMC zu modulieren. Maximale Spreadingfähigkeit wurde bei 20 µg/ml beobachtet. * = $p < 0,05$ gegenüber Kontrolle, Kontrolle in der Grafik = 100%.

Der Verlauf auf Fibronectin nach einer Spreadingzeit von 30 min glich weitgehend dem auf Kollagen Typ I (Abbildung 6b). Das Spreading bei 0,5µg/ml liegt mit 132% ($\pm 5\%$) auf Fibronectin etwas höher als auf Kollagen Typ I. Bei ansteigender Fibronectinkonzentration erfolgt bei 5µg/ml ein leichter Anstieg auf 142% ($\pm 6\%$). Der maximale Unterschied zwischen Kontrollgruppe und DFO zeigte sich mit 157% ($\pm 5\%$) bei einer Fibronectinkonzentration von 20µg/ml. Der Gipfel ist hier deutlicher als auf Kollagen Typ I, da das Spreading der mit DFO-behandelten Zellen auf 10µg/ml nur 149% der Kontrolle erreicht ($\pm 7\%$). Bei 50µg Fibronectin je ml sinkt der relative Unterschied zwischen den DFO-behandelten Zellen und der Kontrollgruppe auf 129% ($\pm 4\%$, alle $p < 0,05$).

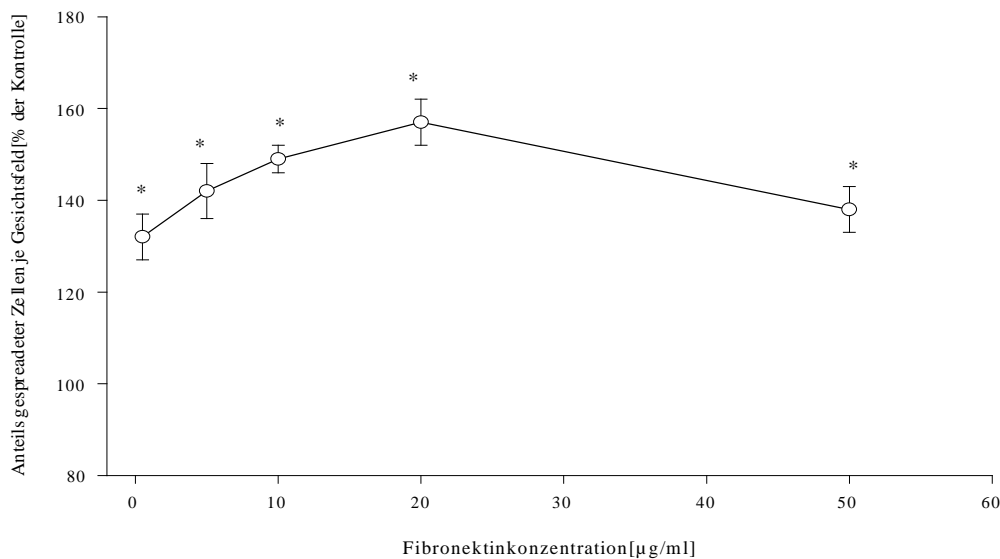


Abbildung 6b: Das Spreadingverhalten DFO-behandelter rVSMC auf Fibronectin ist von der Konzentration dieses extrazellulären Matrixproteins abhängig. Die maximale Steigerung des Spreadings im Vergleich zur Kontrollgruppe (= 100%) wurde bei Konzentrationen zwischen 10 und 20 µg/ml beobachtet. *= p<0,05 gegenüber der Kontrollgruppe.

3.1.3 Migration

3.1.3.1 Migrationsverlauf auf Kollagen Typ I

Auch die Migration glatter Muskelzellen der Ratte auf 20 µg/ml Kollagen Typ I ließ sich durch Vorbehandlung mit DFO (24h bzw. 4h) stimulieren (siehe Abbildung 7).

Bereits nach einer Stunde Migrationszeit ist ein signifikanter Unterschied im Migrationsverhalten festzustellen, zu diesem Zeitpunkt sind bei den mit DFO behandelten rVSMC bereits 26 ± 4 Zellen je Gesichtsfeld migriert, während erst 10 ± 4 unbehandelte Zellen gezählt werden konnten ($p < 0,001$). Die relativen Unterschiede in der Migrationsleistung der stimulierten rVSMC sind mit kürzerer Dauer der Migration größer. Der deutlichste Unterschied ist bei einer Migrationszeit von 2h zu erkennen, wo die Werte für DFO 254% der Kontrollgruppe betragen ($\pm 13\%$, $p < 0,0002$). Die absolute Anzahl migrierter Zellen nimmt dagegen mit längerer Migrationszeit zu und erreicht bei 6h ein Maximum (41 ± 5 für DFO gegenüber 28 ± 4 für die Kontrollgruppe, $p < 0,001$).

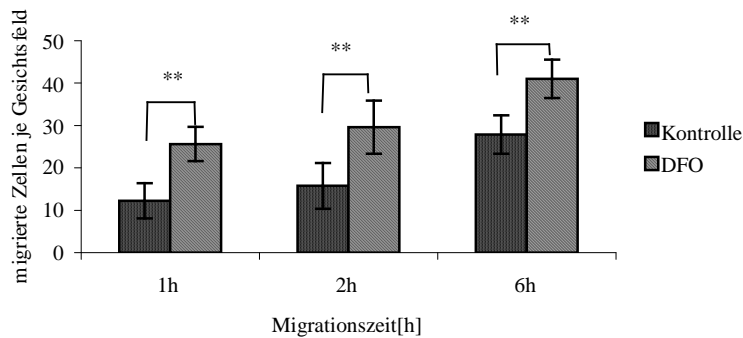


Abbildung 7: DFO führt zu einer Steigerung der Migration auf Kollagen I. Dieser Effekt ist bei kurzer Migrationszeit prozentual stärker ausgeprägt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe.

3.1.4 Abhängigkeit der gezeigten Effekte von β_1 - und β_3 -Integrinen

3.1.4.1 Inhibition von β_1 -Integrin verhindert den DFO-induzierten Anstieg des Spreading

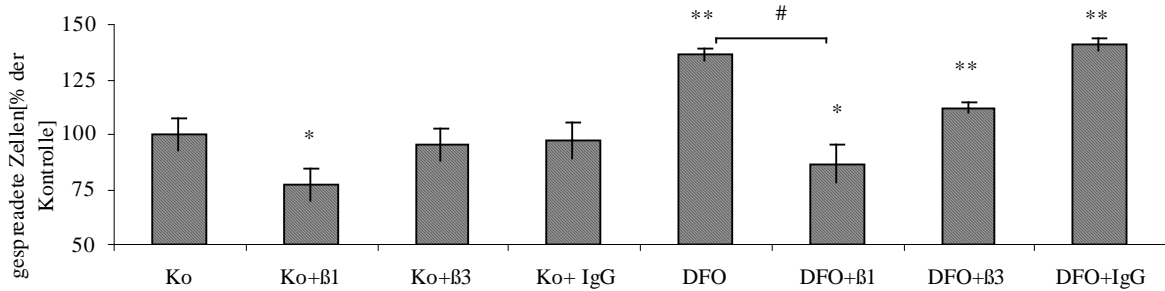
Der spezifische β_1 -Antikörper P5D2 inhibierte das Spreading mit DFO vorinkubierter humaner VSMC auf Kollagen I um 32,18% ($p < 0,0001$ gegenüber nicht inhibiertem DFO).

Mit diesem Antikörper vorinkubierte Zellen erreichten eine Spreadingrate von 86% der unbehandelten Kontrollgruppe ($p < 0,05$ gegenüber Kontrollgruppe). P5D2 inhibierte auch das Spreading der Kontrollgruppe um 22% ($p < 0,05$ vs. Kontrolle).

Dagegen vermochte der gegen β_3 -Integrin gerichtete Clon c7E3 weder das Spreadingverhalten der Kontrollgruppe noch der mit DFO vorinkubierten hu-VSMC signifikant zu beeinflussen. Vorinkubation mit einem unspezifischen IgG-Antikörper hatte ebenfalls keinen Einfluß. (Abb. 8a).

Auf Fibronektin zeigten sich gleichgerichtete Effekte. Allerdings ließ sich das Spreading hier auch durch Blockade des β_3 -Integrins signifikant hemmen. Vorinkubation mit c7E3 führte zu einer Abnahme des Spreading von DFO-vorbehandelten Zellen um 15% gegenüber nicht inhibierten DFO-Zellen. ($p < 0,001$) Auch auf Fibronektin lässt sich die größte Inhibition des Spreading durch Blockade von β_1 -Integrin durch P5D2 erreichen. Die Spreadingrate sank hier um 62,6% gegenüber unbehandeltem DFO ($p < 0,00001$ vs. DFO) und um 15,1% gegenüber der Kontrollgruppe. Das Spreading der Kontrollgruppe wurde durch P5D2 signifikant gehemmt ($p < 0,001$). Vorinkubation mit einem unspezifischen IgG-Antikörper hatte keinen signifikanten Effekt auf das Spreading auf Fibronektin.

a.



b.

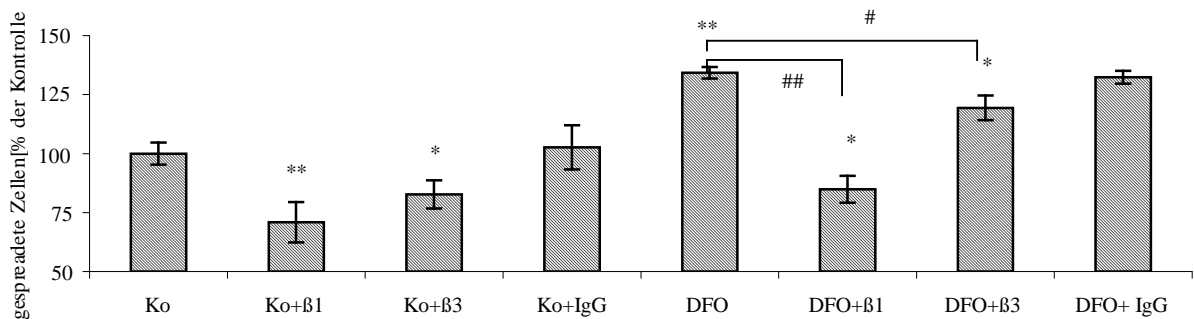


Abb. 8a: Durch selektive Blockierung des β_1 -Integrins mittels P5D2 bewirkte eine signifikante Inhibierung des Spreadings der mit DFO vorinkubierten hu-VSMC sowie der Kontrollgruppe auf Kollagen I. Der gegen β_3 -Integrin gerichtete Antikörper C7E3 vermochte dagegen keine der beiden Gruppen in ihrem Spreadingverhalten zu beeinflussen. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,001$ jeweils gegenüber Kontrolle (Ko). # = $p < 0,0001$ gegen DFO.

b. Das Spreading auf Fibronectin wird demgegenüber auch durch Blockade des β_3 -Integrins signifikant gehemmt. Die größte Bedeutung hat aber auch auf Fibronectin das β_1 -Integrin. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$, beide gegenüber Kontrolle. # = $p < 0,05$, ,'= $p < 0,0001$ vs. DFO

3.1.4.2 Der DFO-induzierte Migrationsanstieg ist β_1 - und β_3 - Integrin vermittelt

Auch der unter DFO-Einfluss eingetretene Anstieg der Migration von hu-VSMC auf Kollagen I {20 μ g/ml} ließ sich durch Vorinkubation mit dem gegen β_1 -Integrin gerichteten Clon P5D2 verhindern. DFO erreichte hier 122% der Kontrollgruppe (\pm 2%, $p < 0,05$). Mit DFO und P5D2 vorinkubierte Zellen verzeichneten demgegenüber einen Rückgang der Migration auf 76% der Kontrollgruppe (\pm 12%, $p < 0,05$), was gegenüber DFO einem Rückgang der Migration um 37,7% entspricht. Auch der gegen β_3 gerichtete Clon c7E3 verhinderte den Anstieg der Migration durch DFO. Diese Zellen erreichten nur 86% der Kontrollgruppe (\pm 6%, $p = 0,03$). P5D2 und c7E3 reduzierten auch die Migration der unbehandelten Kontrollgruppe auf 71% (\pm 3%, $p = 0,005$) respektive 77,72% (\pm 2%, $p = 0,01$, Abb. 9)

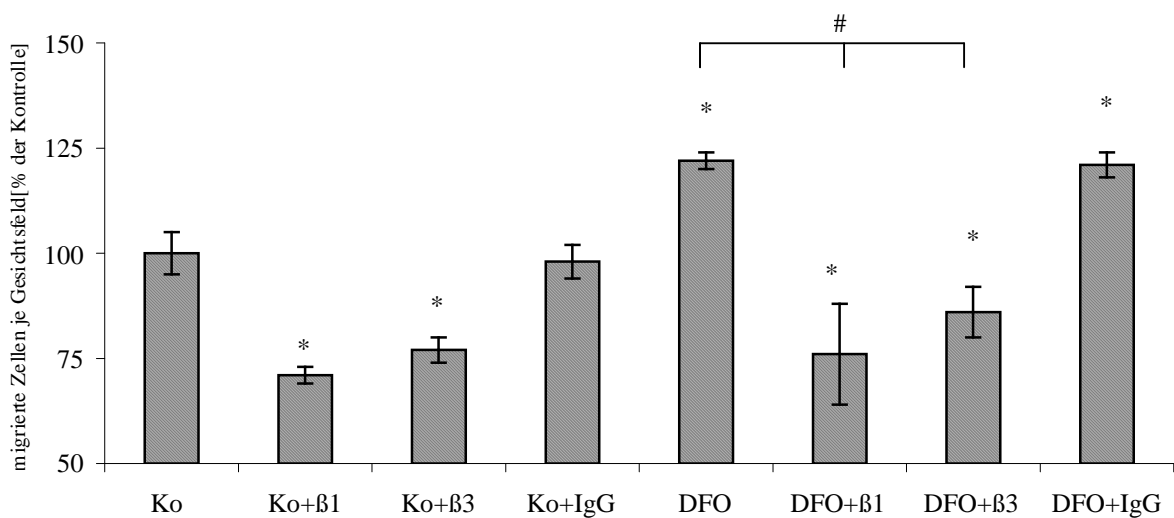


Abbildung 9: Vorinkubation mit den Antikörpern P5D2 (β_1) und C7E3 (β_3) verhinderten den durch DFO bedingten Anstieg der Migration humaner VSMC auf Kollagen I {20 μ g/ml}. Auch die Migration der Kontrollgruppe (Ko) wurde signifikant inhibiert. * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe, # = $p < 0,05$ gegenüber DFO.

3.1.5 Integrinexpression

Zur Interpretation der gezeigten Ergebnisse wurden Expressionsanalysen der Integrine β_1 und β_3 auf RNA-Ebene mittels Western-Blot durchgeführt. In mehreren voneinander unabhängigen Versuchen konnten hierbei keine signifikanten Veränderungen der absoluten Integrinanzahl festgestellt werden (Abbildung 10).

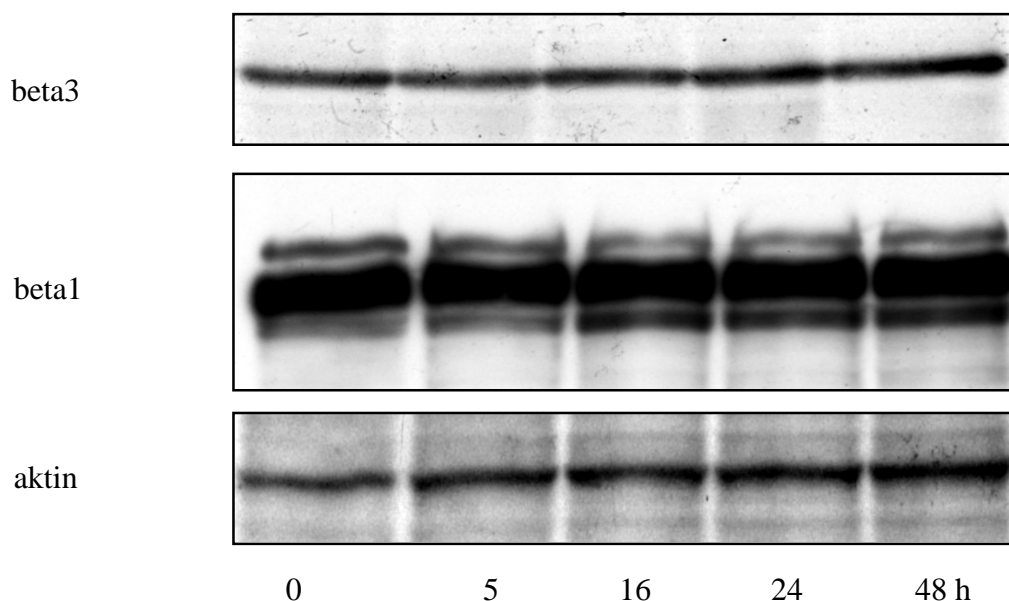


Abbildung 10: Repräsentativer Westernblot von kultivierten hVSMC. Die Expression von β_1 - und β_3 - Integrin im Western-Blot wird durch unterschiedliche Inkubationszeit mit DFO nicht verändert

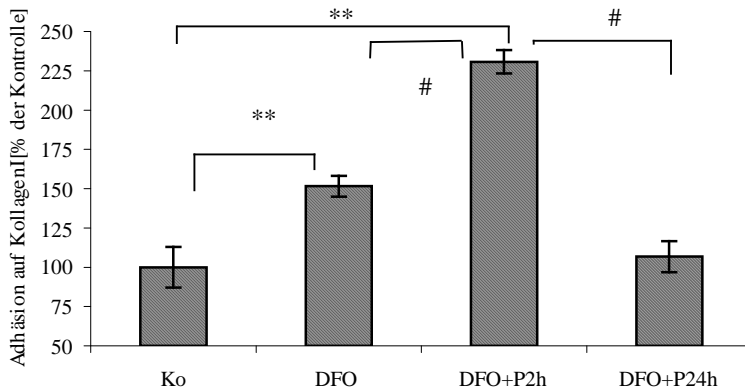
3.2 Signaltransduktion der gezeigten Effekte

3.2.1 Rolle der Proteinkinase C

Zur Hemmung der Proteinkinase C (PKC) wurde PMA ($1\mu\text{M}$, 24h Vorinkubation) verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt. Die Wirkung von PMA auf die PKC ist zeitabhängig. Kurzzeitige Stimulation (bis 8 h) steigert die Aktivität des Enzyms, während längere Einwirkung der Substanz zu dessen Hemmung führt^{104, 105}. Der durch DFO induzierte Anstieg der Adhäsion auf Kollagen Typ I ($152 \pm 7\%$, $p < 0,05$) wird durch Vorinkubation mit PMA (24h) verhindert. So kann nach zweistündiger Vorinkubation der DFO- Zellen mit PMA ein Anstieg der Adhäsion auf $231\% (\pm 7\%, p = 0,001)$ der Kontrollgruppe gesehen werden (Abb 11a).

Dieselben Effekte kann man auf Fibronectin feststellen, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung. Auch hier blockiert PMA (24h) die Adhäsion DFO-behandelter Zellen, die unbeeinflusst 144% erreicht ($\pm 7\%$, $p=0,001$). Der stimulierende Effekt einer zweistündigen Inkubation mit PMA fällt mit 197% ($\pm 3\%$, $p=0,0002$) niedriger aus als auf Kollagen Typ I (Abb 10b).

a.



b.

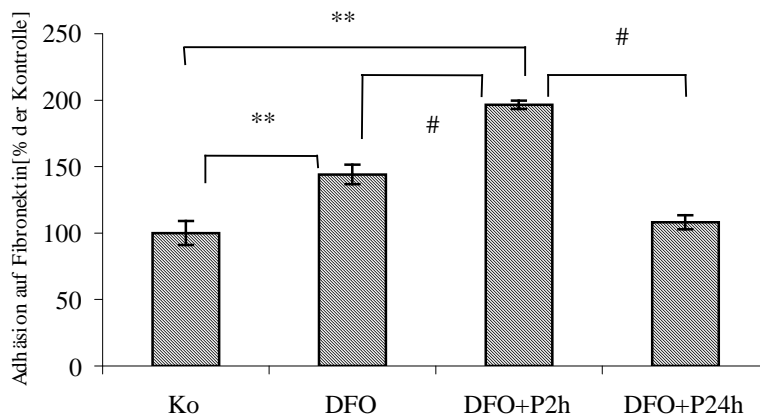
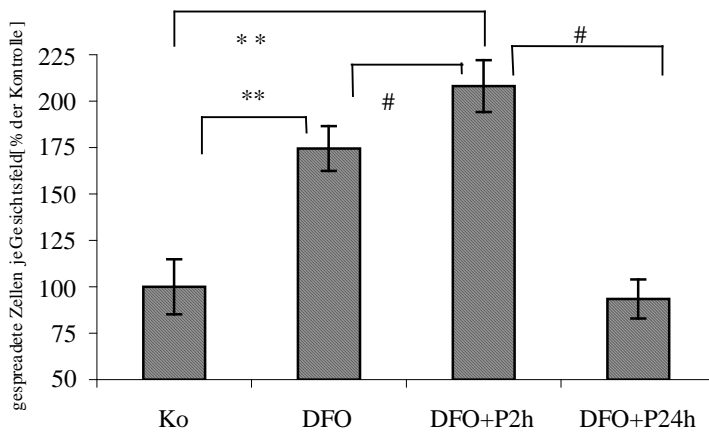


Abbildung 11: Der durch DFO induzierte Anstieg der Adhäsion auf Kollagen (a.) und Fibronectin (b.) wird durch Stimulation mittels zweistündiger PMA (P2h)-Behandlung verstärkt. Hemmung der Proteinkinase C durch 24stündige Einwirkung der Substanz (P24h) verhindert den Adhäsionsanstieg. * = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe, ** = $p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe (Ko). # = $p < 0,05$ gegenüber DFO + P2h

Beim Spreading auf beiden Matrices (Abbildung 12) waren dieselben PKC-vermittelten Effekte zu sehen. DFO erhöhte das Spreading auf Kollagen Typ I und Fibronectin um 171 und 179% (± 8 bzw. 7%, $p < 0,001$), was durch Blockade der PKC durch PMA (24h) verhindert wurde. Stimulierung der PKC durch zweistündige Vorinkubation mit PMA erhöhte das Spreading auf Kollagen Typ I auf 204% der Kontrollgruppe ($\pm 11\%$, $p < 0,001$), auf Fibronectin auf 208% ($\pm 7\%$, $p < 0,001$).

a.



b.

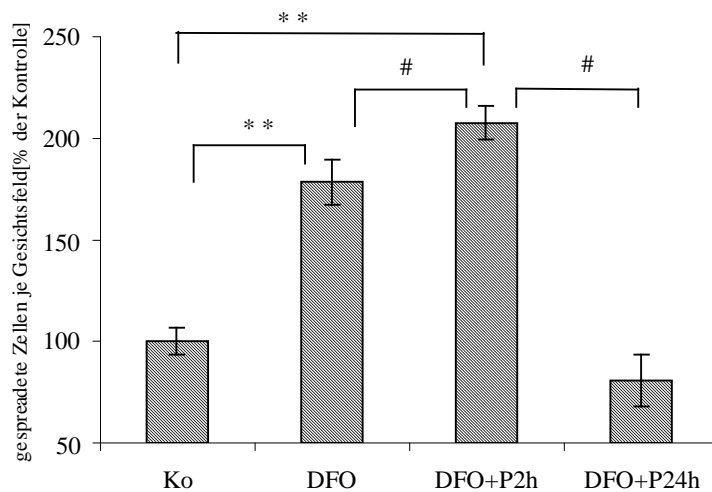


Abbildung 12: Auch der DFO-induzierte Anstieg des Spreadings wird auf Kollagen (a.) und Fibronectin (b.) durch Stimulieren der PKC mittels zweistündiger PMA-Inkubation (P2h) verstärkt. Blockierung der PKC durch 24stündige Einwirkung (P24h) der Substanz verhindert den DFO-Effekt. ** = $p < 0,001$ verglichen mit der Kontrollgruppe (Ko), # = $p < 0,05$ gegenüber DFO.

Die durch DFO induzierte Steigerung der Migration von rVSMC auf Kollagen I auf 239% ($\pm 16\%$) der Kontrollgruppe wird durch Inhibierung der Proteinkinase C mit PMA deutlich abgeschwächt ($165 \pm 7\%$, beide $p < 0,001$). Die Migration der Kontrollgruppe wurde durch PMA nicht signifikant beeinträchtigt (100% vs. $109 \pm 10\%$, $p = 0,1$)

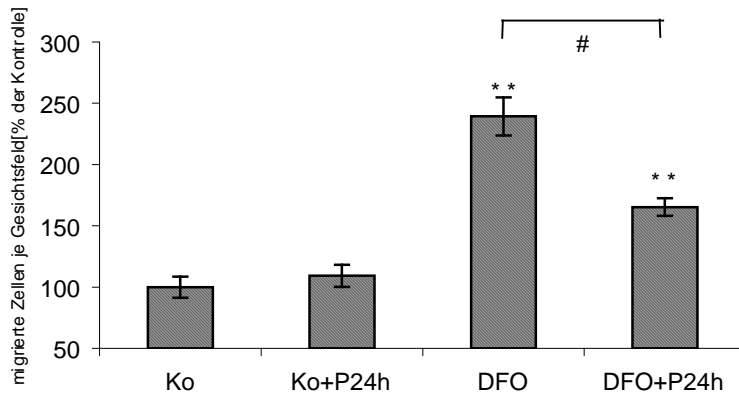


Abbildung 13: 24stündige Inkubation mit PMA (P24h) reduziert die DFO-induzierte Migrationssteigerung signifikant. Die Migration der Kontrollgruppe wird dagegen nicht verändert. ** = $p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe, # = $p < 0,05$ gegenüber DFO.

3.2.2 Beteiligung der MAP-Kinase an der Signaltransduktion

Um die Rolle der verschiedenen Stufen der MAP-Kinase zu beschreiben, wurden PD 98059 (30 μ M), ein spezifischer Inhibitor der ERK 1/2, und SB 203580 (1 μ M), ein p38- Inhibitor, verwendet.

Die durch DFO induzierte Adhäsionserhöhung (142%, \pm 5%, $p=0,001$) von rVSMC auf Kollagen I wird durch den Einfluss beider Substanzen signifikant inhibiert ($p<0,0001$ verglichen mit DFO). Die Adhäsion der Kontrollgruppe wurde dagegen nicht signifikant beeinträchtigt (Abbildung 14).

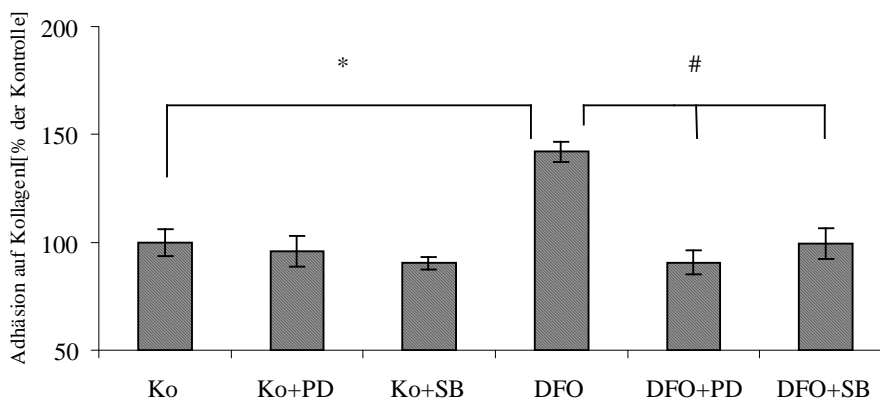
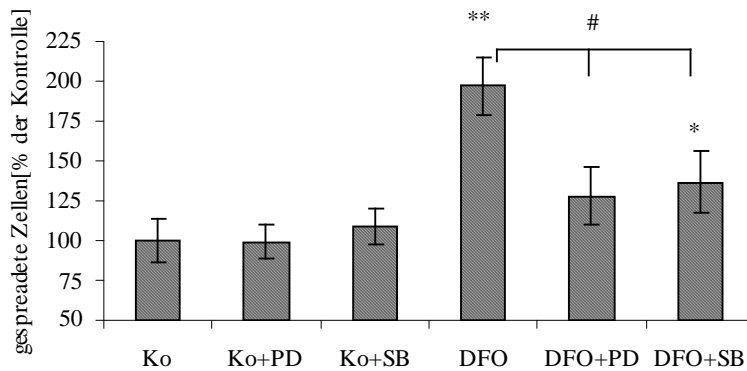


Abbildung 14: In Anwesenheit der MAP-Kinase-Inhibitoren unterbleibt der DFO-induzierte Adhäsionsanstieg. * = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe, # = $p < 0,001$ verglichen mit DFO).

Auch die durch DFO induzierte Steigerung des Spreadings (193%, \pm 9%, $p=0,003$) kann durch Inhibierung der MAP-Kinase verhindert werden. Der ERK1/2-Inhibitors PD98059 verhinderte den Anstieg des Spreadings auf Kollagen I vollständig (128%, \pm 18%, $p= 0,06$). Die Gegenwart des p38-Inhibitors SB 203580 führte zur Abschwächung des Anstiegs auf 137% (\pm 16%, $p=0,02$). Das Spreading der unbehandelten Kontrollgruppe wurde durch die Gegenwart der Inhibitoren nicht signifikant beeinträchtigt (Abbildung 15a).

Beim Spreading auf Fibronectin sind gleichgerichtete Effekte zu erkennen. SB203580 inhibierte den DFO-induzierten Anstieg des Spreadings (162 \pm 18%, $p=0,001$) auf 121% (\pm 11%, $p= 0,06$). PD 98059 führte zum Rückgang dieses Effekts auf 139% (\pm 5%, $p<0,001$) (Abbildung 15b).

a.



b.

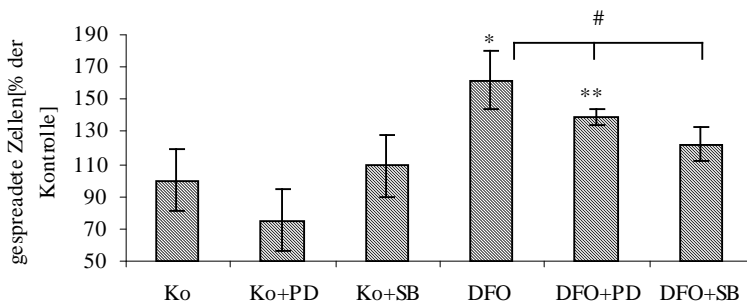


Abbildung 15: Spreading auf Kollagen I{20 μ g/ml} in Gegenwart der MAP-Kinase-Inhibitoren SB 203580 (1 μ M) und PD98059 (30 μ M) (a.). Beide Substanzen schwächen den Anstieg des Spreadings signifikant ab, PD98059 verhindert diesen vollständig. Das Spreading der Kontrollgruppe wird dagegen nicht beeinträchtigt.

b. Auf Fibronektin{20 μ g/ml} ist der Effekt von PD98059 schwächer, jedoch liegt auch hier eine signifikante Reduzierung des DFO-Effektes vor. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$ vs. Kontrollgruppe, # = $p < 0,001$ vs. DFO.

Auch bei der Migration sind gleichgerichtete Effekte zu erkennen. Unter Einwirkung von PD 98059 kommt es zu einem vollständigen Rückgang der DFO-induzierten Migrationszunahme ($137 \pm 5\%$, $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe) auf $101 \pm 4\%$ ($p < 0,05$ vs DFO). Der p38-Inhibitor SB 203580 führt zu einer Reduzierung des Migrationsanstiegs auf $117 \pm 5\%$, $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe. Die Migration der Kontrollgruppe wurde durch die Inhibitoren nicht signifikant beeinflusst (Abb. 16).

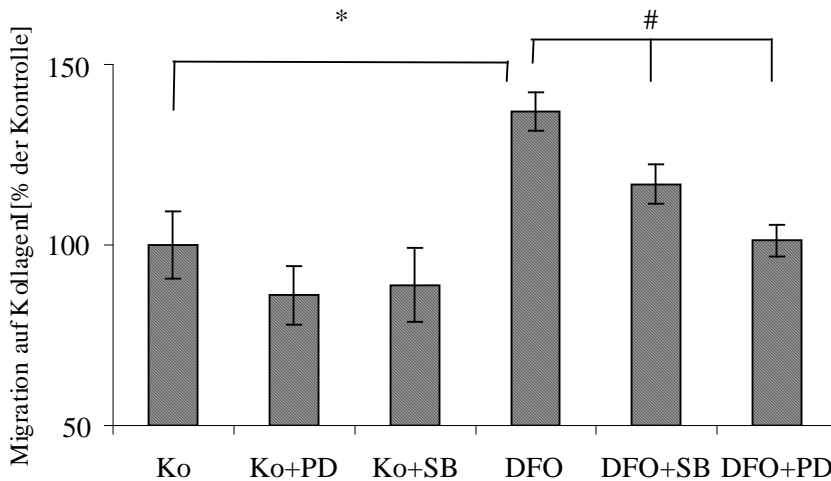


Abbildung 16: Der DFO-induzierte Migrationsanstieg tritt unter Einfluss des ERK1/2-Inhibitors PD 98059 ($30\mu\text{M}$) nicht ein, der p38-Inhibitor SB 203580 ($1\mu\text{M}$) verhindert diesen teilweise. * = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe, # = $p < 0,05$ vs DFO.

3.3 Effekt von Hypoxie

3.3.1 Einfluss von Hypoxie auf die Adhäsion glatter Muskelzellen

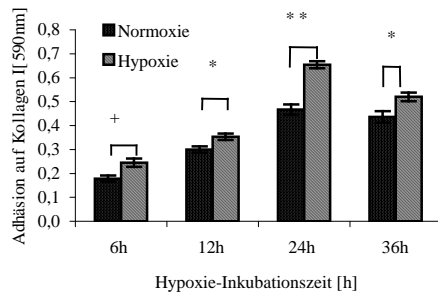
3.3.1.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die Adhäsion

Um den Einfluss der Einwirkung von Hypoxie auf die Adhäsion glatter Muskelzellen zu untersuchen, wurden Adhäsionsexperimente von rVSMCs nach 6h, 12h und 24h Hypoxie durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abb. 17 dargestellt.

Bereits nach 6h Hypoxiedauer ist bei rVSMC ein deutlicher proadhäsiver Effekt zu erkennen, der auf Kollagen Typ I {20µg/ml} 137% beträgt ($\pm 6\%$, $p=0,01$). Eine längere Dauer der Hypoxie ändert die prozentuale Adhäsionssteigerung nicht wesentlich. Ein Maximum wird nach 24h Hypoxie erreicht. Hier ist die Adhäsion der Hypoxie-behandelten Zellen um 140% gesteigert. In absoluten Zahlen bedeutet eine zunehmende Hypoxiedauer eine zunehmende Zahl adhärrender Zellen sowohl in der Hypoxie- als auch in der normoxischen Kontrollgruppe, so dass sich am prozentualen Ergebnis durch die längere Hypoxiedauer nichts ändert. Die maximale Absorption wird nach 24 h Hypoxie erreicht ($0,654 \pm 0,015$, $p>0,001$). Nach 36 h Hypoxie ist in beiden Gruppen ein Rückgang der Absorption festzustellen. (Hypoxie: $0,524 \pm 0,021$ vs $0,436 \pm 0,024$).

Auch die Adhäsion auf Fibronectin wird durch Inkubation in hypoxischer Umgebung in gleicher Weise gesteigert. Der Anstieg der Absorption ist jedoch nicht so ausgeprägt wie auf Kollagen I. Maximale Absorption wird auch hier nach 24h Hypoxie gemessen (Hypoxie : $0,502 \pm 0,037$, Normoxie $0,344 \pm 0,021$, $p < 0,001$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 17b dargestellt.

a.



b.

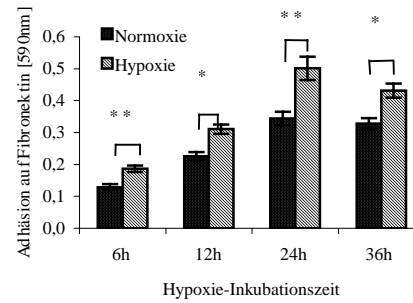


Abbildung 17 : Hypoxie führt zu einer signifikanten Zunahme der Adhäsion von rVSMC auf Kollagen I (a.) und Fibronectin (b.). Maximale Absorption wird nach 24h Hypoxie (1% O₂) gemessen. Der prozentuale Adhäsionszuwachs durch Hypoxieinkubation wird dagegen durch die Hypoxiedauer nicht beeinflusst. * = p<0,05, ** = p< 0,001 gegenüber Normoxie.

3.3.1.2 Adhäsionsanalysen nach unterschiedlicher Adhäsionsdauer

Die Adhäsion der durch das Ablösen von der Kulturschale nun kugelförmigen rVSMC auf der 96 -Feld-Multititer-Platte erfolgt in mehreren Schritten und ist nach einiger Zeit abgeschlossen. Da die Anzahl der Zellen in einer Versuchsschale begrenzt ist, sind nach einer genügend langen Adhäsionszeit alle Zellen adhären. Der Adhäsionsprozess wurde im folgenden Experiment nach unterschiedlichen Zeiträumen (15 min, 30 min, 60 min, 180 min) beendet. Hierbei zeigte sich, dass die maximal erreichbare Adhäsion nach 180 Minuten Adhäsionsdauer durch Hypoxie nicht beeinflusst wird. Zellen, die der Hypoxie ausgesetzt wurden, reagieren jedoch schneller, so dass nach kurzer Adhäsionszeit ein größerer Unterschied zu erkennen ist, der mit zunehmender Adhäsionsdauer abnimmt.

Auf Kollagen Typ I ist in der Anfangsphase eine starke Zunahme der Adhäsion zu beobachten (Abb. 18a). So erreichen die hypoxischen Zellen nach nur 15 min eine Absorption von 0,161 ($\pm 0,019$, p=0,008) während dieser Wert für die normoxische Gruppe zu diesem Zeitpunkt erst 0,087 ($\pm 0,017$) beträgt. Nach 30 min ist bereits kein signifikanter Unterschied mehr zu sehen (Hypoxie=0,225 ($\pm 0,007$), Normoxie= 0,215 ($\pm 0,012$), p= 0,3). Die absoluten Werte der Absorption steigen nach 60 und 180 Minuten noch etwas an (Hypoxie: 0,279 ($\pm 0,014$) und 0,301 ($\pm 0,011$), Normoxie: 0,271 ($\pm 0,024$) und 0,295 ($\pm 0,010$)), auch hier sind die Differenzen jedoch nicht signifikant (p= 0,1). Humane glatte Muskelzellen adhären generell langsamer als rVSMC, Hypoxie erzeugt hierbei aber dennoch den gleichen Effekt: Es resultiert daher für humane Zellen dieselbe Verlaufskurve, die jedoch aufgrund des langsameren Adhären-

sionsvorganges etwas nach rechts verschoben ist (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde bei den folgenden Experimenten die Adhäsion humaner glatter Muskelzellen nach 40 min, die von rVSMC nach 15 min beendet.

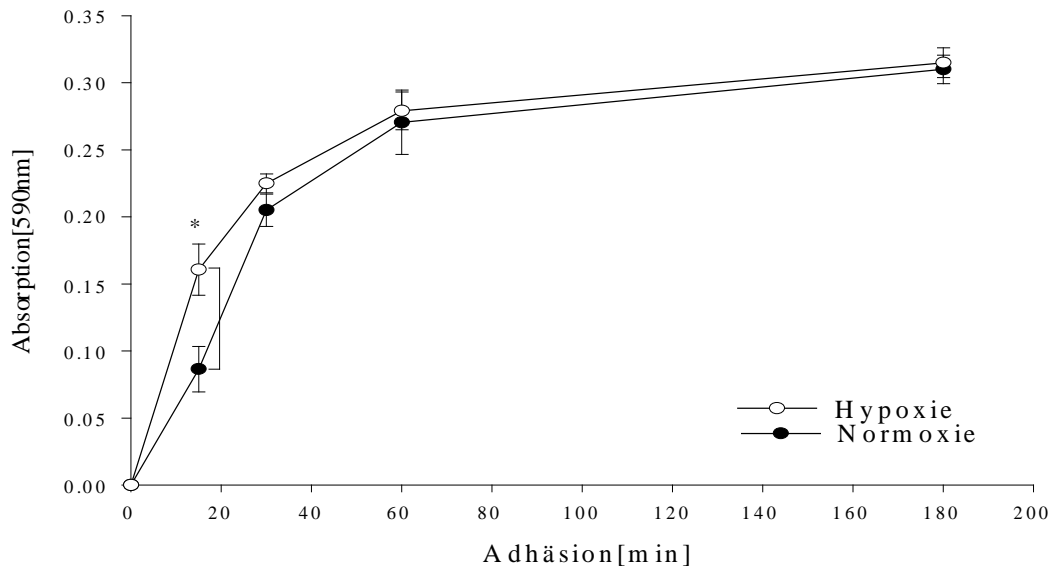


Abbildung 18a: Einfluss der Adhäsionsdauer auf die Adhäsion: Hypoxie führt zu einer Linksverschiebung der Verlaufskurve. * = $p < 0,05$, # = $p > 0,05$ gegenüber Normoxie.

Die Adhäsion auf Fibronectin verläuft demgegenüber langsamer, außerdem ist die Zunahme der Adhäsion hier kontinuierlich, der Adhäsionsverlauf beschreibt nahezu eine Gerade (Abb. 17b).

Nach 15 min ist erst ein kleiner Anteil der Zellen adhären, bereits zu diesem Zeitpunkt erreichen die hypoxischen Zellen eine höhere Absorption als die Kontrollgruppe ($0,054 (\pm 0,005)$ vs. $0,031 (\pm 0,002)$, $p = 0,03$). Nach 60 min beträgt die Adhäsion für die Hypoxie-behandelten Zellen $0,089 (\pm 0,005)$ gegenüber $0,066 (\pm 0,006)$, $p = 0,04$. Nach 180 Minuten ist dann kein signifikanter Unterschied mehr nachzuweisen. Die Werte sind nun $0,174 (\pm 0,014)$ für die Hypoxie und $0,169 (\pm 0,011)$ für die Kontrollgruppe.

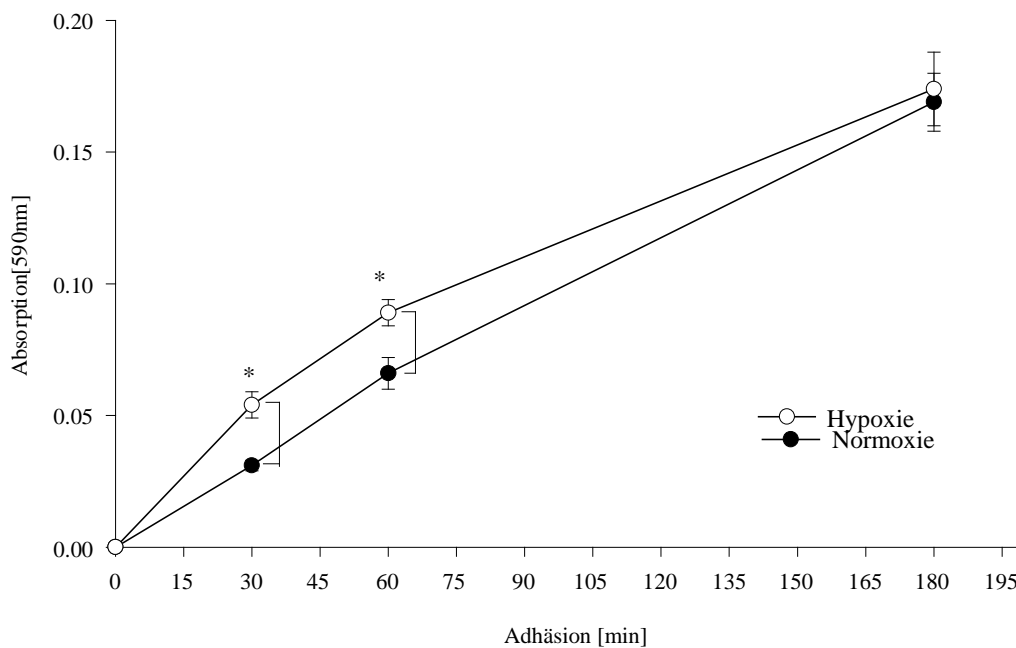


Abbildung 18b: Einfluss der Adhäsionsdauer auf die Adhäsion auf Fibronectin {20 μ g/ml}. Im Vergleich zu Kollagen I ist das Adhäsionsverhalten der rVSMC verlangsamt, was zu flacheren Verlaufskurven führt. * = $p < 0,05$ gegenüber Normoxie

3.3.1.3 Adhäsion auf unterschiedlichen extrazellulären Matrixkonzentrationen

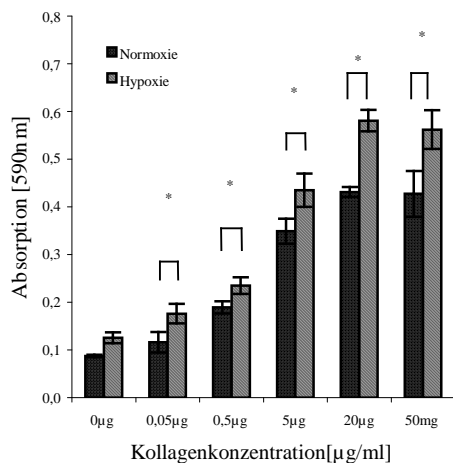
Da Integrine die Verbindung zwischen der Zelle und dem Extrazellulärraum herstellen, war die Frage von Interesse, ob die Konzentration der extrazellulären Proteine Kollagen Typ I und Fibronectin einen Einfluss auf die Größe des durch Hypoxie induzierten Adhäsionszuwachses besitzt.

Hypoxie erhöhte die Adhäsion der rVSMC auf allen untersuchten Kollagenkonzentrationen (Abbildung 19a). Dieser Einfluss wurde bei 0,05 , 0,5 , 5 , 20 und 50 μ g/ml Kollagen Typ I untersucht. Im Bereich unter 5 μ g Kollagen/ml ist ein flacher Verlauf der Adhäsionskurve zu erkennen. Bei Erhöhung der Kollagenkonzentration auf 5 μ g/ml kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Absorption beider Gruppen (Kontrollgruppe: $0,349 \pm 0,026$, Hypoxie: $0,435, \pm 0,035$, $p = 0,003$) . Das Maximum der Absorption wird bei 20 μ g/ml erreicht ($0,581 \pm$

0,020 gegenüber $0,431 \pm 0,026$ der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Bei weiterer Erhöhung der Kollagenkonzentration kommt es zu einer leichten Abnahme der Absorption.

Im unteren Bereich der untersuchten Fibronektinkonzentrationen wird die Adhäsion durch den Anstieg der Konzentration nur geringfügig verändert (Abb. 19b). Bei $0,05 \mu\text{g/ml}$ Fibronektin beträgt die Absorption der normoxischen Kontrollgruppe lediglich $0,04 (\pm 0,01)$ auf $0,048 (\pm 0,008)$ zur Folge. Hypoxische Zellen erreichen hier $0,060 (\pm 0,008, p < 0,05)$. Bei weiterem Anstieg der Fibronektinkonzentration führt eine leichte Zunahme an Fibronektin zu einer großen Steigerung der Adhäsion: bei $20 \mu\text{g/ml}$ führt dies zu einem Maximum der normoxischen Zellen von $0,203 (\pm 0,020)$ hypoxische Zellen erreichen hier $0,281 (\pm 0,012, p = 0,002)$. Ein weiterer Anstieg der Fibronektinkonzentration hat keinen weiteren Absorptionsanstieg zur Folge.

a.



b.

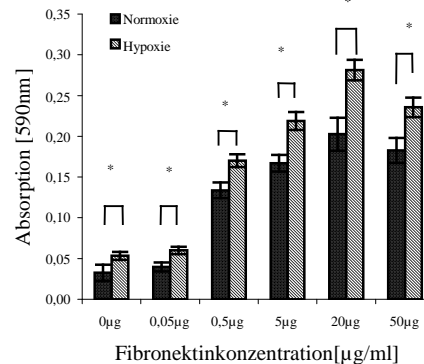


Abbildung 19a: Adhäsion auf ansteigenden Kollagen(I)-Konzentrationen. Hypoxie führt zu gesteigerter Adhäsion bei allen getesteten Konzentrationen. *= $p < 0,05$ gegenüber Normoxie.
 b: Einfluss der Fibronektinkonzentration auf die Adhäsion hypoxischer rVSMC im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe. Wie schon auf Kollagen I ist auch auf Fibronektin maximale Absorption bei $20 \mu\text{g/ml}$ Fibronektin zu erkennen. * = $p < 0,05$ gegenüber Normoxie.

3.3.1.4 Einfluss der Reoxygenierung

Es wurde berichtet, dass Hypoxie-induzierte Wirkungen verschwanden, wenn man die verwendeten Zellen ausreichend lange einer Reoxygenisierung aussetzte^{106 107}. Um festzustellen, ob dieser Effekt auch bei der Adhäsion glatter Muskelzellen zu beobachten sei, wurde nach der Hypoxiebehandlung (1 % O₂) der Zellen zu drei verschiedenen Zeitpunkten das gleiche Experiment wiederholt. Dies geschah a) unmittelbar nach Ende der Hypoxie, b) 4 h nach Ende der Hypoxieeinwirkung, c) nach einer Reoxygenierung (20% O₂) von 24h. Wie Abbildung 20a zeigt, ist unmittelbar nach Ende der Hypoxie auf Kollagen Typ I die eine Zunahme der Adhäsion zu sehen, diesmal auf 134% der Kontrollgruppe ($\pm 5\%$, $p=0,003$). Diese Steigerung der Adhäsion wird durch eine vierstündige Reoxygenierung nicht wesentlich verändert, nach wie vor liegt die Adhäsion hypoxischer Zellen um 136% höher als die der normoxischen Kontrollgruppe ($\pm 3\%$, $p= 0,0003$). Nach insgesamt 24 h Reoxygenierung ist dieser Unterschied zwischen hypoxischen und normoxischen Zellen nahezu verschwunden, die hypoxischen Zellen erreichen 104% der Kontrollgruppe ($p=0,07$).

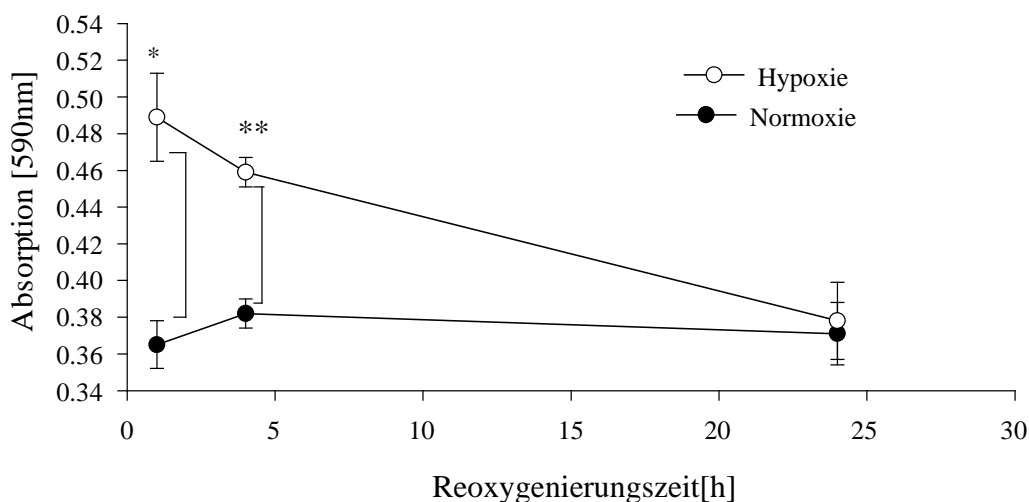


Abbildung 20a: Verschwinden des hypoxisch induzierten Anstieg der Adhäsion von rVSMC auf Kollagen I{20 μ g/ml} bei Normalisierung des Sauerstoffhaushalts. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$ gegenüber Normoxie

Dasselbe Geschehen ist auch auf Fibronectin zu beobachten (Abb. 20b): Der anfängliche Adhäsionsanstieg durch Hypoxie von 141% ($\pm 5\%$, $p=0,001$) schwächt sich bereits nach vier Stunden Reperfusion auf 120% ($\pm 5\%$, $p=0,003$) ab, um dann nach 24h völlig zu verschwinden (105% der Kontrollgruppe, $p=0,06$).

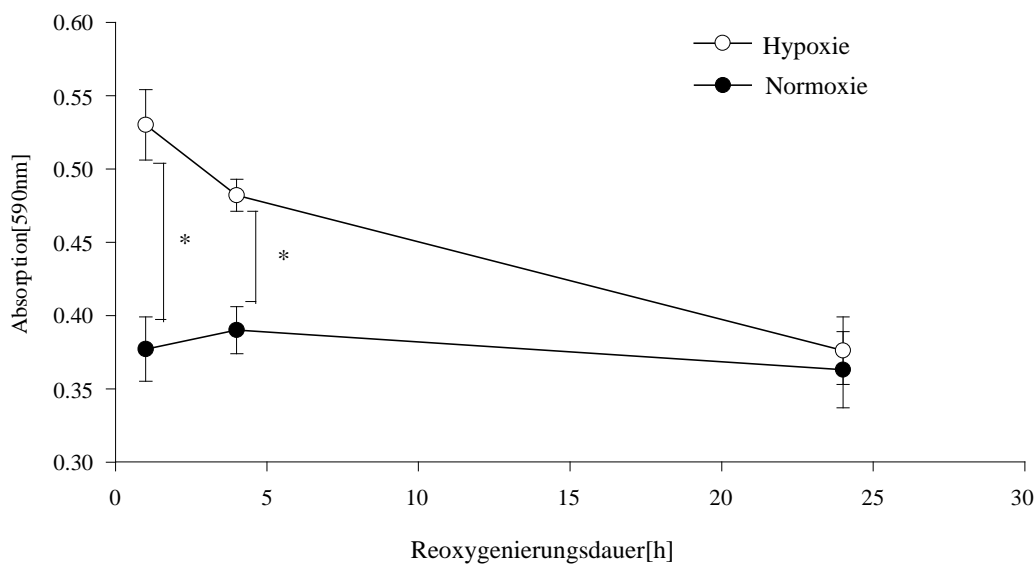


Abbildung 20b: Verschwinden des durch Hypoxie induzierten Adhäsionsanstieg auf Fibronectin {20 μ g/ml} nach 24 h Reoxygenierung (20% O₂). * = $p<0,05$ vs Normoxie.

3.3.2 Hypoxie beeinflusst das Spreading glatter Muskelzellen

Hypoxie steigerte das Spreading auf Kollagen Typ I (wie schon für DFO gezeigt) in zeitabhängiger Weise. Die Verlaufskurve (Abb. 21) gleicht der für DFO (Abb. 5):

Nach 15 min Spreading auf Kollagen Typ I sind 81% ($\pm 6\%$, $p=0,0001$) der hypoxischen Zellen ausgebreitet, wogegen dies bei den normoxischen Zellen nur zu 52% ($\pm 5\%$) der Fall ist. Prozentual erreicht die Hypoxie somit 152% der Kontrollgruppe. Nach 30 min sind mit 95% ($\pm 3\%$, $p=0,02$) nahezu alle hypoxischen Zellen ausgebreitet, dies gilt zu diesem Zeitpunkt

auch bereits für 85% ($\pm 5\%$) der normoxischen Zellen. Nach 60 min erreichen dann beide Gruppen einen Anteil ausgebreiteter Zellen von 98% ($\pm 2\%$, $p=0,48$).

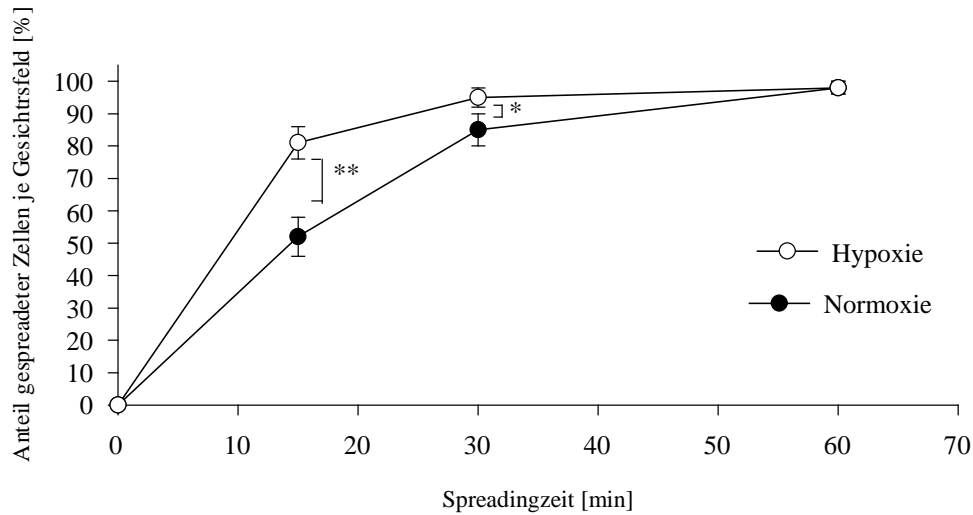


Abbildung 21a: Verlauf des Spreadings auf Kollagen I {20 μ g/ml} bei unterschiedlich langer Spreadingzeit. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$ verglichen mit Normoxie.

Auch auf Fibronektin ähnelt der Hypoxie induzierte Effekt dem von DFO (siehe Abb. 5b). Zu Beginn (15 min) sind etwa die Hälfte der hypoxischen Zellen gespreadet (52% ($\pm 2,4\%$) vs. 31% ($\pm 2,2\%$) für Normoxie, $p=0,002$), Nach 30 min kann man etwa drei Viertel der Zellen im ausgebreiteten Zustand sehen (76 \pm 5%, $p=0,004$), wogegen dies bei der Kontrollgruppe erst für 48% ($\pm 4\%$) zutrifft. Schließlich ist nach 60 Minuten der überwiegende Anteil der Zellen gespreadet (Hypoxie: 94% \pm 4%, Normoxie: 87%, ± 3 , $p=0,48$).

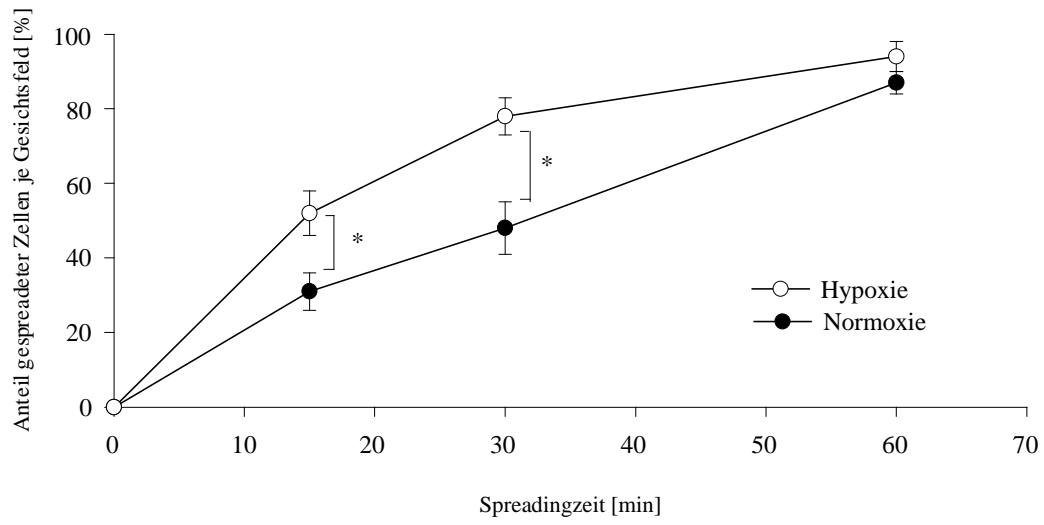


Abbildung 21b: Spreadingverlauf auf Fibronektin {20 μ g/ml} zu unterschiedlichen Spreadingzeiten. * = $p < 0,05$ vs. Normoxie.

3.3.3 Hypoxie stimuliert die Migration von rVSMC

3.3.3.1 Migrationsverlauf glatter Muskelzellen auf Kollagen Typ I

Ein Absinken des Sauerstoffgehaltes führt zu einer forcierten Migration glatter Muskelzellen (Abb. 22). Die Migration wurde in drei gleichen Ansätzen nach 1h, 2h und 6 h beendet und die Auszählung der Zellen vorgenommen.

Bereits nach 1 h bewirkt Hypoxie eine Steigerung der Adhäsion (19 ± 4 migrierte Zellen gegenüber 12 für die Kontrollgruppe, $p=0,001$). Auch 60 min später ist ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Gruppen zu sehen. Hier migrieren 23 hypoxische Zellen, jedoch nur 14 normoxische ($p=0,01$). Nach 6 h ist die größte Anzahl migrierter Zellen zu verzeichnen, prozentual nimmt der Größenzuwachs durch Hypoxie aber etwas ab: 41 ± 4 migrierte Zellen in der Hypoxie-Gruppe verglichen mit 32 ± 4 für die Kontrollgruppe, $p < 0,003$.

Die Migration auf Fibronektin verhielt sich ähnlich wie auf Kollagen Typ I. Nach 24h Hypoxie und 4h Migrationszeit migrierten die hypoxischen Zellen auf Fibronektin um 65% ($\pm 19\%$, $p=0,005$) besser als die normoxischen (Daten nicht gezeigt).

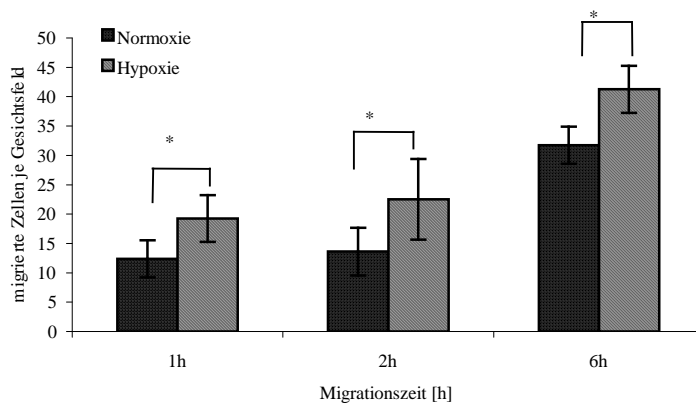


Abbildung 22: Migrationsverlauf auf Kollagen {20 μ g/ml} in Abhängigkeit der Migrationsdauer. * = $p < 0,05$ gegenüber der normoxischen Kontrolle.

3.3.4 Abhängigkeit von Integrinen

3.3.4.1 Adhäsion auf Fibronektin und Kollagen I wird durch β_1 -Integrine vermittelt

Um den Einfluss von Integrinen auf die durch Hypoxie stimulierten Zellfunktionen zu untersuchen, wurde ein inhibierender, gegen β_1 -Integrin gerichteter Antikörper verwendet (Clon P5D2). Aufgrund der Spezifität des Antikörpers wurden diese Experimente mit HUVMSCs durchgeführt. P5D2 reduzierte die Adhäsion normoxischer Zellen auf Kollagen Typ I um 35,2 %, während die Adhäsion hypoxischer Zellen in Anwesenheit des Antikörpers um 28,5 % abnahm. Die Vorbehandlung beider Zellgruppen mit einem unspezifischen IgG- Antikörper veränderte die Adhäsion dagegen nicht (Abb. 23a). Auf Fibronektin ließ sich ein gleichgerichtetes Verhalten erkennen: Inkubation mit dem gegen β_1 -Integrin gerichteten Antikörper P5D2 inhibierte die Adhäsion normoxischer (Reduktion um 63,3% gegen unbehandelte Normoxie, $p < 0,05$) und hypoxischer Zellen (69,2 % gegenüber un behandelter Hypoxie, $p < 0,05$), während der unspezifische IgG-Antikörper die Adhäsion nicht signifikant inhibierte (Abb 23b).

a.

b.

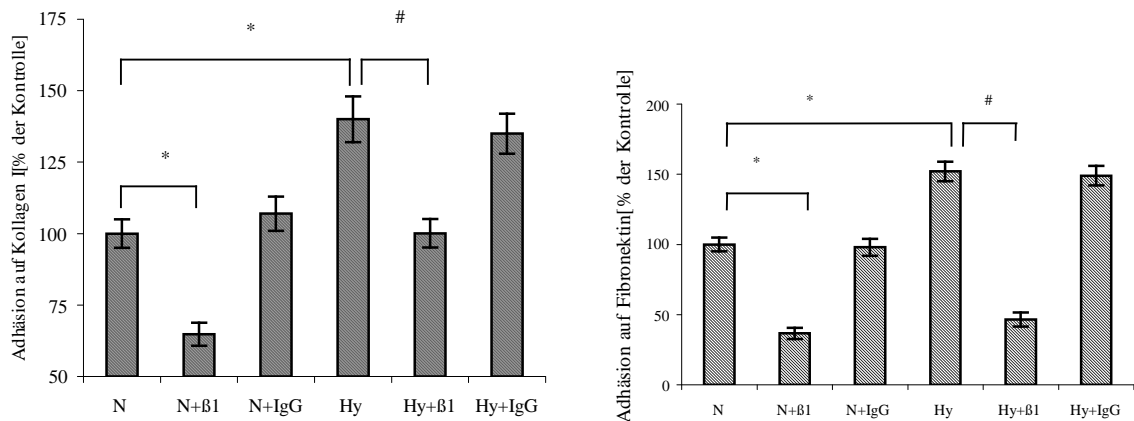


Abb. 23: Adhäsion normoxischer (N) und hypoxischer (H) huVSMC auf Kollagen I (a.) und Fibronektin (b.) in Gegenwart des gegen β_1 -Integrin gerichteten Clons P5D2 (β_1) und eines unspezifischen IgG-Antikörpers. * = $p < 0,05$ verglichen mit Normoxie. # = $p < 0,05$ gegen Hypoxie.

3.3.4.2 Spreading auf Kollagen I ist β_1 -Integrin vermittelt

Der spezifische β_1 -Antikörper P5D2 inhibierte das Spreading hypoxisch vorbehandelter humaner VSMC auf Kollagen I um 32.18% ($p < 0,0001$ gegenüber nicht inhibierter Hypoxie). Mit diesem Antikörper vorinkubierte Zellen erreichten eine Spreadingrate von 86% der unbehandelten Kontrollgruppe ($p < 0,05$ gegenüber Normoxie). P5D2 inhibierte auch das Spreading der normoxischen Kontrollgruppe um 22% ($p < 0,05$ vs. Normoxie). Dagegen vermochten der gegen β_3 -Integrin gerichtete Clon C7E3 und ein unspezifischer IgG-Antikörper weder das Spreadingverhalten der Kontrollgruppe noch der hypoxisch behandelten hu-VSMC signifikant zu beeinflussen (Abb. 24).

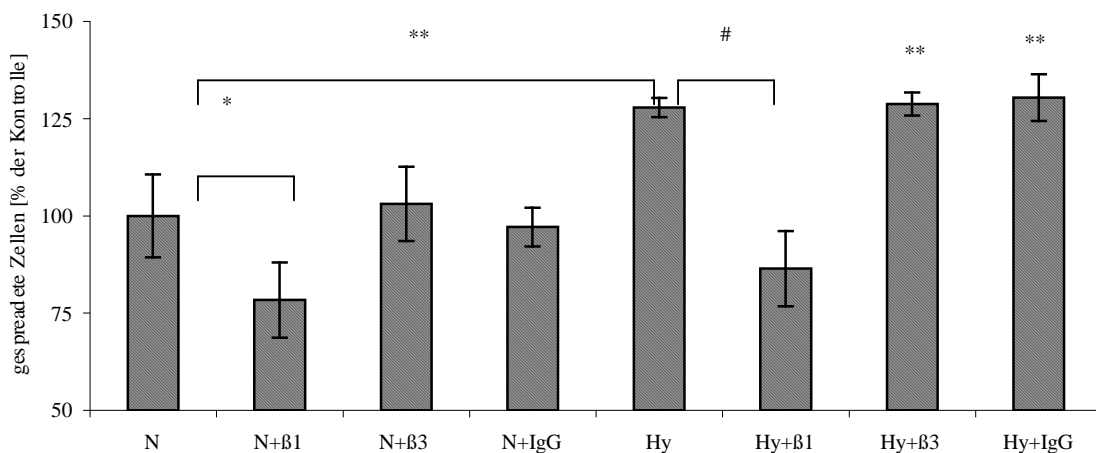


Abb. 24: Durch selektive Blockierung des β_1 -Integrins mittels P5D2 bewirkte eine signifikante Inhibierung des Spreadings der hypoxischen und normoxischen Zellen auf Kollagen I. Der gegen β_3 -Integrin gerichtete Antikörper C7E3 vermochte dagegen keine der beiden Gruppen in ihrem Spreadingverhalten zu beeinflussen. Auch die Vorinkubation mit einem unspezifischen IgG-Antikörper hatte keine Auswirkungen auf das Spreading. *= $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$ jeweils gegenüber Normoxie (N). # = $p < 0,001$ gegen Hypoxie (Hy).

3.3.5 Unveränderte Integrinexpression nach Hypoxieexposition

Die Adhäsion glatter Muskelzellen ist, wie gerade gezeigt werden konnte, teilweise durch β_1 -Integrin vermittelt. Um die Frage zu klären, ob die zu beobachtende Zunahme der Adhäsion nach Hypoxieeinwirkung durch eine vermehrte Expression von Integrinen in der Zellmembran hervorgerufen wird, wurde nach 24h Hypoxie eine Durchflusszytometrie mit humanen VSMC durchgeführt. Hierbei zeigten sich gegenüber den Kontrollgruppen keine signifikanten Änderungen der Anzahl der α_1 -, α_2 -, α_5 -, β_1 - und β_3 - Integrine (Abb. 25 a). Auch bei rVSMC war keine Veränderung der Integrinzahl festzustellen (Daten nicht gezeigt). Auf mRNA-Ebene war in der RT-PCR nach 6, 12 und 24h Hypoxie ebenfalls kein Anstieg der Protein-Mengen von β_1 und β_3 zu erkennen (Abb.25 b).

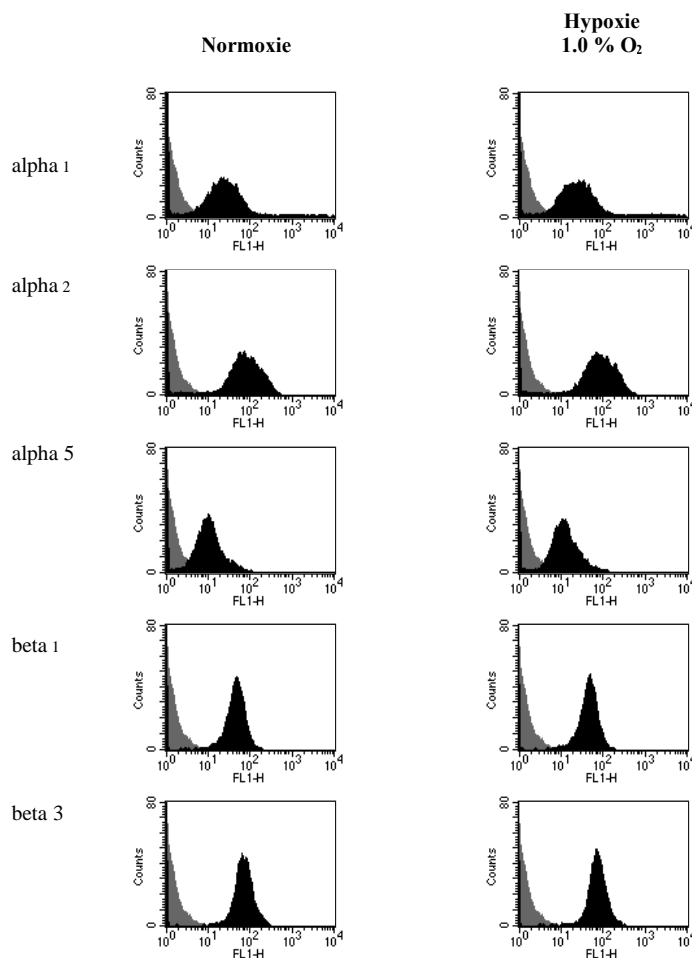


Abb. 25a: In der Durchflusszytometrie mit humanen VSMC wurde keine Erhöhung der Integrinanzahl durch Hypoxiebehandlung beobachtet. Die X-Achse entspricht einer logarithmischen Darstellung der Fluoreszenzintensität. Die Y-Achse zeigt die Zellanzahl. Die Zellen wurden mit spezifischen Integrinantikörpern (schwarz) bzw. unspezifischem IgG (grau) behandelt.

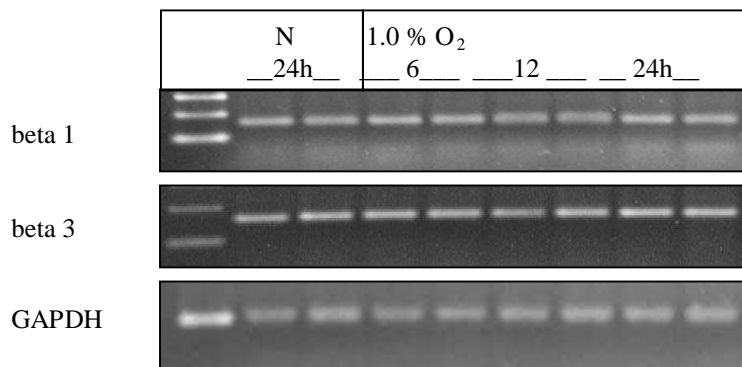


Abb. 25b: In der RT-PCR konnten nach 6-,12- und 24stündiger Hypoxiebehandlung keine Veränderungen der Transkriptionsaktivität auf mRNA-Ebene gesehen werden. GAPDH wurde als ubiquitär vorhandenes, im Allgemeinen nichtreguliertes Gen als Standard für das RNA-Loading verwendet.

3.3.6 Hypoxie induziert die Aktivierung des β_1 -Integrins

Da bei gesteigerten β_1 -Integrin abhängigen Zellfunktionen keine quantitative Änderung des β_1 -Integrins gezeigt werden konnte, wurde zur weiteren Klärung die Oberflächenexpression eines aktivierungsabhängigen Epitops der β_1 -Untereinheit (9EG7) mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Lage des durch den monoklonalen Antikörper 9EG7 erkannten Epitops ist konformationsabhängig. In der aktivierten β_1 -Integrinkette wird das Epitop exponiert

Verglichen mit der unstimulierten Kontrollgruppe wiesen hypoxische humane VSMC in der Durchflusszytometrie eine gesteigerte Bindung von 9EG7 auf (Abb. 26)

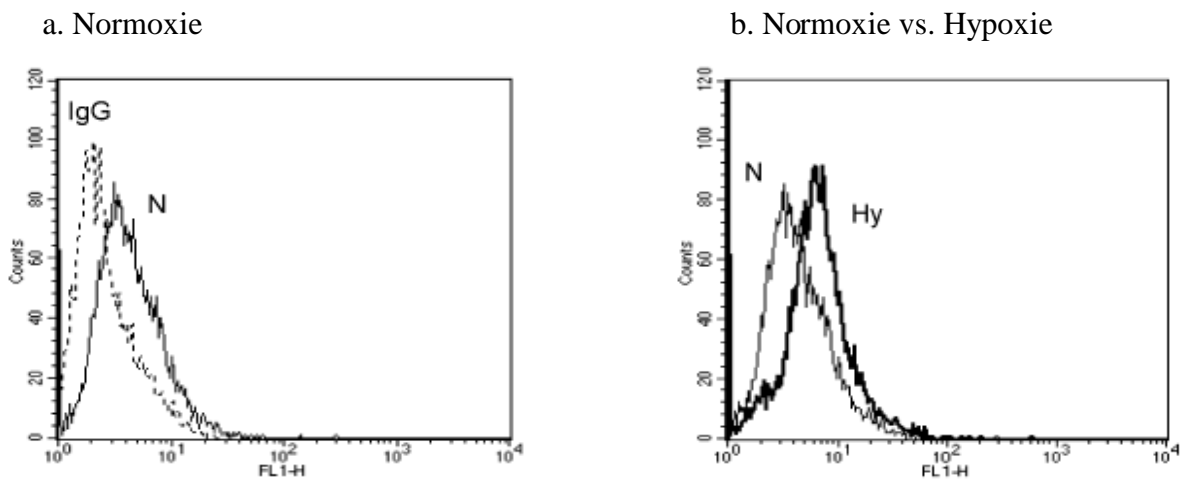


Abb. 26: Hypoxie induziert die Aktivierung des β_1 -Integrins. Die Expression eines aktivierungsabhängigen Epitops der β_1 -Untereinheit auf der Oberfläche von humanen VSMCs wurde durch Durchflusszytometrie untersucht. a.: Normoxische Zellen wurden mit unspezifischem IgG (Ratte, gepunktete Linie) oder mit spezifischem β_1 -Integrin-AK (clone 9EG7) inkubiert. b.: Hypoxisch (Hy, dicke Linie) und normoxisch (N, dünne Linie) vorbehandelte VSMC wurden mit dem β_1 -Integrin-AK 9EG7 inkubiert. Die Bindung des Antikörpers an hypoxischen Zellen ist gegenüber Normoxie gesteigert.

3.4 Signaltransduktion der hypoxischen Effekte

3.4.1 Rolle der MAP-Kinase

3.4.1.1 Beteiligung von ERK 1/2 und p38

Die Adhäsion glatter Muskelzellen der Ratte auf Kollagen I wurde durch Hypoxie (24h) gesteigert (30,2% ($\pm 4\%$), $p < 0,01$ gegenüber der Kontrollgruppe). Dieser Zuwachs der Adhäsion ließ sich durch vorherige Behandlung der Zellen mit dem ERK 1/2-Inhibitor PD 98059 (30 μ M) vollständig verhindern. Das gelang auch mit dem Hemmstoff der p38- MAP-Kinase SB 203580 (1 μ M). Dagegen wurde die Adhäsion normoxischer Zellen durch diese Inhibitoren nicht verändert (Abb. 27). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der durch Hypoxie bewirkte Adhäsionsanstieg über diese beiden Wege der MAP-Kinase-Kaskade vermittelt wird.

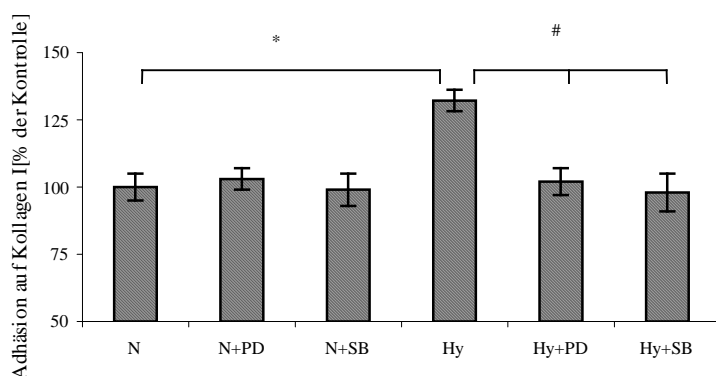


Abb. 27: In Gegenwart der Inhibitoren PD98059 (30 μ M) und SB 203580 (1 μ M) wird die hypoxieinduzierte Adhäsionssteigerung von rVSMC auf Kollagen I verhindert. Die Adhäsion normoxischer Zellen wird nicht signifikant inhibiert. * $p < 0,01$ gegenüber Normoxie (N), # $p < 0,05$ gegenüber Hypoxie (Hy).

Auch der durch Hypoxie bewirkte Anstieg des Spreadings auf Kollagen I (197 \pm 18%, $p < 0,001$) wird in Gegenwart der Inhibitoren signifikant beeinflusst. PD 98059 bewirkt hier eine Reduktion des Spreadings auf 128% der Kontrollgruppe ($p < 0,05$ gegenüber Normoxie, $p < 0,0001$ gegenüber Hypoxie). Auch mit SB 203580 vorbehandelte hypoxische Zellen zeigen eine signifikante Verringerung des Spreadings auf 137% ($\pm 19\%$), die Steigerung ist jedoch auch gegenüber der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,001$ vs. Hypoxie, $p < 0,05$ vs. Normoxie). Normoxische Zellen wurden durch die Anwesenheit der Inhibitoren in ihrem Spreadingverhalten nicht beeinflusst (Abb.28).

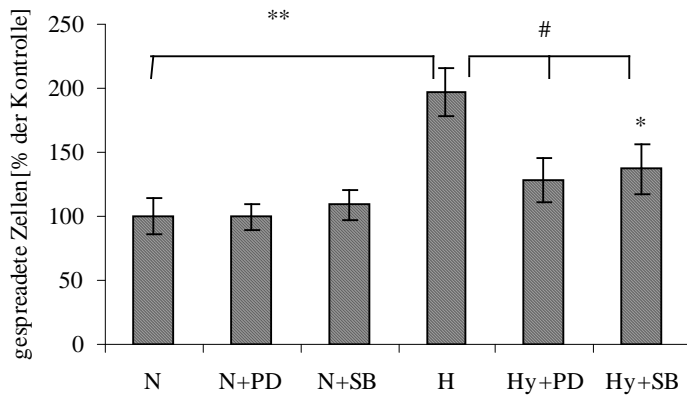


Abb 28: Unter Einfluss der Inhibitoren PD98059 und SB203580 tritt eine hochsignifikante Inhibition der hypoxisch bedingten Steigerung des Spreadings von rVSMC auf Kollagen I ein. * = $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ jeweils gegenüber Normoxie (N), # = $p < 0,001$ verglichen mit Hypoxie (Hy).

Der hypoxieinduzierte Migrationsanstieg auf Kollagen I (131 ± 6 % der Kontrolle, $p = 0,003$ vs. Kontrollgruppe) trat in Anwesenheit von PD 98059 nicht ein (91 ± 7 %, $p < 0,001$ vs. Hypoxie). Auch SB 203580 bewirkte einen signifikanten Rückgang der Migration auf 111% der Kontrollgruppe (± 6 %, $p < 0,05$ vs. Hypoxie). Die Ergebnisse sind in Abb. 29 dargestellt.

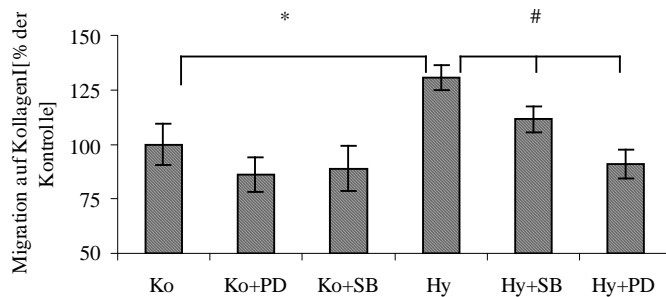


Abb. 29: PD 98059 und SB 203580 verhindern den hypoxieinduzierten Migrationsanstieg auf Kollagen I. * = $p < 0,05$ vs. Normoxie, # = $p < 0,05$ vs. Hypoxie.

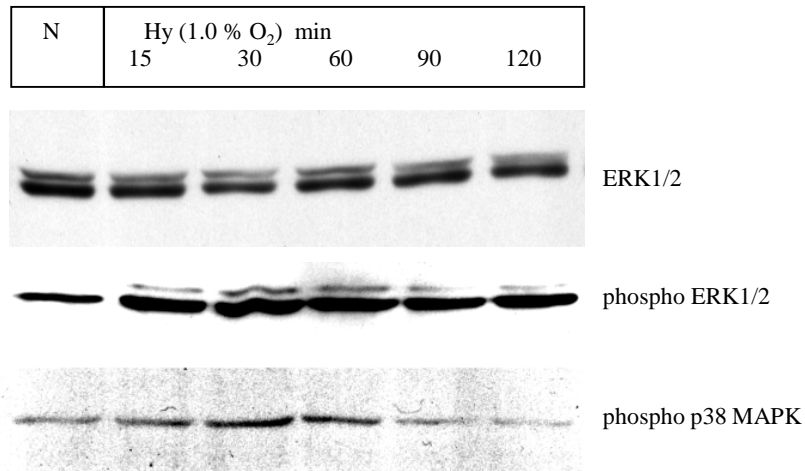
3.4.1.2 Hypoxie bewirkt die Aktivierung der ERK 1/2- und p38- MAPK in VSMC

Um ein genaueres Bild der während der Hypoxie in der MAP-Kinase stattfindenden Ereignisse zu erhalten, wurde die Aktivierung der ERK 1/2 und p38 MAPK in humanen glatten Muskelzellen untersucht. Nach 24 stündiger Hypoxiedauer wurde die aktivierte, phosphorylierte ERK 1/2 mittels eines phosphospezifischen ERK 1/2-MAPK-Antikörper durch Immunoblotting untersucht.

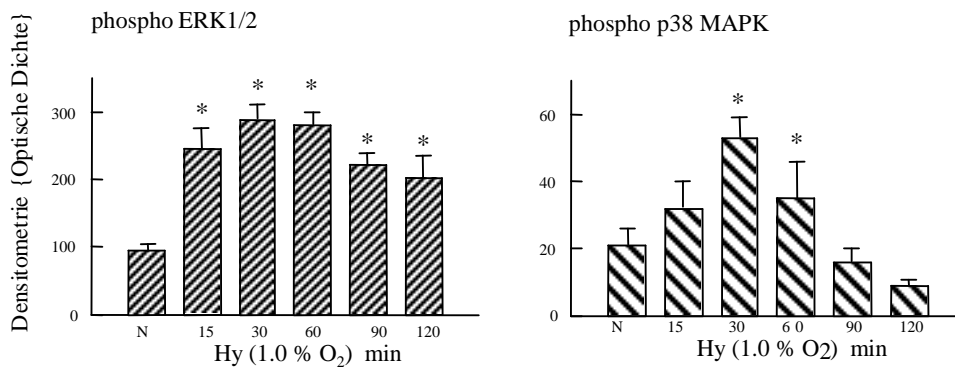
Hypoxie induzierte eine schnelle Aktivierung der ERK 1/2, die nach 30 min mit einer dreifachen Erhöhung ein Maximum erreichte ($p < 0,05$ vs. unstimulierte Zellen) (Abb. 30 a und 30 b). Die Phosphorylierung der ERK 1/2 blieb auch 2h nach Hypoxieende erhöht (2,5 -fach gegenüber unstimulierten Zellen). Diese durch die Hypoxie vermittelte Phosphorylierung konnte durch die Anwesenheit des ERK 1/2-Inhibitors PD 98059 (30 μ M) vollständig verhindert werden (Abb. 27 c). Der p38- Inhibitor SB 203580 (1 μ M) hatte dagegen keinen Effekt auf die Hypoxie- induzierte ERK 1/2- Aktivierung (Abb. 30 c). Die Gesamtmenge an ERK 1/2 wurde durch Hypoxie nicht verändert (Abb 30).

Die Phosphorylierung der p38- MAP-Kinase wurde durch einen phosphospezifischen p38 MAPK-Antikörper untersucht. Hypoxie bewirkte eine schnelle und vorübergehende Aktivierung der p38 MAPK, die nach 30 min mit einer 2,5-fachen Steigerung ein Maximum erreichte und nach 90 min zu den Ausgangswerten zurückkehrte (Abb. 30a und b). Der Einsatz von SB 203580 in den hypoxischen Zellen verhinderte diese Hypoxie- vermittelte Phosphorylierung (Abb. 30 c).

a.



b.



c.

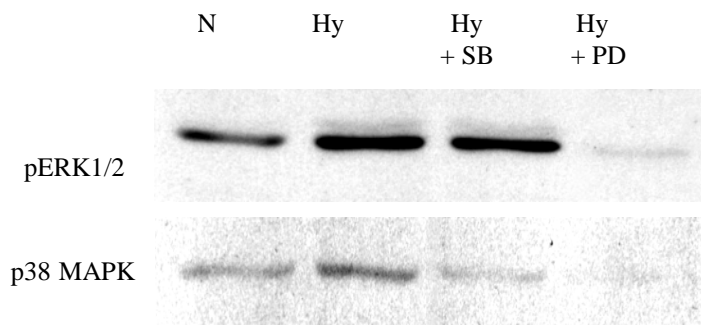


Abb. 30: a. Im hier dargestellten Immunoblot ist eine durch Hypoxie induzierte Stimulierung der Phosphorylierung von ERK 1/2 und p38 MAPK mit einem Maximum nach 30 min Hypoxie zu erkennen. Die Gesamtmenge an ERK 1/2 wird hingegen nicht beeinflusst.

b. Densitometrie der phosphorylierten Kinasen ERK 1/2 und p38 MAPK nach Hypoxieexposition (Hy). * = $p < 0,05$ gegenüber Normoxie (N).

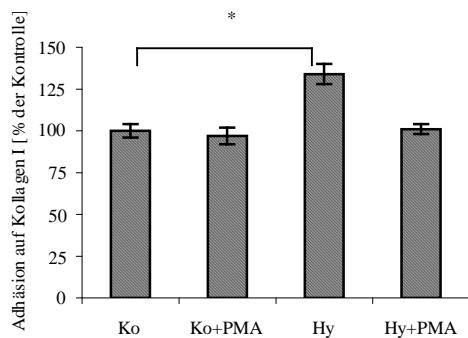
c. Die durch Hypoxie-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung wurde durch PD98059 {PD} geblockt. Die Aktivierung von p38 wurde durch PD 98059 {50 μ M} und SB 203590 {SB, 1 μ M} vollständig verhindert. $P < 0,05$ gegenüber Normoxie.

3.4.2 Beteiligung der Proteinkinase C

3.4.2.1 Die Blockade der Proteinkinase C verhindert den hypoxieinduzierten Adhäsionsanstieg

24stündige Vorinkubation mit dem Proteinkinase C-Inhibitor PMA (1µg/ml) verhinderte den unter Hypoxieeinwirkung (1% O₂ während 24h) eingetretenen Adhäsionsanstieg auf 134 ± 6 % (Kollagen I) bzw. 145 ± 7% der Kontrollgruppe auf Fibronectin (p<0,05). Die Adhäsion der normoxischen Kontrollgruppe wurde durch die Anwesenheit des Inhibitors nicht signifikant verändert (Abb 31).

a.



b.

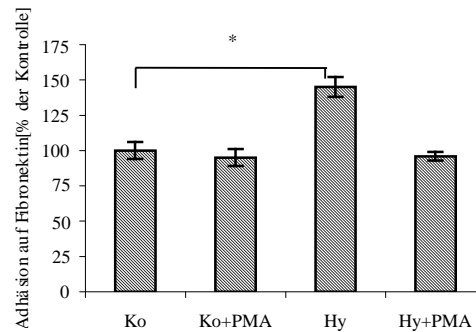


Abb 31. PMA verhindert den hypoxieinduzierten Adhäsionsanstieg auf Kollagen I (a.) und Fibronectin (b.). Die Adhäsion der normoxischen Kontrollgruppe wird nicht signifikant beeinträchtigt. *=p<0,05 gegenüber Normoxie

3.4.2.2 Der Anstieg von Spreading und Migration tritt unter Blockierung der PKC nicht ein

Das Spreading von rVSMC auf Kollagen I wurde durch Hypoxie auf 163% der normoxischen Kontrollgruppe gesteigert ($\pm 7\%$, $p < 0,001$). Diese Steigerung konnte unter Einfluss von PMA (24stündige Vorinkubation) verhindert werden (110% der Kontrollgruppe, $p = 0,2$). Das Spreading der normoxischen Zellen wurde durch PMA nicht signifikant beeinträchtigt ($94\% \pm 12\%$). Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abb. 32 dargestellt.

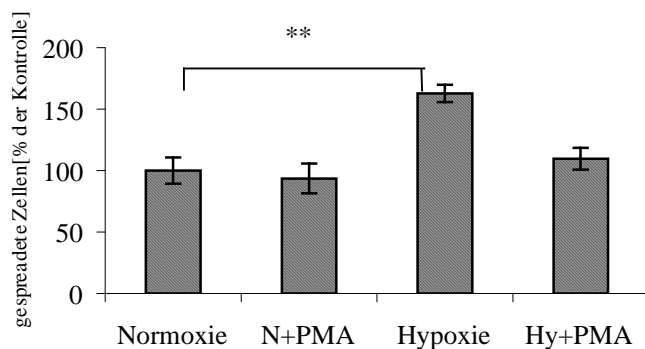


Abb. 32: Der hypoxische Effekt auf das Spreading von rVSMC auf Kollagen I tritt unter Einfluss des PKC-Inhibitors PMA nicht ein. Das Spreading der Kontrollgruppe wird durch PMA nicht signifikant beeinflusst. ** $P < 0,001$ gegenüber Normoxie.

Auch die hypoxische bewirkte Steigerung der Migration von rVSMC auf Kollagen I wird in Anwesenheit von PMA signifikant beeinflusst. Hypoxisch behandelte Zellen erreichen hier eine Migrationsrate von 218 % ($\pm 12\%$, $p < 0,0001$ gegen Normoxie) der Kontrollgruppe. Unter Einfluss von PMA schwächt sich dieser Effekt auf 119% ab ($\pm 9\%$, $p < 0,05$). Die Migration der Kontrollgruppe wird durch PMA nicht signifikant beeinflusst (Abb.33).

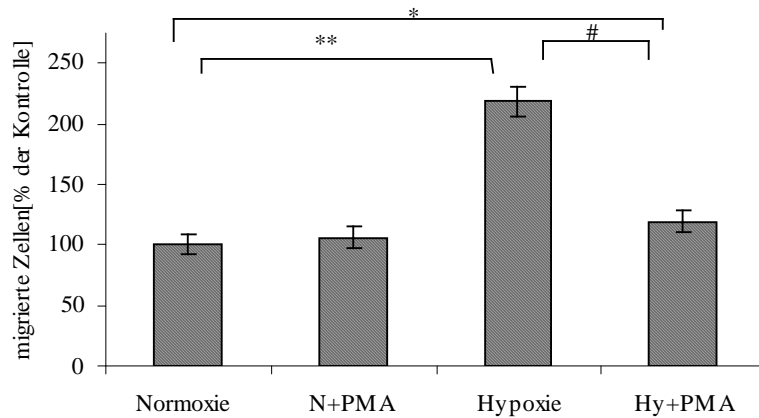


Abb. 33: Unter PMA tritt eine signifikante Abschwächung der Migration hypoxischer Zellen ein. * = $p < 0,05$ gegenüber Normoxie, ** = $p < 0,001$ gegen Normoxie, # $p > 0,001$ gegen Hypoxie.

3.4.2.3 Hypoxie bewirkt eine Aktivierung von PKCε in rVSMC

Um den Einfluss von Hypoxie auf die Expression von PKCε zu untersuchen, wurde mittels Immunoblotting die PKCε-Gesamtmenge nach unterschiedlicher Hypoxiedauer untersucht. Hierbei konnten keine signifikanten Steigerungen der PKCε-Expression gegenüber normoxischen Zellen beobachtet werden. Dagegen führte Hypoxie zu einer gesteigerten Phosphorylierung von PKCε, welche bereits nach 5 h Hypoxie zu beobachten ist (Abb.34).

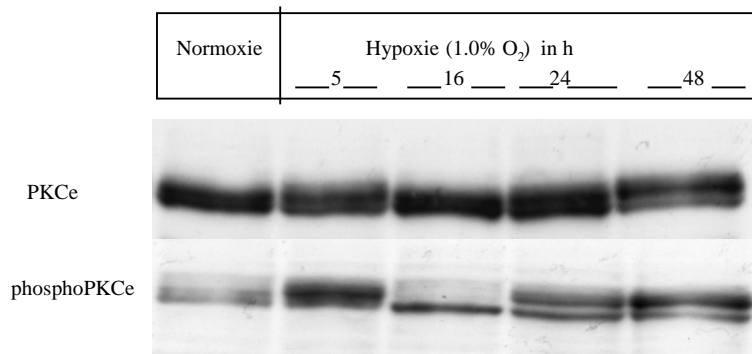


Abb 34: Hypoxie führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung von PKCε in rVSMC. Die Gesamtmenge an PKCε bleibt dagegen unverändert.

4. Diskussion

4.1 Hypoxie und Integrine

Den glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) der Gefäßwände, insbesondere deren Proliferation und Migration in Richtung Intima und Gefäßlumen, wird eine große Bedeutung bei Entstehung und Fortschreiten der Atherosklerose zugeschrieben^{85, 5}. Die Kommunikation der VSMC mit der extrazellulären Umgebung wird vor allem durch eine Gruppe heterodimerer transmembranärer Glykoproteine vermittelt, die sogenannten Integrine. Diese nehmen neben der Signalübermittlung auch eine Verankerungsfunktion wahr und vermitteln als spezifische Rezeptoren für extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen Typ 1 und Fibronectin eine Verbindung mit dem intrazellulären Zytoskelett. Damit tragen sie zu zellulären Funktionen wie Adhäsion, Spreading, Migration und Proliferation bei^{109, 4}. Integrine bestehen aus einer α - und einer β -Einheit. Je nach Kombination der verschiedenen α - und β -Einheiten hat der entstehende Integrin-Rezeptor unterschiedliche Spezifitäten und Funktionen^{1, 44, 7, 110}. In VSMC kommt die Integrin-Untereinheit β_1 in Kombination mit unterschiedlichen α -Untereinheiten am häufigsten vor und ist in hohem Maße an der Adhäsion, der Migration und dem Spreading beteiligt. Damit kommt dem β_1 -Integrin auf molekularer Ebene eine Schlüsselrolle bei pathophysiologischen Vorgängen wie der Einwanderung glatter Muskelzellen in die Intima im Rahmen der Atherosklerose und Restenose zu⁵. Die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen wurde u.a. auch mit lokaler Hypoxie in Verbindung gebracht, da der Verschluss der vasa vasorum im Tiermodell zur Hyperplasie der Intima führt⁸⁷. Eine „anoxämische Theorie der Atheroskleroseentstehung“ wurde erstmalig bereits 1944 von Hueper vorgestellt⁸⁶. Diese Beobachtungen legen eine mögliche Verbindung zwischen Integrinen, ihrer Funktion und Expression und Hypoxie im Rahmen atherosklerotischer Läsionen nahe. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Hypoxie bzw. der Hypoxieimitator Deferoxamine Einfluss auf β_1 -Integrin-abhängige Funktionen glatter Gefäßmuskelzellen hat. Die Verwendung von DFO hat gegenüber Hypoxie den Vorteil, dass Experimente mit dieser Substanz ohne größere technische Erfordernisse durchführbar und in ihrer Wirkung durch äußere Faktoren wie leichte Schwankungen der O_2 -Konzentration nicht zu beeinflussen sind.

Die Inkubation von VSMC mit 50 μ M DFO bzw. Hypoxie (1% O₂ während 24h) führte zu einer zeitabhängigen, signifikanten Zunahme der Adhäsion, Migration und des Spreading auf Kollagen Typ I und Fibronectin (jeweils 20 μ g/ml, Abbildung 1 - 7, 17-19, 22-24). Dieser stimulierende Effekt auf die Adhäsion und das Spreading wurde durch ansteigende Konzentrationen der extrazellulären Matrixproteine Kollagen Typ I und Fibronectin nicht signifikant verändert (Abb 3 und 19). Hypoxie und DFO führten zu einer Beschleunigung dieser Zellfunktionen im Sinne einer Linksverschiebung der zellulären Reaktion von VSMCs in vitro.

Adhäsion und Spreading der VSMC auf Kollagen Typ I und Fibronectin werden vornehmlich durch β_1 -Integrine vermittelt^{1,116, 17, 112}. Die Wirkungen von Hypoxie und die Effekte des Hypoxieimitators DFO waren nahezu identisch, was darauf schließen läßt, dass neben intrazellulären Vorgängen, für die gleiche Wirkungsmechanismen beider Faktoren beschrieben sind⁹⁸, auch Zell-Matrix-Interaktionen in gleicher Weise beeinflusst werden.

Zur Erklärung der gesteigerten Funktionen via β_1 -Integrin bieten sich unterschiedliche denkbare Mechanismen an: Naheliegender wäre eine durch Hypoxie bzw. DFO bedingte Steigerung von Synthese und Einbau des β_1 -Integrins in die Zellmembran, so dass die stimulierten Zellfunktionen durch eine größere Anzahl von Integrinen bedingt wäre. Ein solches Verhalten als Reaktion auf Hypoxie wurde kürzlich berichtet, als eine vermehrte Expression des Integrins $\alpha_v\beta_3$ in humanen kultivierten Endothelzellen beobachtet werden konnte¹¹³. Auch in Endothelzellen der Retina wurde ein leichter Anstieg der mRNA-Menge von $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ nach Hypoxieeinwirkung beschrieben¹¹⁴. Daher wurde in dieser Arbeit mittels Durchflußzytometrie und Western Blot Analysen zur Expression der β_1 -, β_3 -, α_1 -, α_2 - und α_5 -Integrine an der Oberflächenmembran (Proteinebene) und mittels RT-PCR zur Analyse auf mRNA-Ebene und HVSMC und rVSMC durchgeführt. Allerdings konnte weder eine Veränderung der Integrinanzahl in der Durchflußzytometrie (Abb. 25a) noch Veränderungen auf mRNA-Ebene in der RT-PCR (Abb. 25b) und im Western-Blot (Abb.10) nach hypoxischem Stimulus gesehen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass PDGF-BB und Angiotensin II die β_1 -Integrin-abhängigen Funktionen wie Adhäsion und Spreading von VSMC auf Fibronectin und Kollagen Typ I signifikant steigerte, ohne die Expression der Integrine auf der Zellmembran zu verändern^{5, 6}. Die Divergenz zwischen diesen Ergebnissen der VSMC und dem Verhalten von HUVECs und retinalen Endothelzellen legt zum einen zellspezifische Unterschiede in der Reaktion auf Hypoxie nahe. Zum anderen wurde die erhöhte Integrinexpression nach Hypoxieeinwirkung vornehmlich am Integrin $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ beobachtet, welches nicht Gegenstand der Analyse dieser Arbeit war. Erhöhte Integrinexpression nach Hypoxiewirkung wurde zellspezifisch für unterschiedliche Integrine beobachtet. Ein divergierendes

Verhalten der hier analysierten Integrine an VSMC ist durch diese Beobachtung nicht widerlegt.

Ein weiteres Erklärungsmodell der beobachteten gesteigerten Interaktion des β_1 -Integrins mit den extrazellulären Matrixproteinen Kollagen Typ I und Fibronectin bei gleichbleibender Gesamtzahl der Integrine liefert die von mehreren Autoren beschriebene Aktivierung eines Integrins in Antwort auf von anderen Rezeptoren initiierte intrazelluläre Signale (gesteigerte Avidität). Diese Art des Aktivierungsprozesses wird auch "Inside-out-signaling" genannt^{16, 41, 1}. Zur Analyse der Frage, ob eine Aktivierung des β_1 -Integrins für die gesteigerten integrinabhängigen Zellfunktionen verantwortlich sein könnte, wurde mit Hilfe des Antikörpers 9EG7, der ein aktivierungsspezifisches Epitop des β_1 -Integrins erkennt, eine Durchflusszytometrie durchgeführt¹⁰⁸. Hier zeigte sich eine hypoxieinduzierte, gesteigerte Expression des Epitops (Abbildung 26). Damit konnte erstmals eine hypoxieinduzierte Aktivierung eines Integrins in VSMC gezeigt werden. Wang et al. konnten vor kurzem ebenfalls eine gesteigerte Migration von VSMC durch Aktivierung des β_1 -Integrins nachweisen¹¹⁵.

Der Prozess des Inside-out-signalings ist bis heute nicht genau untersucht. Es existieren jedoch Hinweise, dass Proteine des Zytoskeletts die Weiterleitung des Signals vermitteln. Dabei bindet u.a. ein Protein des Zytoskeletts, Talin, an die zytoplasmatischen Domänen der Integrine, wodurch die Bindungsstellen am extrazellulären Teil der Integrine in einen Zustand erhöhter Aktivität versetzt werden⁵⁸. Man spricht dann von erhöhter Affinität des Rezeptors¹⁶.

Schließlich könnte Hypoxie auch die Interaktion der zytoplasmatischen Integrin-Domäne mit dem Zytoskelett selbst beeinflussen. Der Rolle des Zytoskeletts bei der Regulation der Integrinaktivität ist erst seit verhältnismäßig kurzer Zeit größere Beachtung geschenkt worden^{56, 45}. Es existieren aber Hinweise, dass innerhalb des Zytoskeletts den Microtubuli eine wesentliche Funktion bei der Kontrolle der Integrinavidität zufällt¹¹⁶ und die Interaktion des intrazellulären Zytoskelettproteins Talin mit dem Schwanz des β_1 -Integrins dessen Aktivitätszustand regulieren kann⁵⁶.

Der Einfluss einer Modulation der Integrinaffinität auf Adhäsion und Spreading wurde bereits mehrfach berichtet: Chavakis und Kollegen sahen eine durch Zink induzierte Aktivierung des β_2 -Integrins, die zu gesteigerter Adhäsion von Leukozyten auf Vitronectin führte¹¹⁷. Ein aktivierender Antikörper gegen $\alpha_v\beta_3$, der eine erhöhte Affinität dieses Rezeptors auslöste, bewirkte bei Melanomzellen einen Anstieg von Adhäsion und Spreading¹¹⁸. Die Arbeitsgruppe um Seki berichtete eine Steigerung der Adhäsion von VSMC auf extrazellulären Matrixproteinen

durch Vorinkubation mit dem Antikörper 8A2, welcher durch Bindung an die β_1 - Untereinheit eine erhöhte Avidität des Integrinrezeptors induziert ⁵.

Die in der Arbeit gezeigte gesteigerte Migration nach Hypoxieeinwirkung wurde für mehrere Zelltypen beschrieben. Für DFO sind bisher keine solchen Daten veröffentlicht. Nach 24stündiger Hypoxiedauer migrierten Keratinozyten schneller auf Fibronektin und Kollagen Typ I als die normoxischen Zellen ⁴⁰, in HUVECs bewirkte die Induktion des hypoxia-inducible-factor 1 (HIF-1) über das Adapterprotein Shc einen Anstieg der Migrationsrate ¹¹⁹. Mogford und Kollegen sahen eine Steigerung der Migration humaner dermaler Fibroblasten, die von der Aktivierung der ERK 1/2- MAPK begleitet war. Dieser Effekt war allerdings vom Spenderalter abhängig und nur in Fibroblasten junger Erwachsener (24-33 Jahre) zu sehen, dagegen zeigten Fibroblasten älterer Menschen (61-73) sogar einen Rückgang aktiver p42 / p44- MAPK. Auch die Steigerungsrate der Migration hing vom Alter der Spender ab, sie lag bei 109% (junge Spender) bzw. 50% (ältere Spender)¹²⁰. Auch während der hier durchgeführten Versuchsreihen fielen unterschiedliche Steigerungsraten der Migration bei unterschiedlichen Zellreihen auf, die somit eventuell auf das Alter der Spender zurückgeführt werden könnten.

Die gleichzeitige Steigerung von zwei so unterschiedlichen Vorgängen wie der vergleichsweise statischen Adhäsion und der dynamischen Migration, die Mobilität voraussetzt, mag auf den ersten Blick paradox wirken. Schließlich scheint eine gesteigerte Adhäsion die Fortbewegung der Zellen zu behindern. Diese Annahme wird durch die experimentelle Beobachtung unterstützt, dass eine experimentelle Aviditätssteigerung des β_1 - Integrins durch den Antikörper 8A2 mit gesteigerter Adhäsion von einer verminderten, durch PDGF-BB ausgelösten Migration der VSMC auf Kollagen Typ I begleitet war ⁵. Die Autoren der Arbeit stellten die These auf, dass ein Wechselspiel zwischen dem eher für die Adhäsion zuständigen β_1 -Integrin und dem die Migration auf Kollagen Typ I zum anderen Teil vermittelnden β_3 für die unterschiedlichen Beobachtungen zuständig sein könnte. Slepian et al. stellten fest, dass an der Migration von VSMC nach einer Endothelverletzung eher β_3 - als β_1 - Integrine beteiligt waren. Eine Blockade des β_3 -Integrins vermochte hier sogar die Dicke der sich bildenden Neointima zu reduzieren ³³.

In der vorliegenden Arbeit an nicht vorgeschädigten VSMC inhibierten sowohl der Antikörper c7E3 (β_3) als auch P5D2 (β_1) die Migration der Kontrollgruppe und von mit DFO vorinkubierten VSMC (Abb 9). DFO und Hypoxie steigerten die Migration auf Kollagen I (20 μ g) in zeitabhängiger Weise um bis zu 150%. Dieser Effekt konnte durch Blockade der Proteinkinase C mit PMA (1 μ g über 24h) (Abb. 13 u. 34) und der MAP-Kinase-Inhibitoren

nase C mit PMA (1 μ g über 24h) (Abb. 13 u. 34) und der MAP-Kinase-Inhibitoren PD98059 (ERK1/2) und SB 203580 (p38) signifikant inhibiert werden (Abb. 16 u. 29).

Die Aussagen zu Verhältnis von Adhäsion und Migration und vermittelnden Integrinen sind widersprüchlich. Mehrere Gruppen haben die Wichtigkeit des β_1 -Integrins für die Migration auf Kollagen Typ I und Fibronectin unterstrichen^{17, 5, 26}. Skinner et al. stellten fest, dass das Integrin $\alpha_2\beta_1$ für die Migration auf Kollagen Typ I erforderlich sei und die Verwendung des blockierenden monoklonalen β_1 -Antikörpers P5D2 die Migration deutlich verringerte¹⁷. Ridgway et al. sahen eine durch Hypoxie gesteigerte Migration humaner Keratinocyten auf Fibronectin, welche durch eine vermehrte Expression von $\alpha_v\beta_6$ ausgelöst wurde und durch die Verwendung eines inhibierenden Antikörpers für $\alpha_v\beta_6$ inhibiert werden konnte¹²¹. In einer neueren Veröffentlichung wurde beschrieben, dass die Stimulation der Proteinkinase C durch PMA sowohl die Adhäsion als auch die Migration humaner Gliomazellen steigerte¹²². Dies stimmt mit den in dieser Arbeit beschriebenen gesteigerten Zellfunktionen durch eine hypoxisch ausgelöste PKC-Aktivierung überein.

Die Annahme, dass erhöhte Adhäsion die Migration behindere, setzt die Vorstellung voraus, dass während der Migration ein ständiges Lösen und erneutes Knüpfen der Kontakte zwischen einem Integrin und der extrazellulären Matrix stattfindet. Das ist jedoch nicht der Fall, vielmehr wird eine einmal bestehende Bindung in der Mehrzahl der Fälle offenbar nicht mehr gelöst. Die Zelle rollt während der Migration gewissermaßen über diese Integrin-Protein-Bindung hinweg und bildet in der Vorwärtsbewegung an anderen Stellen der Zellmembran neue Integrin-Matrix-Bindungen. Diese Bindungen bestehen jedoch bis das Integrin-Matrix-Paar so vom vorderen zum hinteren Ende der Zelle gelangt ist. Dort wird es aus der Zellmembran ausgeklinkt und auf der Matrix zurückgelassen³⁵ oder durch Endozytose wieder in die Zelle aufgenommen und erneut eingesetzt³⁷.

Unter diesen Voraussetzungen erscheinen Adhäsion und Spreading als grundlegende Zellfunktionen der Migration. Der Zell-Matrix-Kontakt ist der gleiche, lediglich das Rollen der Zelle und das Ausklinken bzw. die Wiederverwertung der Integrine sind als Unterschiede festzustellen.

Dennoch muss man sich die Frage stellen, warum die Beobachtungen von Seki und Mitarbeitern den in dieser Arbeit gezeigten Effekten widersprechen. Hierbei ist festzustellen, dass sich die durch Seki erzeugte Aktivierung des β_1 -Integrins nicht ohne weiteres mit der Aktivierung via PKC und MAPK unter hypoxischen Bedingungen vergleichen läßt, die unter den weiter oben erläuterten Begriff des inside-out-signalings fällt. Dagegen stellt die Aktivierung des

Integrins unabhängig von physiologischen Vorgängen durch den von Seki verwendeten Antikörper 8A2 einen Eingriff in die Signalkette von außen dar, der eher dem outside-in-signaling entspricht⁵⁵. Bisher existieren keine Erkenntnisse darüber, auf welchen intrazellulären Wegen der von 8A2 induzierte Effekt vermittelt wird. Denkbar wäre hier ein verzögertes Ausklinken der β_1 -Proteinkomplexe am Zellende, die das Fortkommen der Zelle behindern würden. Möglicherweise bewirkt die äußere Aktivierung von β_1 tatsächlich eine reduzierte Aktivität von β_3 , wie von Seki postuliert. Das ist aber offensichtlich bei der über PKC und MAPK vermittelten Steigerung der β_1 -Funktionen nicht der Fall, wie auch die Beobachtungen von Besson und Mitarbeitern zeigen¹²². Bei der Aktivierung der Integrine durch intrazelluläre Signaltransduktion kommt es zu einer Vielzahl von Phosphorylierungsvorgängen. Die Interaktion des zyttoplasmatischen Schwanzes des β_1 - und β_3 -Integrins mit Talin, die wahrscheinlich das Aktivierungssignal überträgt⁵⁶, ist von Phosphorylierungsvorgängen unabhängig⁵⁸. Dagegen begünstigen Phosphorylierungen die Bindung des β_3 -Schwanzes an das Membranprotein Shc¹²³. Diese Bindung resultiert in einer Steigerung der Migration^{119, 58}.

Ob eine solche Phosphorylierung von Shc auch durch das von Antikörper 8A2 ausgelöste outside-in-signaling erreicht wird, ist nicht beschrieben. Die unterschiedlichen Beobachtungen zum Verhältnis von Adhäsion und Spreading könnten also durch die Verschiedenartigkeit des Verhaltens von Talin und Shc hervorgerufen werden. Die Interaktion zwischen Talin und β_1 ist phosphorylierungsunabhängig, weshalb bei beiden Arten der Integrin-Aktivierung (8A2 von extrazellulär, Hypoxie via MAPK und PKC) eine Steigerung der Adhäsion resultiert. Dagegen könnte durch die Phosphorylierungsvorgänge von MAPK und PKC eine Bindung von Shc an β_3 erfolgen, die in erhöhter Migration resultiert, was bei der Aktivierung von extrazellulär unterbleiben würde. Um in dieser Frage mehr Klarheit zu schaffen, wäre es notwendig, auch den hypoxischen Einfluss auf das β_3 -Integrin genauer zu untersuchen, da die gesteigerte Migration unter Hypoxie, die von mehreren Gruppen beschrieben wurde^{40, 119, 120, 122}, durch eine Aktivierung beider Integrine unter Hypoxie zu erklären sein könnte.

Für VSMC ist eine Angiotensin II-induzierte gesteigerte Migration beschrieben, die mit ERK 1/2-Aktivierung einherging. Dabei konnte keine Änderung der β_3 -Expression festgestellt werden¹²⁴. Der für das β_1 -Integrin mögliche Nachweis einer Aktivierung mittels Antikörper lässt sich für das β_3 -Integrin nicht führen, da ein vergleichbarer Antikörper nicht erhältlich ist. Die Frage, ob die durch Hypoxie gesteigerte Migration glatter Gefäßmuskelzellen durch eine Aktivierung des β_3 -Integrins vermittelt wird, lässt sich somit zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beantworten.

Es wurde berichtet, dass eine durch Hypoxie bewirkte Veränderung zellulärer Funktionen verschwand, wenn man die Zellen ausreichend lange normalisierten Sauerstoffverhältnissen aussetzte¹²⁵. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit auch an VSMC gezeigt werden: Der durch Hypoxie induzierte Anstieg der Adhäsion verschwindet nach 24stündiger Reoxygenierung (Abbildung 20). Der vorübergehende Charakter der Hypoxiewirkung auf diese Funktionen lässt sich mit der These der Integrinaktivierung ohne vermehrte Integrinexpression in Zusammenhang bringen, da lediglich der durch Hypoxie ausgelöste höhere Aktivitätszustand der Integrine für deren gesteigerte Funktionen sorgt. Bei Normalisierung der O₂-Verhältnisse lässt auch die Aktivierung der Integrine wieder nach, und es kommt zum Verschwinden des Effektes.

4.2 Signaltransduktion

Dem durch Hypoxie bzw. DFO induzierten Anstieg der β_1 -Integrin-abhängigen Funktionen (Adhäsion, Migration und Spreading) ging eine Aktivierung der p38- und ERK 1/2 -MAPK voraus, da im Immunoblot eine Aktivierung bzw. Phosphorylierung dieser Kinasen auf Proteinebene gezeigt werden konnte (Abb. 30c). Darüber hinaus inhibierten der p38-Inhibitor SB 203580 sowie der ERK 1/2-Inhibitor PD 98059 den hypoxischen (Abb. 27-29) bzw. durch DFO induzierten Effekt (Abb.14-16). Adhäsion, Migration und Spreading der Kontrollgruppe wurden durch die Gegenwart der Inhibitoren nicht beeinflusst.

Die Aktivierung der MAPK durch Hypoxie wurde in anderen Zellsystemen schon mehrfach beobachtet^{126, 127, 128, 129}. Die in dieser Arbeit geschilderte Einbindung der p38-Kaskade in die Signaltransduktion der Hypoxie stimmt mit der Beobachtung überein, dass dieser Pfad der MAPK besonders durch (auch oxidativen) Stress¹³⁰ aktiviert wird. So wird beispielsweise auch die als Reaktion auf O₂-Mangel gesteigerte Erythropoetinbildung in der Niere durch p38 vermittelt⁷³. Darüber hinaus löst Hypoxie über p38 eine adaptive Vasokontraktion der Pulmonalarterie der Ratte aus¹³¹. p38 ist daher ein etablierter Bestandteil intrazellulärer Reaktionen auf Hypoxie.

ERK 1/2 dagegen aktiviert den Transkriptionsfaktor hypoxia-inducible-factor 1(HIF-1) und phosphoryliert diesen direkt. Es ist also an einer großen Zahl der Anpassungsversuche des Körpers an den gesunkenen O₂-Gehalt beteiligt^{132, 133}. Baas et al. bemerkten, dass dieses Enzym in VSMC durch die reaktive Sauerstoffverbindung O₂⁻ aktiviert wird¹³⁴. Reaktive Sauer-

stoffverbindungen (u.a. O_2^- und H_2O_2) werden von VSMC als Antwort auf verschiedene Stressfaktoren (auch Hypoxie) erzeugt und können neben ERK 1/2 auch p38 aktivieren¹³⁰. Kürzlich wurde berichtet, dass die Induktion von HIF-1 α durch Thrombin mit der Aktivierung reaktiver Sauerstoffverbindungen über die p22^{phos}-enthaltende NADPH-Oxidase einhergeht¹³⁵. Das legt eine Rolle für reaktive Sauerstoffverbindungen in der durch Hypoxie ausgelösten Signaltransduktion nahe.

Eine Beteiligung beider Enzymkaskaden an der durch Hypoxie angestoßenen Signaltransduktion in VSMC stimmt mit der Beobachtung von Jin und Mitarbeitern überein, wonach Hypoxie p38 und ERK 1/2 in Pulmonalarterien stimuliert¹³⁶. In früheren Veröffentlichungen wurde auch berichtet, dass der MAPK-Pfad Integrin-Aktivierung vermitteln kann. So unterbleibt die Aktivierung des auf Thrombozyten exprimierten Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ durch das Glykoprotein Ib-IX in Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters in Gegenwart von PD 98059 und UO126^{137, 138}.

Auch die Proteinkinase C ist an der Vermittlung der gesteigerten Funktionen Adhäsion, Migration und Spreading in entscheidendem Maße beteiligt, da diese Steigerung auch durch den PKC-Inhibitor PMA vollständig unterbunden werden konnte (Abb. 11-13 bzw. 31-33) und überdies eine Aktivierung der PKC zu einer signifikanten Erhöhung dieser drei Funktionen führte. Die Einbindung der PKC in die Aktivierung der MAP-Kinase ist für andere Zellsysteme gut dokumentiert, dabei liegt die PKC innerhalb der Signalübermittlung oberhalb der MAPK^{81, 83, 82, 139}. Eine gemeinsame Rolle von PKC und MAPK in VSMC im Bereich der Zellmembran bei der Auslösung der Muskelkontraktion ist bekannt⁸⁴. Dennoch wurde die Aktivität der MAPK innerhalb der Zelle überwiegend im Zellkern beobachtet, wo sie an der Modifikation von Zellproliferation, Genexpression und Apoptose beteiligt ist^{63, 61}. Kürzlich wurde berichtet, dass die durch PKC vermittelte Stimulierung der MAPK in humanen Gliomazellen nicht im Nukleus, sondern an den Adhäsionsplaques erfolgte. Sie wurde hier vor allem durch PKC ϵ bewirkt und resultierte in gesteigerter Adhäsion und Migration dieser Zellen. Dagegen aktivierte PKC α die MAPK im Nukleus, worauf Adhäsion und Migration abnahmen¹²². Aufgrund dieser Beobachtungen von Besson et al. und den bei den Versuchen beobachteten Steigerungen von Adhäsion und Migration wurde untersucht, ob Hypoxie PKC ϵ zu aktivieren vermag. Eine solche hypoxieinduzierte Phosphorylierung konnte im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 34).

Die in dieser Arbeit gezeigten, durch PKC-Aktivierung gesteigerten Zellfunktionen Adhäsion, Migration und Spreading werden durch die erstgenannten funktionellen Ergebnisse von Bes-

son et al. gestützt, was die Vermutung nahelegt, dass Hypoxie eine Aktivierung der MAPK über PKC ϵ an den Adhäsionsplaques bewirkt. Weitere Unterstützung erhält diese Hypothese durch die verstärkte Expression von PKC ϵ unter Hypoxie¹⁴⁰. Wie schon bei der MAPK werden reaktive Sauerstoffverbindungen auch mit der Aktivierung der PKC in Verbindung gebracht¹⁴⁰. Außerdem ist die PKC ein wichtiger Bestandteil in der Aktivierung von HIF-1 α durch Angiotensin II¹⁴¹. Über Angiotensin II weiß man, dass es in VSMC u.a. am Anfang eines intrazellulären Signalwegs steht, welcher über die NADPH-Oxidase reaktive Sauerstoffverbindungen generiert, woraufhin es (neben anderen Enzymmodifikationen) zur Aktivierung von ERK1/2 und p38 kommt^{142, 143}.

Auf funktioneller Ebene ist eine Angiotensin II-induzierte Steigerung von Adhäsion und Spreading auf Kollagen I beschrieben⁶. Stawowy et al. konnten zeigen, dass die durch Angiotensin II induzierte gesteigerte Adhäsion kardialer Fibroblasten auf Kollagen I zu einer β_1 – Aktivierung führte, welche durch eine Phosphorylierung von PKC ϵ vermittelt wurde. In PKC ϵ -knock-out-Zellen blieb die Angiotensin II induzierte Adhäsionssteigerung aus¹⁴⁴.

Außerdem ist bekannt, dass Angiotensin II eine gesteigerte Migration von VSMC auf Vitronektin bewirkt, welche mit einer Aktivierung von ERK 1/2 und p38 einhergeht¹²⁴. Friedrich et al. konnten zeigen, dass die gesteigerte Migration von rVSCM der thorakalen Aorta mit einer durch Angiotensin II induzierten vermehrten Expression der Integrin-linked-Kinase einherging und sich durch den Einfluss von Statinen verhindern ließ¹⁴⁵.

Aufgrund der Gleichartigkeit dieser Resultate mit den in dieser Arbeit gezeigten Steigerungen der integrinabhängigen Zellfunktionen ist zu erwarten, dass auch Angiotensin II zu einer über PKC ϵ und MAPK vermittelten Integrinaktivierung in VSMC führen könnte.

4.3 Technisch-experimentelle Überlegungen

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten stammen von Primärkulturen glatter Muskelzellen der Sprague-Dawley-Ratten sowie humanen Primärkulturen unterschiedlicher Herkunft. Über die Spender der zellulären Gewebe ist aus Gründen des Datenschutzes nichts bekannt. Da während der Datenerhebung mit unterschiedlichen Zellreihen gearbeitet wurde stellt sich die Frage, in wieweit die Reaktionsbreite der Zellen interindividuellen Schwankungen unterworfen ist und ob auf dieser Basis allgemeine Aussagen über das Verhalten von VSMC prinzipiell möglich sind, da gleiche Bedingungen bei allen Experimenten strenggenommen nicht vorlagen und nicht vorliegen können. Dazu ist anzumerken, dass trotz der unterschiedlichen Herkunft des Gewebes die generelle Reaktion auf den hypoxischen Reiz gleichgerichtet war.

Bei mehrfacher Durchführung eines Experiments waren nur geringe Schwankungen zwischen den einzelnen Zellreihen erkennbar.

Mehrere Autoren haben in der Vergangenheit darauf hingewiesen, dass Zellkultur einen artifizialen Eingriff in natürliche Abläufe darstellt, wodurch unter anderem die Integrinexpression beeinflusst werden kann. Dass dadurch aber die generelle Reaktion des β_1 -Integrins auf Hypoxie beeinträchtigt wird, ist unwahrscheinlich.

Dagegen muss man sich fragen, ob nicht die Verwendung der Protease Trypsin zur Ablösung der Zellen von der Kulturschale zu Beginn eines Experiments nicht eine schädigende Wirkung auf die Integrine hat, die ja zusammen mit anderen Molekülen für das Haften der Zelle an der Kulturschale sorgen. Diese schädigende Wirkung kann nicht ausgeschlossen werden. Allerdings betraf die Verwendung von Trypsin natürlich sowohl die Hypoxie- als auch die Kontrollgruppe, so dass eine mögliche beeinträchtigende Wirkung gleichmäßig über beide Gruppen verteilt sein sollte. Ob eventuell durch den Hypoxie-/DFO-Einfluss neugebildete Integrine durch die anschließende Trypsinbehandlung zerstört worden sein könnten und aufgrund dieses Störfaktors fälschlicherweise eine gleichbleibende Integrinzahl konstatiert worden wäre, ist möglich. Es ist allerdings nicht ersichtlich, warum neugebildete Integrine den älteren gegenüber empfindlicher auf Trypsin reagieren sollten. Möglicherweise sind diese neugebildeten Integrine jedoch aufgrund ihrer geringeren Zahl von der Zerstörung prozentual stärker betroffen als die zahlreicheren älteren Integrine. Das impliziert jedoch, dass in diesem Fall zumindest einige neue Integrine Trypsin gegenüber resistent wären. Dann hätte aber in der Durchflußzytometrie zumindest eine geringfügige Änderung im Muster der Integrinexpression erfolgen müssen. Da das nicht der Fall war ist davon auszugehen, dass Hypoxie die Integrinexpression nicht verändert.

Ein schwieriges Problem stellt die technische Durchführung der Hypoxieexperimente dar. Zwar ist der O_2 -Gehalt des Hypoxieschranks genau regulierbar, die O_2 -Konzentration im Medium wird hierbei jedoch nicht bestimmt. Solche Messungen waren während des Experimentes auch nicht manuell durchführbar, da ein Öffnen der Hypoxiekammer unweigerlich einen Anstieg der O_2 -Konzentration mit unkalkulierbaren Auswirkungen auf die Integrinfunktionen zur Folge gehabt hätte. Eine Aussage über die tatsächliche Reduktion des Sauerstoffgehalts kann also nicht gemacht werden. Unstrittig ist jedoch, dass durch die Exposition der Zellen in der Hypoxiekammer eine deutliche Beeinträchtigung der durch das β_1 -Integrin vermittelten Funktionen von VSMC feststellbar ist. Es ist daher anzunehmen, dass dies durch eine relevante Erniedrigung der O_2 -Spiegel in der Zelle zustande gekommen ist.

Die Zuverlässigkeit der hier getroffenen Aussagen wird allerdings dadurch beeinflusst, dass bei der Durchführung der Experimente in Raumluft automatisch ein Wiederanstieg der O₂-Konzentration im Medium erfolgt. Da eine länger als 4h andauernde Reoxygenierung zum Verschwinden des Hypoxie-induzierten Effektes führt und die Durchführung der Experimente länger als 2h dauerte ist davon auszugehen, dass die Steigerungsraten von umfangreicheren Adhäsions- und Spreadingexperimenten bei Durchführung dieser Experimente unter Hypoxie noch höher ausfallen würden. Bei der Interpretation der Migrationsdaten ist aufgrund der längeren Versuchsdauer generell mit einer durch Reoxygenierung verbundenen Abschwächung des ursprünglich vorhandenen Effektes zu rechnen. Eine solche Durchführung des gesamten Experimentes unter hypoxischen Bedingungen war jedoch unter den gegebenen technischen Voraussetzungen nicht ohne Unterbrechungen (Trypsinationsschritt, Aussetzen der Zellen, PDGF-Zugabe...) und der damit verbundenen Reoxygenierung möglich. Eine Durchführung des Migrationsvorganges unter Hypoxie hätte in diesem Fall eine „Re-Hypoxie“ bedeutet, die mitunter zu einem veränderten Verhalten der VSMC hätte führen können. Daher wurde zugunsten eines einheitlicheren Versuchsaufbau auf die Migration unter hypoxischen Bedingungen verzichtet.

5. Zusammenfassung

1. Die Arbeit beschreibt den Einfluss von Hypoxie und dem Hypoxieimitator DFO auf die β_1 -Integrinvermittelten Funktionen der Gefäßmuskelzelle auf den extrazellulären Matrixproteinen Kollagen I und Fibronectin. Es konnte eine Steigerung der drei Funktionen Adhäsion, Spreading und Migration auf den extrazellulären Matrixproteinen Kollagen I und Fibronectin gezeigt werden. Die Untersuchungen ergaben ein gleichgerichtetes Verhalten der drei Zellfunktionen auf beiden Proteinen. Die Konzentrationen von Kollagen I und Fibronectin scheinen keinen Einfluss auf die Ausprägung der Zellfunktion zu haben.

2. Die durch Hypoxie bewirkten Funktionssteigerungen sind in Richtung und Ausmaß mit denen durch DFO identisch. Der durch Hypoxie ausgelöste Effekt auf die Adhäsion ist nach 24stündiger Normalisierung des Sauerstoffgehalts vollständig reversibel.

3. Neben seiner Funktion als Adhäsionsmolekül ist das β_1 -Integrin auch aktiv an der Signaltransduktion beteiligt. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit auch die Auswirkungen von Hypoxie und DFO auf die Enzymkaskaden MAP-Kinase und Proteinkinase C untersucht. Sowohl Hypoxie als auch DFO bewirkten eine Aktivierung der MAP-Kinase und Proteinkinase C. Diese beiden Enzyme scheinen die gezeigten gesteigerten Zellfunktionen zu induzieren, da durch pharmakologische Inhibierung sowohl der Proteinkinase C als auch der MAP-Kinase die Effekte von Hypoxie und DFO signifikant inhibiert werden konnten.

Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Hypoxie den PKC Subtyp ϵ aktiviert.

4. Die Frage, ob die gesteigerten Zellfunktionen möglicherweise durch eine Erhöhung der β_1 -Integrine bedingt seien, wurde durch RT-PCR und Durchflusszytometrie untersucht. In beiden Fällen wurde eine gleichbleibende Integrinmenge nach Hypoxie/DFO festgestellt. Dagegen gelang der Nachweis einer hypoxieinduzierten Aktivierung des β_1 -Integrins durch die Verwendung eines Antikörpers gegen ein nur im aktivierten Integrin exprimiertes Epitop in der Durchflusszytometrie.

6. Literaturverzeichnis

1. Ross RS, Borg TK. Integrins and the myocardium. *Circ Res* 2001; 88:1112-9.
2. Hynes R. Relationships between fibronectin and the cytoskeleton. In: G P, ed. *Cytoskeletal Elements and Plasma Membrane Organization*. Vol. 7. Amsterdam, the Netherlands: North Holland Publishing Co, 1981:97-139.
3. Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, et al. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 1986; 46:271-82.
4. Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J* 1990; 4:2868-80.
5. Seki J, Koyama N, Kovach NL, et al. Regulation of beta1-integrin function in cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1996; 78:596-605.
6. Kappert K, Schmidt G, Doerr G, et al.. Angiotensin II and PDGF-BB stimulate beta(1)-integrin-mediated adhesion and spreading in human VSMCs. *Hypertension* 2000; 35:255-61.
7. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48:549-54.
8. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285:1028-32.
9. Springer TA. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:65-72.
10. Loftus JC, Liddington RC. Cell adhesion in vascular biology. New insights into integrin-ligand interaction. *J Clin Invest* 1997; 99:2302-6.
11. Puzon-McLaughlin W, Takada Y. Critical residues for ligand binding in an I domain-like structure of the integrin beta1 subunit. *J Biol Chem* 1996; 271:20438-43.
12. Bajt ML, Loftus JC. Mutation of a ligand binding domain of beta 3 integrin. Integral role of oxygenated residues in alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) receptor function. *J Biol Chem* 1994; 269:20913-9.
13. Hynes RO, Marcantonio EE, Stepp MA, Urry LA, Yee GH. Integrin heterodimer and receptor complexity in avian and mammalian cells. *J Cell Biol* 1989; 109:409-20.
14. Kappert K, Blaschke F, Meehan WP, et al. Integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 mediate VSMC migration and are elevated during neointima formation in the rat aorta. *Basic Res Cardiol* 2001; 96:42-9.
15. Kintscher U, Kappert K, Schmidt G, et al. Effects of abciximab and tirofiban on vitronectin receptors in human endothelial and smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 2000; 390:75-87.

16. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998; 91:2645-57.
17. Skinner MP, Raines EW, Ross R. Dynamic expression of alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrin receptors by human vascular smooth muscle cells. Alpha 2 beta 1 integrin is required for chemotaxis across type I collagen-coated membranes. *Am J Pathol* 1994; 145:1070-81.
18. Moiseeva EP. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res* 2001; 52:372-86.
19. Clyman RI, Mauray F, Kramer RH. Beta 1 and beta 3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix. *Exp Cell Res* 1992; 200:272-84.
20. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *PG - 345-57. Cell* 1996; 84:345-57.
21. Rupp PA, Little CD. Integrins in vascular development. *Circ Res* 2001; 89:566-72.
22. Schwartz MA SM, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995; 11:549-599 Review.
23. Schwartz SM HR, Majesky MW. Developmental mechanisms underlying pathology of the arteries. *Physiol Rev.* 1990 Oct; 70:1177-209 Review.
24. Stawowy P, Blaschke F, Kilimnik A, et al. Proprotein convertase PC5 regulation by PDGF-BB involves PI3-kinase/p70(s6)-kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2002; 39:399-404.
25. Liu MW, Roubin GS, King SB, 3rd. Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation* 1989; 79:1374-87.
26. Graf K, Meehan WP, Chen JZ, et al.. Upregulation of αv -, $\beta 3$ - and $\beta 5$ - Integrin mRNA during Neointima Formation in the Rat Aorta after Balloon Injury (Abstract). *Circulation* 1996; 94.
27. Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994; 77:477-8.
28. Cramer LP, Mitchison TJ. Myosin is involved in postmitotic cell spreading. *J Cell Biol* 1995; 131:179-89.
29. Re F, Zanetti A, Sironi M, et al. Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* 1994; 127:537-46.
30. Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric control of cell life and death. *Science* 1997; 276:1425-8.

31. Grotendorst GR, Seppa HE, Kleinman HK, Martin GR. Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78:3669-72.
32. Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, et al.. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science* 1987; 237:1333-6.
33. Slepian MJ, Massia SP, Dehdashti B, Fritz A, Whitesell L. Beta3-integrins rather than beta1-integrins dominate integrin-matrix interactions involved in postinjury smooth muscle cell migration. *Circulation* 1998; 97:1818-27.
34. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996; 84:359-69.
35. Regen CM, Horwitz AF. Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts. *J Cell Biol* 1992; 119:1347-59.
36. Izzard CS, Lochner LR. Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility: an interference-reflexion study. *J Cell Sci* 1980; 42:81-116.
37. Ng T, Shima D, Squire A, et al. PKCalpha regulates beta1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic. *Embo J* 1999; 18:3909-23.
38. Bard JB, Hay ED. The behavior of fibroblasts from the developing avian cornea. Morphology and movement in situ and in vitro. *J Cell Biol* 1975; 67:400-18.
39. Chen WT. Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement. *J Cell Biol* 1981; 90:187-200.
40. O'Toole EA, Marinkovich MP, Peavey CL, et al. Hypoxia increases human keratinocyte motility on connective tissue. *J Clin Invest* 1997; 100:2881-91.
41. Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* 1997; 100:S91-5.
42. Giancotti FG. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:691-700.
43. Hynes RO. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol* 1999; 9:M33-7.
44. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; 268:233-9.
45. Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 2000; 113:3563-71.
46. Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4:487-525.

47. Petit V, Thiery JP. Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell* 2000;92:477-94.
48. Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC, Burridge K. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *PG - 531-3. Nature* 1986; 320:531-3.
49. Otey CA, Pavalko FM, Burridge K. An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *PG - 721-9. J Cell Biol* 1990; 111:721-9.
50. Sharma CP, Ezzell RM, Arnaout MA. Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18. *PG - 3461-70. J Immunol* 1995; 154:3461-70.
51. Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *PG - 1181-7. J Cell Biol* 1995; 130:1181-7.
52. Sims PJ, Ginsberg MH, Plow EF, Shattil SJ. Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *PG - 7345-52. J Biol Chem* 1991; 266:7345-52.
53. Kouns WC, Hadvary P, Haering P, Steiner B. Conformational modulation of purified glycoprotein (GP) IIb-IIIa allows proteolytic generation of active fragments from either active or inactive GPIIb-IIIa. *PG - 18844-51. J Biol Chem* 1992; 267:18844-51.
54. Frelinger AL, 3rd, Du XP, Plow EF, Ginsberg MH. Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and function. *PG - 17106-11. J Biol Chem* 1991; 266:17106-11.
55. Liddington RC, Ginsberg MH. Integrin activation takes shape. *J Cell Biol* 2002; 158:833-9.
56. Calderwood DA, Zent R, Grant R, et al. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem* 1999; 274:28071-4.
57. O'Toole TE, Ylanne J, Culley BM. Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the beta subunit cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 1995; 270:8553-8.
58. Calderwood DA, Yan B, de Pereda JM, et al. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem* 2002; 277:21749-58.
59. Armulik A, Nilsson I, von Heijne G, Johansson S. Determination of the border between the transmembrane and cytoplasmic domains of human integrin subunits. *J Biol Chem* 1999; 274:37030-4.
60. Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *PG - 283-323. Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42:283-323.

61. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:180-6.
62. 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; 92:7686-9.
63. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410:37-40.
64. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22:153-83.
65. 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; 270:27489-94.
66. Zheng CF, Guan KL. Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem* 1993; 268:11435-9.
67. Wojnowski L, Zimmer AM, Beck TW, et al. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet* 1997; 16:293-7.
68. Wojnowski L, Stancato LF, Larner AC, Rapp UR, Zimmer A. Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 2000; 91:97-104.
69. Pritchard CA, Bolin L, Slattery R, Murray R, McMahon M. Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol* 1996; 6:614-7.
70. Giroux S, Tremblay M, Bernard D, et al. Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol* 1999; 9:369-72.
71. Allen M, Svensson L, Roach M, et al. Deficiency of the stress kinase p38alpha results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells. *J Exp Med* 2000; 191:859-70.
72. Adams RH, Porras A, Alonso G, et al. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell* 2000; 6:109-16.
73. Tamura K, Sudo T, Senftleben U, et al. Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* 2000; 102:221-31.
74. Badger AM, Bradbeer JN, Votta B, et al. Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of

- arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279:1453-61.
75. Dekker LV, Parker PJ. Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci* 1994; 19:73-7.
76. Morgan KG, Leinweber BD. PKC-dependent signalling mechanisms in differentiated smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 1998; 164:495-505.
77. Defilippi P, Olivo C, Venturino M, et al.. Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. *Microsc Res Tech* 1999; 47:67-78.
78. Vuori K, Ruoslahti E. Activation of protein kinase C precedes alpha 5 beta 1 integrin-mediated cell spreading on fibronectin. *J Biol Chem* 1993; 268:21459-62.
79. Haller H, Lindschau C, Maasch C, et al. Integrin-induced protein kinase C α and C ϵ translocation to focal adhesions mediates vascular smooth muscle cell spreading. *PG - 157-65. Circ Res* 1998; 82:157-65.
80. Berra E, Diaz-Meco MT, Dominguez I, et al. Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell* 1993; 74:555-63.
81. El-Shemerly MY, Besser D, Nagasawa M, Nagamine Y. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate activates the Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway upstream of SOS involving serine phosphorylation of Shc in NIH3T3 cells. *J Biol Chem* 1997; 272:30599-602.
82. Miranti CK, Ohno S, Brugge JS. Protein kinase C regulates integrin-induced activation of the extracellular regulated kinase pathway upstream of Shc. *J Biol Chem* 1999; 274:10571-81.
83. Short SM, Boyer JL, Juliano RL. Integrins regulate the linkage between upstream and downstream events in G protein-coupled receptor signaling to mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2000; 275:12970-7.
84. Khalil RA, Morgan KG. PKC-mediated redistribution of mitogen-activated protein kinase during smooth muscle cell activation. *Am J Physiol* 1993; 265:C406-11.
85. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med* 1986; 314:488-500.
86. Hueper W. General reviews. *Arterioscler Arch Pathol* 1944; 38:162-181.
87. Martin JF, Booth RF, Moncada S. Arterial wall hypoxia following thrombosis of the vasa vasorum is an initial lesion in atherosclerosis. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:355-9.
88. Bjornheden T, Levin M, Evaldsson M, Wiklund O. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:870-6.

89. Wang GL, Jiang BH, Semenza GL. Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 216:669-75.
90. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8:588-94.
91. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:4304-8.
92. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:5680-4.
93. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16:4604-13.
94. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1994; 269:23757-63.
95. Crawford DW, Blankenhorn DH. Arterial wall oxygenation, oxyradicals, and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1991; 89:97-108.
96. Dean RT, Wilcox I. Possible atherogenic effects of hypoxia during obstructive sleep apnea. *Sleep* 1993; 16:S15-21; discussion S21-2.
97. Schneiderman G, Goldstick TK. Carbon monoxide-induced arterial wall hypoxia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1978; 30:1-15.
98. Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 1993; 82:3610-5.
99. Ross R, Kariya B. Morphogenesis of vascular smooth muscle in atherosclerosis and cell structure. In: Bohr DF, Somiyo AP, Sparks HY, eds. *Handbook of Physiology: The Cardiovascular System, Section 2*. Bethesda MD: American Physiology Society, 1988:69-91.
100. Yamamoto K, Yamamoto M. Cell adhesion receptors for native and denatured type I collagens and fibronectin in rabbit arterial smooth muscle cells in culture. *Experimental Cell Research* 1994; 214:258-263.
101. Law RE, Meehan WP, Xi XP, et al. Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest* 1996; 98:1897-905.
102. Regitz-Zagrosek V, Fielitz J, Hummel M, et al. Decreased expression of ventricular angiotensin receptor type 1 mRNA after human heart transplantation. *J Mol Med* 1996; 74:777-82.

103. Alfarano A, Indraccolo S, Circosta P, et al. An alternatively spliced form of CD79b gene may account for altered B-cell receptor expression in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 93:2327-35.
104. Wicki A, Niggli V. Role of protein kinase C isoforms in locomotion of Walker 256 carcinosarcoma cells. *Int J Cancer* 1999; 81:255-61.
105. Blenis J, Erikson RL. Stimulation of ribosomal protein S6 kinase activity by pp60v-src or by serum: dissociation from phorbol ester-stimulated activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:1733-7.
106. Shah AM, Mebazaa A, Yang ZK, et al. Inhibition of myocardial crossbridge cycling by hypoxic endothelial cells: a potential mechanism for matching oxygen supply and demand? *Circ Res* 1997; 80:688-98.
107. Goldberg M, Zhang HL, Steinberg SF. Hypoxia alters the subcellular distribution of protein kinase C isoforms in neonatal rat ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1997; 99:55-61.
108. Lenter M, Uhlig H, Hamann A, et al. A monoclonal antibody against an activation epitope on mouse integrin chain beta 1 blocks adhesion of lymphocytes to the endothelial integrin alpha 6 beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:9051-5.
109. Belkin VM, Belkin AM, Koteliansky VE. Human smooth muscle VLA-1 integrin: purification, substrate specificity, localization in aorta, and expression during development. *J Cell Biol* 1990; 111:2159-70.
110. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25.
111. Clyman RI, McDonald KA, Kramer RH. Integrin receptors on aortic smooth muscle cells mediate adhesion to fibronectin, laminin, and collagen. *Circ Res* 1990; 67:175-86.
112. Gotwals PJ, Chi-Rosso G, Lindner V, et al. The alpha1beta1 integrin is expressed during neointima formation in rat arteries and mediates collagen matrix reorganization. *J Clin Invest* 1996; 97:2469-77.
113. Walton HL, Corjay MH, Mohamed SN, et al.. Hypoxia induces differential expression of the integrin receptors alpha(vbeta3) and alpha(vbeta5) in cultured human endothelial cells. *J Cell Biochem* 2000; 78:674-80.
114. Suzuma K, Takagi H, Otani A, Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:1028-35.

115. Wang HQ, Bai L, Shen BR, Yan ZQ, Jiang ZL. Coculture with endothelial cells enhances vascular smooth muscle cell adhesion and spreading via activation of beta1-integrin and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *Eur J Cell Biol* 2007; 86:51-62.
116. Zhou X, Li J, Kucik DF. The microtubule cytoskeleton participates in control of beta2 integrin avidity. *J Biol Chem* 2001; 276:44762-9.
117. Chavakis T, May AE, Preissner KT, Kanse SM. Molecular mechanisms of zinc-dependent leukocyte adhesion involving the urokinase receptor and beta2-integrins. *Blood* 1999; 93:2976-83.
118. Pampori N, Hato T, Stupack DG, et al. Mechanisms and consequences of affinity modulation of integrin alpha(V)beta(3) detected with a novel patch-engineered monovalent ligand. *J Biol Chem* 1999; 274:21609-16.
119. Jung F, Haendeler J, Hoffmann J, et al. Hypoxic induction of the hypoxia-inducible factor is mediated via the adaptor protein Shc in endothelial cells. *Circ Res* 2002; 91:38-45.
120. Mogford JE, Tawil N, Chen A, et al.. Effect of age and hypoxia on TGFbeta1 receptor expression and signal transduction in human dermal fibroblasts: impact on cell migration. *J Cell Physiol* 2002; 190:259-65.
121. Ridgway PF, Ziprin P, Peck DH, Darzi AW. Hypoxia increases reepithelialization via an alphavbeta6-dependent pathway. *Wound Repair Regen* 2005; 13:158-64.
122. Besson A, Davy A, Robbins SM, Yong VW. Differential activation of ERKs to focal adhesions by PKC epsilon is required for PMA-induced adhesion and migration of human glioma cells. *Oncogene* 2001; 20:7398-407.
123. Cowan KJ, Law DA, Phillips DR. Identification of shc as the primary protein binding to the tyrosine-phosphorylated beta 3 subunit of alpha IIb beta 3 during outside-in integrin platelet signaling. *J Biol Chem* 2000; 275:36423-9.
124. Blaschke F, Stawowy P, Kappert K, et al. Angiotensin II-augmented migration of VSMCs towards PDGF-BB involves Pyk2 and ERK 1/2 activation. *Basic Res Cardiol* 2002; 97:334-42.
125. Hasan NM, Adams GE, Joiner MC, Marshall JF, Hart IR. Hypoxia facilitates tumour cell detachment by reducing expression of surface adhesion molecules and adhesion to extracellular matrices without loss of cell viability. *Br J Cancer* 1998; 77:1799-805.
126. Das M, Bouchey DM, Moore MJ, et al. Hypoxia-induced proliferative response of vascular adventitial fibroblasts is dependent on g protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 2001; 276:15631-40.

127. Berra E, Pages G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19:139-45.
128. Namura S, Iihara K, Takami S, et al. Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:11569-74.
129. Risbud MV, Guttapalli A, Albert TJ, Shapiro IM. Hypoxia activates MAPK activity in rat nucleus pulposus cells: regulation of integrin expression and cell survival. *Spine* 2005; 30:2503-9.
130. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1998; 273:15022-9.
131. Karamsetty MR, Klinger JR, Hill NS. Evidence for the role of p38 MAP kinase in hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283:L859-66.
132. Minet E, Arnould T, Michel G, et al. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* 2000; 468:53-8.
133. Semenza GL. HIF-1: using two hands to flip the angiogenic switch. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19:59-65.
134. Baas AS, Berk BC. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; 77:29-36.
135. Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, et al. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 2001; 89:47-54.
136. Jin N, Hatton N, Swartz DR, et al. Hypoxia activates jun-N-terminal kinase, extracellular signal-regulated protein kinase, and p38 kinase in pulmonary arteries. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:593-601.
137. Li Z, Xi X, Du X. A mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway in the activation of platelet integrin alpha IIb beta3. *J Biol Chem* 2001; 276:42226-32.
138. Zhang Z, Vuori K, Wang H, Reed JC, Ruoslahti E. Integrin activation by R-ras. *Cell* 1996; 85:61-9.
139. Rigot V, Lehmann M, Andre F, et al. Integrin ligation and PKC activation are required for migration of colon carcinoma cells. *J Cell Sci* 1998; 111:3119-27.

140. Zhang HY, McPherson BC, Liu H, et al. H₂O₂ opens mitochondrial K(ATP) channels and inhibits GABA receptors via protein kinase C-epsilon in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H1395-403.
141. Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* 2002; 277:11111-11116.
142. Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:940-8.
143. Touyz RM, Cruzado M, Tabet F, Yao G, Salomon S, Schiffrin EL. Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81:159-67.
144. Stawowy P, Margeta C, Blaschke F, et al. Protein kinase C epsilon mediates angiotensin II-induced activation of beta1-integrins in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2005; 67:50-9.
145. Friedrich EB, Clever YP, Wassmann S, et al. Role of integrin-linked kinase in vascular smooth muscle cells: regulation by statins and angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349:883-9.

7. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|---|
| ARG | Arginin |
| AS | Aminosäure |
| ASP | Asparagin |
| AVSMC | aortal vascular smooth muscle cell, aortale glatte Gefäßmuskelzelle |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| C | Celsius |
| CO₂ | Kohlendioxid |
| DEPC | Diethylprocarbonat |
| DFO | Deferoxamine |
| DMEM | Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium |
| DNTP | Deoxynukleotidtriphosphat |
| ERK | extracellular regulated kinase, extrazellulär regulierte Kinase |
| FAK | focal adhesion kinase, fokale Adhäsionskinase |
| FACS | fluorescence absorbent cell sorting, Durchflußzytometrie |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| FKS | Fetales Kälberserum |

| | |
|-------------------------|--|
| GLY | Glycin |
| HCl | Salzsäure |
| HIASMC | human arterial vascular smooth muscle cell, humane arterielle glatte Gefäßmuskelzelle |
| HIF | hypoxia inducible factor, durch Hypoxie induzierbarer Faktor |
| HIVSMC | human iliacal vascular smooth muscle cell, humane venöse glatte Gefäßmuskelzelle |
| HUVEC | uman umbilical vein endothelial cell, humane Endothelzelle der Umbilikalvene |
| HUVSMC | human umbilical vascular smooth muscle cell, humane umbilikale glatte Gefäßmuskelzelle |
| hVSMC | human vascular smooth muscle cell, humane glatte Gefäßmuskelzelle |
| IgG | Immunglobulin der Klasse G |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kDa | KiloDalton, atomare Masseneinheit (1 Da = 1/12 der Masse des Kohlenstoffatoms) |
| L | Liter |
| MAP-Kinase | mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| MgCl₂ | Magnesiumchlorid |
| MEK | Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kinase |
| MEKK | MEK-Kinase |
| MEKKK | MEK-Kinase-Kinase |
| MIDAS | metal ion dependent adhesion site, Metallionen abhängige Adhäsionsstelle |

| | |
|----------------------|--|
| Min | Minuten |
| mM | millimolar |
| O₂ | Sauerstoff |
| PBS | phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion |
| PDGF | platelet derived growth factor |
| PKC | Proteinkinase C |
| PMA | Phorbol 12- Myristate 13-Azetat |
| RNA | Ribonuclein acid, Ribonukleinsäure |
| Rt | reverse Transkriptase |
| rVSMC | rat vascular smooth muscle cell, glatte Gefäßmuskelzelle der Ratte |
| SD | standard deviation, Standardabweichung |
| SDS | sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat |
| VEGF | vascular endothelial growth factor, vaskulärer Wachstumsfaktor des Endothels |
| VSMC | vascular smooth muscle cell |

8. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. Kristof Graf für die Vergabe des Themas, die kontinuierliche Unterstützung und die inspirierende Betreuung sowie seine spontane Hilfsbereitschaft herzlich danken.

Herrn Dr. med. Florian Blaschke danke ich für seine zahlreichen technischen und wissenschaftlichen Hilfestellungen, die die Arbeit sehr vorangetrieben haben, sowie seine aufmunternde, motivierende Unterstützung und seinen feinen Humor. Ich danke meinem ehemaligen Mitdoktoranden Dr. med. Kai Kappert, ohne den ich die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Graf nicht kennengelernt hätte. Er war mir auch durch seine genauen Analysen und technischen Rat und seine Freundschaft in schwierigen Arbeitsphasen eine große Hilfe. Seine Schnelligkeit und Präzision bei der Korrektur dieser Arbeit haben mich sehr beeindruckt.

Ohne die großzügigen finanziellen Hilfen meiner Eltern wäre die Realisierung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ich danke Ihnen sehr für ihre Unterstützung.

Meiner Schwester Ulrike danke ich für ihre logistische und finanzielle Hilfe in einer entscheidenden Arbeitsphase. Die Fertigstellung der Arbeit wäre ohne sie nicht möglich gewesen.

Ich bedanke mich außerdem herzlich bei

Frau Brigitte Wollert-Wulff, Frau Heike Kallisch und Frau Chantel Spencer für die Hilfe in labortechnischen, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Michael Gräfe, Herrn Dr. med. Gunther Schmidt und Herrn Dr. med. Karsten Willam für ihre unkomplizierte Hilfe in technischen Fragen.

9. Lebenslauf

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

10. Eidesstattliche Erklärung

Belehrt über die Strafbarkeit einer auch nur fahrlässig falschen Versicherung an Eides Statt versichere ich an Eides Statt:

Ich versichere hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät Charité vorgelegte Dissertationsschrift:

„Einfluss von Hypoxie und Deferoxamine auf die Beta-1-Integrin-abhängigen Funktionen der Gefäßmuskelzelle“

selbständig angefertigt habe, die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer oder eigener Arbeiten darstellt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.

Ich habe und hatte bisher kein Promotionsverfahren an anderen Stellen beantragt.

Mir ist bewußt, dass eine nicht wahrheitsgemäße eidesstattliche Versicherung erhebliche strafrechtliche Konsequenzen für mich haben kann.

Berlin, den 12.7.2008

Oliver Hintz

