

Aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin  
Klinik für Innere Medizin

DISSERTATION

Einfluss von Statinen auf Beta-1-Integrin-vermittelte Zell-Matrix-  
Interaktion zwischen vaskulären glatten Muskelzellen und  
Kollagen I

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johanna Bokemeyer  
aus Göttingen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. Graf  
2. Prof. Dr. med. W. Haverkamp  
3. Prof. Dr. rer. nat. H. Morawietz

Datum der Promotion: 18.09.2009

## Inhaltsverzeichnis

1.	<b>Einleitung</b>	3
1.1	Der klinische Nutzen von HMG-CoA-Reduktasehemmern in der kardiovaskulären Primär- und Sekundärprävention	3
1.2	Direkte vaskuläre Effekte von HMG-CoA-Reduktasehemmern	4
1.3	Cholesterolumabhängige Effekte von HMG-CoA-Reduktasehemmern - die Rolle von Mevalonat, Isoprenoiden und isoprenylierten Proteinen der Ras- und Rho-Familie	5
1.4	Die Bedeutung des Zytoskeletts für Rho-abhängige Zellfunktionen	9
1.5	Integrinvermittelte Adhäsion von Zellen an der extrazellulären Matrix: Ein Stimulus für Zytoskelettveränderungen und Rho-abhängige Zellfunktionen	10
1.6	Thema der vorliegenden Arbeit	13
2.	<b>Material und Methoden</b>	14
2.1	Matrixkomponenten, Peptide, Antikörper und Antagonisten	14
2.2	Zellkultur	14
2.3	Adhäsion	15
2.4	Migration	15
2.5	Durchflusszytometrie	17
2.6	RT-PCR	17
2.7	Statistische Auswertung	18
3.	<b>Ergebnisse</b>	19
3.1	Ergebnisse der Adhäsionsversuche	19
3.1.1	Adhäsion von VSMCs an Kollagen I nach Stimulation mit Atorvastatin	19
3.1.2	Adhäsion von VSMCs an Kollagen I nach Stimulation mit Pravastatin	21
3.1.3	Adhäsion von VSMCs an Kollagen I nach Atorvastatin-Stimulation in Abhängigkeit von der Kollagenkonzentration	22
3.1.4	Adhäsion von VSMCs an Kollagen I nach Ko-Stimulation mit HMG-CoA-Reduktasehemmern und Mevalonat oder Geranyl-Geraniol	23

3.2	Ergebnisse der Migrationsversuche	25
3.2.1	Migration glatter Gefäßmuskelzellen (HSMCs) nach Vorbehandlung mit Integrin- Antikörpern	25
3.2.2	Migration glatter Gefäßmuskelzellen (HSMCs) nach Vorbehandlung mit Atorvastatin oder Pravastatin	27
3.3	Ergebnisse der Durchflusszytometrie	28
3.4	Ergebnisse der RT-PCR	29
4.	<b>Diskussion</b>	31
5.	<b>Zusammenfassung</b>	41
6.	<b>Literaturverzeichnis</b>	43
7.	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	56
8.	<b>Danksagung</b>	58
9.	<b>Lebenslauf</b>	59
10.	<b>Publikation</b>	61
11.	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	62

## 1. Einleitung

### 1.1 Der klinische Nutzen von HMG-CoA-Reduktasehemmern in der kardiovaskulären Primär- und Sekundärprävention

Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer (CSE-Hemmer) oder „Statine“ hemmen kompetitiv das Schlüsselenzym der Cholesterin- und Isoprenoidbiosynthese, die HMG-CoA-Reduktase, welche die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat katalysiert (1). Dies führt über die Abnahme der intrazellulären Cholesterinkonzentration in den Hepatozyten sowie über die daraufhin gesteigerte Expression von LDL-Rezeptoren und die vermehrte Aufnahme von LDL-Cholesterin via Endozytose zu einer hocheffektiven Senkung der Plasmacholesterinkonzentration (2). Das Ausmaß der erzielten LDL-Cholesterinsenkung durch Behandlung mit verschiedenen Statinen betrug in Studien bis zu 50 % (3).

Der klinische Nutzen einer Therapie mit Statinen im Rahmen der kardiovaskulären Primär- und Sekundärprävention konnte in großen prospektiven klinischen Studien wie WOSCOPS, TexCAPS, 4S, CARE und LIPID vielfach belegt werden. Diese Studien zeigten einen signifikanten Rückgang koronarer Ereignisse und koronar bedingter Todesfälle, sowie eine Reduktion der Gesamtmortalität, sowohl bei Patienten mit initial erhöhtem, als auch mit initial normalem Plasmacholesterin (4, 5, 6, 7, 8).

Eine enge Beziehung zwischen der Hypercholesterinämie und der Ausbildung einer koronaren Herzkrankheit bzw. dem Auftreten koronarer Ereignisse gilt als gesichert und wurde bereits in der prospektiven Framingham-Studie (9) und dem späteren Multiple Risk Factor Intervention Trial nachgewiesen. Nach Behandlung der Risikofaktoren in der Interventionsgruppe konnten hier die Koronar- und die Gesamtmortalität signifikant gesenkt werden. Bei nahezu 70 % der koronarbedingten Todesfälle war ein erhöhtes Gesamtcholesterin nachweisbar (10).

Es ist bekannt, dass ein wesentlicher Teil des positiven Statin-Effektes auf die Senkung des LDL-Cholesterinspiegels zurückzuführen ist. Bemerkenswert ist jedoch die Tatsache, dass in Subgruppenanalysen der WOSCOPS und der CARE-Studie ein signifikant niedrigeres Risiko koronarer Ereignisse in der statinbehandelten Gruppe als in der Placebogruppe, trotz in den untersuchten Subgruppen vergleichbarer Plasmacholesterinspiegel, dokumentiert werden konnte. Zudem zeigten Metaanalysen von Studien mit verschiedenen Lipidsenkern, dass das Infarktrisiko in der mit Statinen behandelten Personengruppe, bei vergleichbarer Cholesterinsenkung in beiden

Gruppen, signifikant niedriger war als unter Behandlung mit anderen Cholesterolenkern (11). Des Weiteren schien der in der MIRACL-Studie beobachtete positive Statin-Effekt, mit nachweislichem Rückgang ischämischer Ereignisse unter Statintherapie bereits innerhalb weniger Wochen nach Auftreten eines akuten Koronarsyndroms, nicht ausreichend durch eine Abnahme des Cholesterolspiegels erklärbar (12). Zudem wurde der Stenosegrad atherosklerotischer Läsionen unter Therapie mit Statinen, angiographischen Studien zufolge, nur geringfügig vermindert (13, 14, 15), sodass die alleinige Reduktion des LDL-Cholesterols und dessen Einlagerung in der Gefäßwand, den Rückgang kardiovaskulärer Ereignisse nicht ausreichend zu begründen schien.

Die genannten Beobachtungen verstärkten die Annahme, dass der Wirkung von HMG-CoA-Reduktasehemmern zusätzlich cholesterolunabhängige Mechanismen zugrunde liegen.

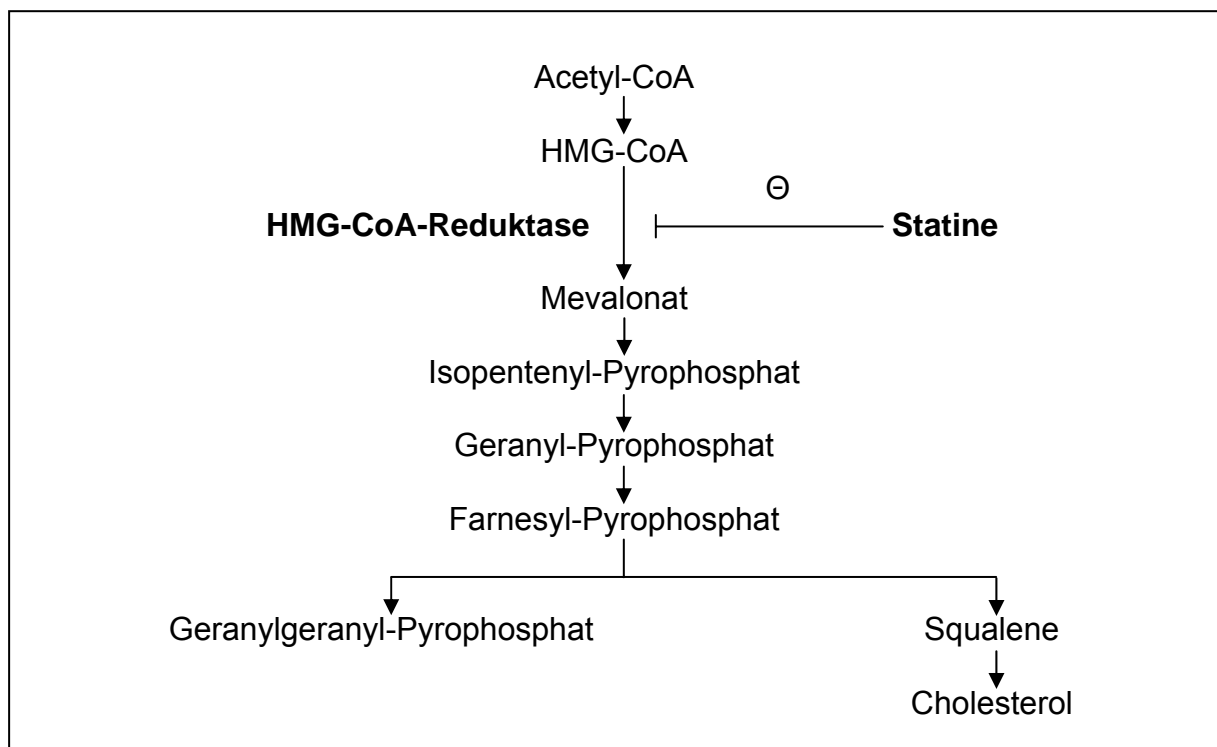
### 1.2 Direkte vaskuläre Effekte von HMG-CoA-Reduktasehemmern

Die Atherogenese wird nach heutigem Kenntnisstand als multifaktorielles Geschehen angesehen, an welchem zahlreiche zelluläre und extrazelluläre Faktoren beteiligt sind (16). Neben dem schädigenden Einfluss von LDL-Cholesterol, das nach Modifikation und Oxidation über den Scavenger-Pathway von Makrophagen und glatten Muskelzellen unabhängig vom LDL-Rezeptor aufgenommen und unter Ausbildung von lipidhaltigen Schaumzellen im subendothelialen Raum angehäuft wird, kommen der Schädigung und Funktionsänderung des Gefäßendothels, im Wesentlichen durch eine verminderte Bildung und Freisetzung von Nitritoxid (NO) und eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen (z. B. VCAM 1, P-Selektin, ICAM 1), sowie der Adhäsion von Leukozyten und der Aggregation von Thrombozyten und deren Freisetzung promotischer Substanzen (z. B. PDGF) eine entscheidende Bedeutung zu (16,17). Des Weiteren wird die Pathogenese der Atherosklerose maßgeblich durch die Migration glatter Muskelzellen von der Gefäßmedia in die Intima und die Proliferation dieser Zellen im subendothelialen Raum bestimmt (16, 18). Im fortgeschrittenen Stadium ist die Erkrankung gekennzeichnet durch eine Verdickung der Intima und durch die Ausbildung rupturgefährdeter Atherome und wird von einer chronischen Entzündungsreaktion begleitet (19).

In zahlreichen experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass der vaskuloprotektive Effekt von HMG-CoA-Reduktasehemmern durch ihren unmittelbaren, zum Teil cholesterolumabhängigen Einfluss auf Monozyten / Makrophagen, T-Lymphozyten, die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, die Reaktivität von Thrombozyten und auf die Endothelzellfunktion vermittelt wird und als maßgeblicher Bestandteil der antiatherogenen und Plaque stabilisierenden Wirkung dieser Substanzklasse anzusehen ist (11, 20).

### 1.3 Cholesterolumabhängige Effekte von HMG-CoA-Reduktasehemmern – die Rolle von Mevalonat, Isoprenoiden und isoprenylierten G-Proteinen der Ras- und Rho-Familie

Ein Großteil der cholesterolumabhängigen Statin-Effekte auf die Gefäßwand, subsummiert unter dem Begriff „pleiotrope Effekte“, wird auf die unter Statin-Therapie verminderte Bildung von Isoprenoiden zurückgeführt, welche Zwischenprodukte auf dem Weg der Steroidbiosynthese aus Mevalonat darstellen (21).

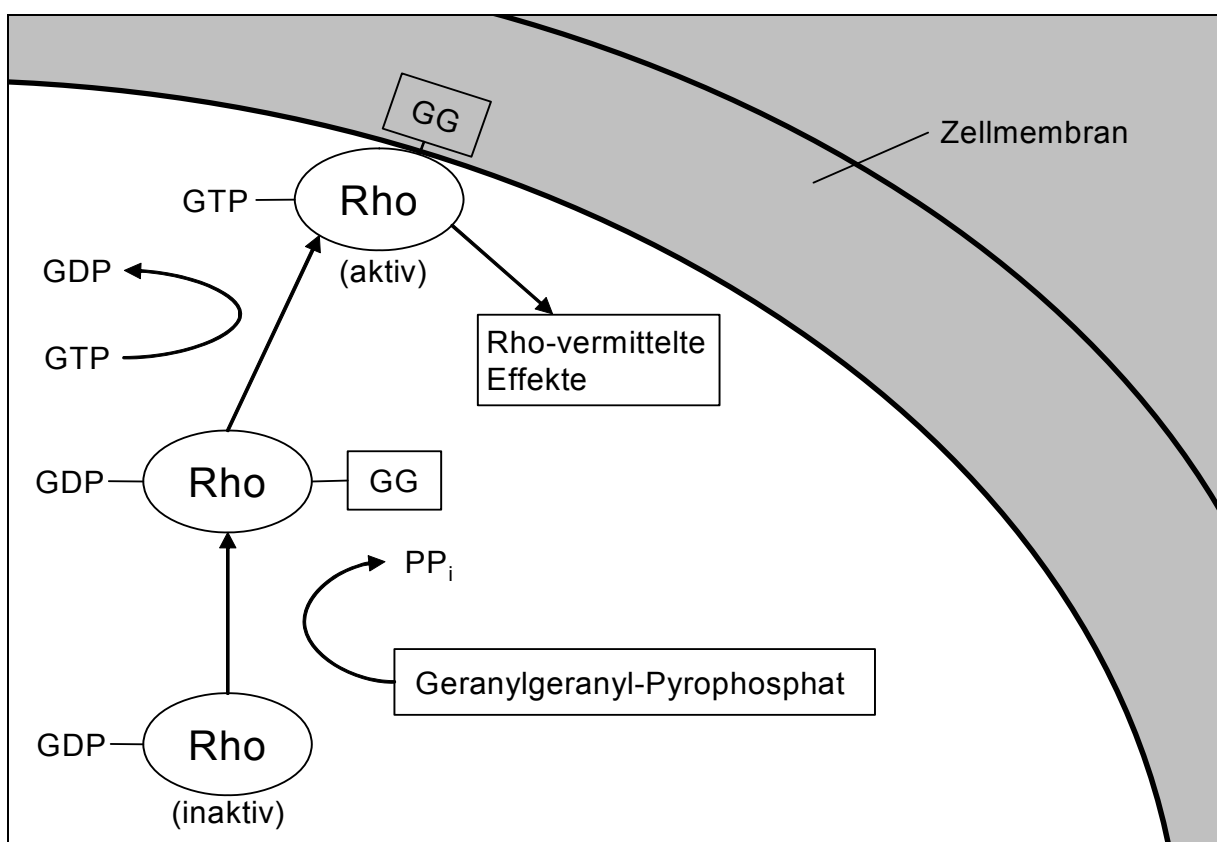


**Abbildung 1:** Die Cholesterol- und Isoprenoidbiosynthese – Hemmung der HMG-CoA-Reduktase durch Statine. Nach: Takemoto M und Liao JK (11).

Isoprenoide, wie zum Beispiel Farnesyl-Pyrophosphat (F-PP) und Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GG-PP), sind entscheidend an der Zellproliferation und anderen wichtigen Zellfunktionen beteiligt (20, 21, 22, 23).

Die Wirkung dieser Isoprenoidderivate wird hierbei insbesondere mit der Isoprenylierung und einer hierdurch verursachten Translokation und Aktivierung kleiner GTP-bindender Proteine erklärt (21, 22, 23, 24, 25, 26). Die Proteine werden durch Isoprenylierung posttranslational modifiziert und gelangen hierdurch vom Zytoplasma zur Zellmembran, wo sie im aktiven, GTP-gebundenen Zustand an zahlreichen Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind und Zellfunktionen wie Adhäsion, Struktur des Zytoskeletts, Kontraktilität, Motilität, Proliferation und Sekretion beeinflussen können (24, 25). Ras-Proteine bilden die Superfamilie dieser sogenannten „GTPasen“, wohingegen Rho-Proteine eine Unterfamilie darstellen, die ihrerseits wiederum in Rho, Rac und Cdc42 unterteilt wird (24).

Die folgende Abbildung zeigt schematisch den Prozess der Rho-Aktivierung durch das Isoprenoidderivat Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat.



**Abbildung 2:** Aktivierung und Membrantranslokation von Rho durch Geranylgeranyl-Pyrophosphat. Nach: Takemoto M und Liao JK (11).



Vielfach konnte in experimentellen Studien ein Zusammenhang zwischen der statininduzierten Hemmung der Isoprenoidbiosynthese, einer hierdurch verminderten Aktivierung von Proteinen der Rho-Familie und klinisch relevanten, direkt vaskuloprotektiven Effekten belegt werden, wie im Folgenden anhand von vier Beispielen aufgeführt wird.

1.) Die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen gilt als ein Schlüsselereignis im Prozess der Atherogenese, einschließlich der Bildung von Restenosen nach der Durchführung von Angioplastien und der Entwicklung von Bypass-Stenosen (16, 18, 27, 28, 29). Vielfach konnte belegt werden, dass Statine die Migration und die Proliferation glatter Muskelzellen durch Hemmung der Isoprenoidbiosynthese inhibieren (20, 30, 31, 32, 33). Laufs et al. konnten zeigen, dass dieser antiproliferative Effekt auf eine verminderte Isoprenylierung und Aktivierung von Rho durch Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat zurückzuführen ist (23). Die fehlende Rho-Aktivierung resultierte in einer Blockade der Zellzyklusprogression von der G1- zur S-Phase und einer hierdurch verursachten Abnahme der Wachstumsfaktor-induzierten DNA-Synthese (23).

2.) Ein weiterer Statin-Effekt erwies sich als zum Teil cholesterolumabhängig, jedoch als abhängig von der Hemmung der Isoprenoidbiosynthese: die vermehrte Bereitstellung des von Endothelzellen produzierten, vasoprotektiven Stickstoffmonoxids (NO), welchem neben vasodilatatorischen auch zahlreiche andere antiatherogene Eigenschaften, wie die Hemmung der Leukozytenmigration, der Thrombozytenaggregation und der Proliferation glatter Muskelzellen zugesprochen werden (11). Als zugrunde liegender Wirkmechanismus der cholesterolumabhängig vermehrten NO-Bereitstellung wurde von Laufs et al. eine Expressionssteigerung der endothelialen Stickstoffmonoxid (NO)-Synthetase (eNOS) nachgewiesen (26). Dieser Effekt war nach Zugabe des Isoprenoidderivates Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat reversibel, was vermuten ließ, dass die vermehrte Expression von eNOS Folge einer statinbedingten Hemmung von Rho durch dessen verminderte Isoprenylierung sein könnte. Dies bestätigte sich in einer weiteren Studie, in der Laufs und Liao eine Rho-Abhängigkeit der eNOS-mRNA-Stabilität nachweisen konnten (22).

3.) Als antiatherogen in mehrfacher Hinsicht kann auch die unter Statin-Einfluss verminderte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) angesehen werden, unter

anderem aufgrund einer hierdurch gesteigerte Bioverfügbarkeit von NO (11, 34), welches durch reaktive Sauerstoff-Spezies inaktiviert wird (35).

Für die verminderte Bildung des oxidativ wirksamen Superoxid-Anions konnten mehrere Untersucher eine statininduzierte Inaktivierung von Rac 1, einem Mitglied der isoprenoidabhängigen Rho-GTPasen, verantwortlich machen (36, 37).

4.) Die Plaqueruptur fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen durch Schädigung der fibrösen Kappe gilt als Hauptursache des akuten Koronarsyndroms (38, 39). Die Stabilität der fibrösen Kappe wird im Wesentlichen durch das Vorhandensein von Kollagenfasern und kollagensynthetisierenden glatten Muskelzellen gewährleistet (40, 41), wohingegen die Akkumulation von Makrophagen zu einer Destabilisierung zu führen scheint, unter anderem durch Sekretion proteolytischer Enzyme, wie zum Beispiel Kollagenasen aus der Familie der Matrix-Metalloproteinasen (42, 43, 44). Weiterhin scheint der hohe Lipidgehalt im Kern fortgeschrittener Atherome bei der Plaqueruptur von Bedeutung zu sein (40).

Als Beispiele für eine potentiell Plaque stabilisierende, cholesterolumabhängige Wirkung von HMG-CoA-Reduktasehemmern konnten eine Hemmung der Matrix-Metalloproteinase-9-Produktion (45, 46, 47) sowie eine Hemmung der Cholesterolaufnahme durch Makrophagen nachgewiesen werden (48). Auch in diesem Fall waren die beobachteten Statin-Effekte reversibel nach Zugabe von Mevalonat bzw. Isoprenoidderivaten wie Geranylgeranyl-Pyrophosphat.

Bei der Untersuchung von Carotis-Plaques statinbehandelter Patienten, die bei symptomatischen Stenosen einer Endarteriektomie unterzogen worden waren, wurde die beobachtete, potenziell stabilisierende Veränderung der Plaquezusammensetzung letztlich auf ein komplexes Zusammenspiel cholesterolumabhängiger, aber auch isoprenoidabhängiger Mechanismen zurückgeführt (49).

#### 1.4 Die Bedeutung des Zytoskeletts für Rho-abhängige Zellfunktionen

Zahlreiche Zellfunktionen, die durch Mitglieder der Rho-Familie vermittelt werden, sind durch ihren Einfluss auf Struktur- und Funktion des Aktin-Zytoskeletts zu erklären, welches von maßgeblicher Bedeutung für die Gestalt, die Ausrichtung, die Adhäsionsfähigkeit, die Kontraktilität, die Migration und die Teilung von Zellen ist (25). Zum Zeitpunkt der Erstentdeckung der Rho-GTPasen, Anfang der neunzehnhundertneunziger Jahre, wurden Versuche mit Fibroblasten durchgeführt, deren Stimulation mit löslichen externen Rezeptorliganden (z. B. PDGF) via Aktivierung von Rho-GTPasen in der Ausbildung charakteristischer zytoskelettaler Strukturen resultierte (25). Ansammlungen von kontraktilen Aktin-Myosin-Filamenten (Stressfasern), assoziierte Adhäsionskomplexe, aktinreiche, blattartige Membranvorwölbungen, sogenannte „Lamellipodien“ und schmale, ebenfalls aktinhaltige Ausläufer in der Peripherie der Zellen, sogenannte „Filopodien“, waren in Abhängigkeit von der Aktivierung verschiedener Rho-Familien-Mitglieder sichtbar. Weitere Untersuchungen machten deutlich, welche immense Bedeutung diese Strukturveränderungen für die Funktion der Zellen besitzen, und dass sie unter Einfluss externer Stimuli nicht nur in Fibroblasten, sondern auch in zahlreichen anderen Zelltypen ausgebildet werden (25).

Ein gut untersuchtes Beispiel ist der Prozess der Migration, der unter anderem bei der Organentwicklung, bei Wundheilungsprozessen, bei Immunantworten und nicht zuletzt auch bei pathophysiologischen Vorgängen im Rahmen der Atherosklerose eine Rolle spielt. Auf zellulärer Ebene konnte nachgewiesen werden, dass während der Migration zunächst eine lokale Vorwölbung und verstärkte Bindung im anführenden Teil der Zelle entwickelt wird (Filopodien, Lamellipodien, Adhäsionskomplexe), gefolgt von einer Kontraktion des Zellkörpers (Stressfasern) und einer Lösung von Bindungsstellen am Ende der Zelle (50). Erleichtert wurde die Untersuchung dieses Vorgangs durch die Möglichkeit der Visualisierung von Migrationsprozessen in vivo mittels fluoreszenzmarkierter Zellen (51). Das erforderliche Wechselspiel von Adhäsion, Kontraktion und Lösung setzt eine ständige Neuorganisation zytoskelettaler Strukturen voraus, woran die verschiedenen Rho-Proteine durch Änderung ihres Aktivitätszustand maßgeblich beteiligt sind (50).

Die vielen zellulären Funktionen, die von Rho-GTPasen mitreguliert werden, bedürfen zudem einer engen Interaktion mit zytoskelettalen Strukturproteinen und mit zytoskelettassoziierten und anderen Enzymen, sodass in der Regel eine komplexe Signaltransduktionskaskade für die gewünschte zelluläre Antwort aktiviert werden muss (25, 50). Als eines von vielen Beispielen konnte gezeigt werden, dass eine Rho-assoziierte Proteinkinase die Empfindlichkeit glatter Gefäßmuskelzellen gegenüber Calcium steigert, sowohl bei arteriellem Hypertonus (52) als auch bei Koronarspasmen (53).

Als externe Trigger der Rho-abhängigen Signaltransduktionswege und Zellstrukturveränderungen können unter anderem Wachstumsfaktoren, Zytokine und G-Protein-gebundene Rezeptor-Liganden fungieren, als gleichberechtigter Stimulus gilt jedoch auch die Bindung von Zellen an Proteine der extrazellulären Matrix (25, 54).

### 1.5 Integrinvermittelte Adhäsion von Zellen an der extrazellulären Matrix: Ein Stimulus für Zytoskelettveränderungen und Rho-abhängige Zellfunktionen

Die Adhäsion von Zellen an extrazelluläre Matrixproteine durch Rezeptoren der Integrin-Familie gilt als entscheidender Trigger, um den Prozess der zum Teil Rho-abhängigen Veränderungen des Zytoskeletts und der Signaltransduktion zu induzieren (55).

Integrine sind heterodimere, transmembranäre Zelloberflächen-Rezeptoren. Sie vermitteln die Bindung einer Vielzahl von Zellen, bevorzugt an Proteine der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel an Kollagen, Fibronectin, Laminin und Vitronectin (56, 57, 58). Darüber hinaus können sie Zell-Zell-Kontakte herstellen und, seltener, an lösliche Substanzen binden (59). Integrine setzen sich aus je einer von mehreren bekannten  $\alpha$ -Einheiten und einer von ebenfalls mehreren  $\beta$ -Einheiten zusammen und bilden so den funktionsfähigen Rezeptor, dessen extrazelluläre Domäne über eine Ligandenbindungstelle die Erkennung und Bindung des jeweiligen Liganden gewährleistet. Jedes  $\alpha\beta$ -Heterodimer besitzt eigene Bindungs- und Signaleigenschaften. Viele Rezeptoren können an mehr als ein Matrixprotein binden, und die meisten Matrixproteine wiederum können von mehreren Integrinen erkannt und gebunden werden. Durch ihren transmembranären Verlauf und das Vorhandensein einer kurzen, zytoplasmatischen Domäne sind Integrine in der Lage, die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett im Inneren der Zelle zu verbinden (58). Aufgrund dieser

Fähigkeit dienen sie neben dem Strukturerhalt von Gewebeverbänden und der Verankerung des Zytoskeletts an der Zellmembran auch der Signaltransduktion über die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signaltransduktionswege. Hierzu zählen zum Beispiel die Aktivierung von Tyrosinkinase wie der „focal adhesion kinase“, FAK, sowie die Aktivierung von Mitgliedern der Serin-Threonin-Kinasen wie der Protein Kinase C, PKC, und der „mitogen-activated protein kinase“, MAP-Kinase (59, 60). Der Vorgang, durch integrinvermittelte Bindung extrazellulärer Liganden intrazelluläre Signaltransduktionswege zu aktivieren, wird als „outside-in signaling“ bezeichnet und setzt die enge Assoziation und Interaktion der zytoplasmatischen Rezeptoranteile mit strukturellen Proteinen des Zytoskeletts, Aktinfilamenten und Signal-Proteinen voraus. Räumlich wird diese Interaktion durch die Ausbildung großer Proteinkomplexe im Bereich der Zellmembran begünstigt, die als fokale Adhäsionskomplexe sichtbar werden (61).

Die Fähigkeit der Integrin-Rezeptoren, je nach Organsystem und Situation zu unterschiedlichen Funktionen beizutragen, ergibt sich unter anderem aus der Tatsache, dass 1.) die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und anderer möglicher Liganden variiert, dass 2.) verschiedene Zelltypen in unterschiedlichem Ausmaß an physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt sind und Zellen in der Regel bevorzugt bestimmte Integrine exprimieren und dass 3.) der Aktivitätszustand und / oder die Expression der Integrin-Rezeptoren, je nach Situation und Gewebe, gesteigert oder vermindert sein können, also einem dynamischen Prozess unterliegen.

Zu möglichen wichtigen Zellfunktionen, die durch die Integrin-Matrix-Zytoskelett-Interaktion beeinflusst werden, zählen neben der Adhäsion die Migration, die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung (59, 60).

Die Ähnlichkeit der von Integrinen ausgelösten Zellstrukturveränderungen, Signaltransduktionswege und zellulären Antworten mit denen von Wachstumsfaktorrezeptoren oder Zytokinrezeptoren ist bemerkenswert (55, 59). Ein zentrales Bindeglied, das die verwandten und oft synergistischen Funktionen der unterschiedlichen Rezeptoren erklärt, ist Rho. Clark et al. konnten 1998 in umfangreichen Untersuchungen mit Swiss 3T3-Fibroblasten nachweisen, dass die integrinvermittelte Bindung der Zellen an das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin zu Strukturveränderungen des Zytoskeletts und der Zellmorphologie führten, die maßgeblich von einer Rho-GTPasen Aktivierung abhängig waren. Begleitend zu den

beobachteten Strukturveränderungen - hierzu zählten die Ausbildung von fokalen Adhäsionskomplexen auf der Zelloberfläche, die Ausdehnung und Streckung der Zellen (Spreading), das Sichtbarwerden prominenter Aktin-Filamente und die Ausbildung punktueller Membranvorwölbungen – konnte eine Aktivierung mehrerer verantwortlicher Enzyme nachgewiesen werden. Auch hier war bei der Mehrzahl der untersuchten Enzymaktivierungen eine Abhängigkeit von Familienmitgliedern der Rho-GTPasen (Rho, Rac und Cdc42) festzustellen. Eine Abhängigkeit oder Beteiligung von diesen Rho-GTPasen zeigte sich zum Beispiel bei der Tyrosin-Phosphorylierung der Kinasen FAK, AKT und der MAP-Kinase Erk2 (62).

## 1.6 Thema der vorliegenden Arbeit

Die enge Verbindung von integrinvermittelten Zell-Matrix-Interaktionen mit Proteinen der Rho-Familie sowie die mögliche pathophysiologische Relevanz dieser Beziehung für den Prozess der Atherogenese und der fortgeschrittenen Atherosklerose, ist Gegenstand intensiver Forschung. HMG-CoA-Reduktasehemmer vermindern die Aktivierung von Rho-GTPasen via Hemmung der Isoprenoidbiosynthese, und ein Großteil ihrer pleiotropen Effekte wird auf diesen Mechanismus zurückgeführt.

Vaskulären, glatten Muskelzellen und deren integrinvermittelter Interaktion mit Proteinen der extrazellulären Matrix kommt bei der Atherogenese eine maßgebliche Bedeutung zu. Durch ihre Migration von der Gefäßmedia in die Gefäßintima sind sie entscheidend an der Ausbildung atherosklerotischer Läsionen sowie an der Restenosierung nach Koronarinterventionen beteiligt und tragen im Stadium fortgeschrittener Atherome zur Stabilität der fibrösen Kappe bei. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die HMG-CoA-Reduktasehemmer Atorvastatin und Pravastatin das Adhäsions- und Migrationsverhalten kultivierter, glatter Gefäßmuskelzellen bei Kontakt mit Kollagen I, dem Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix in atherosklerotischen Läsionen, verändern. Weiterhin wurden gezielt die Funktion und die Expression von den  $\beta_1$ -Integrin-Rezeptoren analysiert, welche die Bindung glatter Gefäßmuskelzellen an Kollagen I und andere Matrixproteine vermitteln.

Es sollte weiterhin festgestellt werden, ob eventuell zu beobachtende Veränderungen der Zell-Matrix-Interaktion unter Behandlung mit HMG-CoA-Reduktasehemmern, auf eine Hemmung der Isoprenoidbiosynthese und die daraus folgende Rho-Inaktivierung zurückzuführen sind. Für die Antagonisierung des Statin-Effekts wurden der Isoprenoidvorläufer Mevalonat oder das Isoprenoid Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat eingesetzt.

## **2. Material und Methoden**

### 2.1 Matrixkomponenten, Peptide, Antikörper und Antagonisten

Dermales, humanes Typ I Kollagen wurde von Vitrogen bezogen. Der Antikörper P5D2 gegen  $\beta_1$ -Integrin (63), clone P4GII, ein  $\beta_1$ -Integrin-stimulierender Antikörper, und der Antikörper BIIG2 gegen  $\alpha_5$ -Integrin (64) stammten von der „Developmental Studies Hybridoma Bank“ der Universität von Iowa. Ein monoklonaler Antikörper gegen CD49A ( $\alpha_1$ -Integrin), clone HP2B6, wurde von Immunotech, der Antikörper gegen CD49B ( $\alpha_2$ -Integrin) wurde von Pharmingen bezogen. Als Kontrolle wurde ein monoklonaler, nichtspezifischer Maus-IgG-Antikörper von Sigma verwendet. Die synthetischen Peptide GRGESP und GRGDSP stammten von Bachem, das rekombinante PDGF-BB von Biosource. Atorvastatin wurde von Gödecke, Freiburg, und Pravastatin von Merck, Sharp & Dome, München, bezogen.

### 2.2 Zellkultur

Humane, glatte Gefäßmuskelzellen (HSMCs) wurden aus Iliacalarterien nach der von Ross und Kariya beschriebenen Explantationstechnik gewonnen (65, 66). Das Gewebe wurde von Organspendern des Leber-Transplantationsprogramms der Charité, Campus Rudolf-Virchow-Klinikum, nach Zustimmung durch die zuständige Ethikkommission, entnommen. Aortale glatte Muskelzellen von Ratten (RASMCs) wurden ebenfalls nach der Präparationstechnik von Ross und Kariya aus Rattenaorta gewonnen. Die Zellen wurden bei 37 °C in Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit einem Anteil von 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 15 mM HEPES-Puffer, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 200 mmol/l L-Glutamin kultiviert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte jeweils nach circa drei Tagen. Die glatten Muskelzellen wurden durch ihre charakteristische Morphologie und durch den immunzytochemischen Nachweis von  $\alpha$ -smooth-muscle-actin identifiziert. Nach Vermehrung der glatten Muskelzellen während der Kultivierung bis zur Konfluenz, wurden die Zellen passagiert, d. h. auf neue Schalen im Verhältnis 1:3 bis 1:4 umgesetzt. Die Untersuchungen wurden mit subkonfluenten Zellen der Passagen 3 bis 7 durchgeführt, nach vorheriger Synchronisierung durch einen 24-stündigen Serumentzug.



### 2.3 Adhäsion

Die Effizienz der Zelladhäsion wurde durch die Quantifizierung der an der verwendeten Matrix adhären den glatten Muskelzellen bestimmt, gemäß der von Liaw beschriebenen Methode (66, 67). Jeweils 100 µl Kollagen wurden in die Vertiefungen von 96-Kammer-Versuchsplatten (Falcon Nr. 353075) gegeben und über Nacht bei 4 °C gelagert. Im Anschluß daran wurden die vorbereiteten Kammern mit 10 mg/ml bovinem Serumalbumin (BSA) bei 37 °C für 60 Minuten geblockt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die für die Adhäsionsversuche verwendeten Zellen wurden durch kurzes Trypsinisieren (0,25 % Trypsin in PBS) von den Zellkulturschalen abgelöst und nach Unterbrechung des Trypsinisierungs-Prozesses mittels Zugabe von antitrypsinhaltigem FKS-Medium für 4 Minuten zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in serumfreiem Medium gewaschen, erneut zentrifugiert und erneut resuspendiert, bevor in die Vertiefungen der Versuchsplatten pro Kammer jeweils 20 000 Zellen pipettiert wurden und danach für 60 Minuten (HSMCs), bzw. für 30 Minuten (RSMCs) bei 37 °C an dem Matrixprotein adhärten.

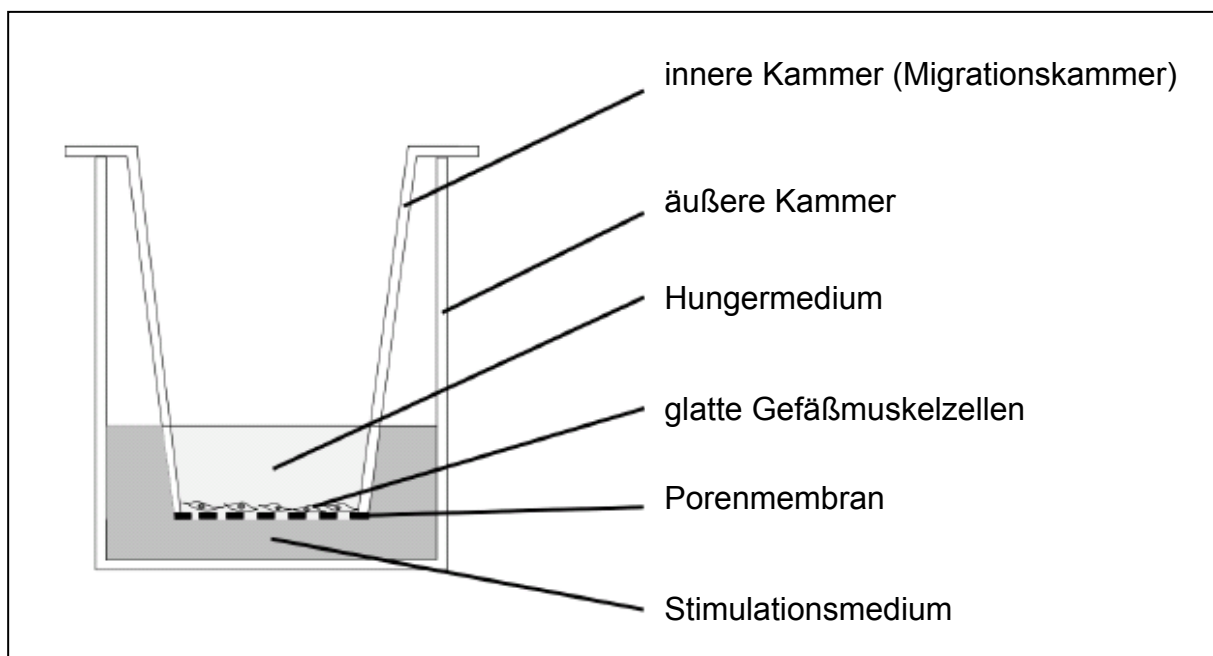
Nichtadhärente Zellen wurden anschließend mit PBS ab gespült. Die in den Kammern verbliebenen, adhären ten Zellen wurden dann mit 4 % Paraformaldehyd für 5 Minuten fixiert, mit 0,5 % Toluidinblau in 4 % Paraformaldehyd für weitere 5 Minuten gefärbt und zuletzt mehrfach mit sterilem Wasser gespült. Vor der geplanten Messung wurden die Zellen in den Kammern durch die Zugabe von je 100 µl 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) gelöst, um den aufgenommenen Farbstoff freizusetzen, und in einem ELISA-Reader bei 590 nm durch das Messen der Absorption indirekt quantifiziert. Die beschriebenen Experimente erfolgten in mehrfacher Ausführung und wurden mindestens dreimal wiederholt.

### 2.4 Migration

Die Migrations-Experimente mit humanen glatten Muskelzellen wurden unter Verwendung einer modifizierten Boyden-Kammer durchgeführt, wie bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben (68, 69). Das Prinzip beruht auf einem 2-Kammer-System, wobei eine obere und eine untere Kammer durch eine durchlässige Polykarbonat-Membran, versehen mit 8 µm großen Poren, voneinander getrennt sind. Zur Vorbereitung der Versuche wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C mit Kollagen I (Konzentration von 20 µg/ml) beschichtet. Die humanen glatten Muskelzellen

wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Antikörpern, Peptiden oder Kontrollmedium behandelt, bevor sie, suspendiert in serumfreiem Medium, in das obere Kompartiment der durchlässigen Kammern gegeben wurden. Die vorherige Ablösung der Zellen von den präkonfluenten Zellkulturschalen erfolgte hierbei, wie oben beschrieben. Die unteren Kammern wurden zunächst lediglich mit je 0,7 ml serumfreiem Medium befüllt. Die Chemotaxis, also die gezielte Bewegung der Zellen hin zu einer chemoattraktiven Substanz, wurde, nach einer Phase der Adhäsion für 60 Minuten bei 37 °C, durch die Zugabe von PDGF-BB (10 ng/ml) in die untere Kammer induziert. Die Anzahl der glatten Muskelzellen, die nach 4 Stunden pro Gesichtsfeld zur unteren Seite der Filtermembran migriert waren, wurde anschließend mikroskopisch bei einer 320-fachen Vergrößerung bestimmt, nach vorheriger Fixierung (Zugabe von Methanol und Kühlung bei -20 °C) und Färbung der Zellen. Vier zufällig ausgewählte Gesichtsfelder wurden pro Filter ausgezählt. Die Experimente erfolgten in mehrfacher Ausführung und wurden mindestens dreimal wiederholt.

Die folgende Abbildung zeigt schematisch den Aufbau einer modifizierten Boyden-Kammer.



**Abbildung 3:** Schematischer Aufbau einer modifizierten Boyden-Kammer. Nach Kaup, D. (70)

## 2.5 Durchflusszytometrie

Die Integrinexpression auf der Zelloberfläche glatter Gefäßmuskelzellen wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Anwendung bereits veröffentlichter Durchflusszytometrie-Techniken bestimmt (71, 66). Die Zellen wurden durch eine kurze Trypsinisierung von den Zellkulturschalen abgelöst. Nach Reinigung mit kalter, phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), wurden die Zellen für 20 Minuten in FACS-PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) mit einem Anteil von 5 % bovinem Serum-Albumin (BSA) unter ständiger Bewegung auf Eis inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Zellen wurden anschließend mit dem primären Antikörper für 20 Minuten inkubiert, mit FACS-PBS gewaschen und im danach mit einem Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-konjugierten, sekundären Antikörper (Gans-Anti-Maus) für 20 Minuten behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 4 %igem Paraformaldehyd fixiert und in FACS-PBS gewaschen und resuspendiert und mit einem Becton-Dickinson FACScalibur Flusszytometer auf Fluoreszenz untersucht. Die X- und Y-Achsen zeigen die Fluoreszenz-Intensität und die Zellzahl in logarithmischer Skalierung.

## 2.6 RT-PCR

Die Gesamt-RNA wurde mittels RNAzol (BIOZOL) aus den humanen glatten Gefäßmuskelzellen (HSMCs) isoliert. Jeder Probe wurden 200 µl Chloroform pro 1000 µl RNAzol zugegeben; anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach so erfolgter Phasentrennung konnte die RNA-haltige, wässrige, obere Phase entnommen, mit 500 µl Isopropanol pro 1000 µl RNAzol gemischt und dann erneut zentrifugiert werden. Nach Verwerfen des Überstandes und 2-maligem Waschen der RNA-haltigen Pellets mit Ethanol (75 %) wurden diese abschließend erneut für 8 Minuten zentrifugiert, die Pellets dann getrocknet und zuletzt in Diethylprocarbonatwasser (DEPC) resuspendiert. Die reverse Transkription und die Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurden nach Standard-Protokollen durchgeführt (72). Die PCR wurde in einem Perkin Elmer PE9700 Thermocycler als eine Heiß-Start-PCR durchgeführt. Nach der initialen Denaturierung bei 95 °C für 5 Minuten erfolgte die PCR-Amplifikation mit Denaturierungsstufen für 30 Sekunden bei 95 °C, der Anlagerung für 40 Sekunden bei 58 °C, der Primer-Verlängerung für 30 Sekunden bei 72 °C und einer abschließenden Verlängerung für 10 Minuten bei 72 °C.  $\beta_1$ -Integrin-Transkripte wurden in 31 Zyklen amplifiziert, Glycerinaldehyd-3-Phosphat

Dehydrogenase (GAPDH) wurde in 19 Zyklen amplifiziert. Die Elektrophorese der PCR-Produkte wurde in 2 %igem Agarosegel durchgeführt. Die Primer-Sequenzen für  $\beta_1$ -Integrin waren 5'-ACACGTCTCTCTGTCTGTCG-3' (Position 11 – 28) und 5'-CAGTTGTTACGGCACTCT-3 (Position 168 – 151), die Primer-Sequenzen für GAPDH waren 5'-GCAGGAGGCATTGCTGAT-3' (Position 282 – 301) und 5'-CACCATCTTCCAGGAGCGAG-3' (Position 516 – 499). Zugangs-Codes [accession codes] waren M84237 für humanes  $\beta_1$ -Integrin und M33197 für humanes GAPDH.

## 2.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Adhäsions- und Migrationsexperimente sowie die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind als Prozent der Kontrollgruppe angegeben.

Wo erforderlich erfolgte die statistische Auswertung unter Anwendung der Varianzanalyse und des ungepaarten t-Tests.

Als signifikant wurden Werte von  $p < 0,05$  angesehen.

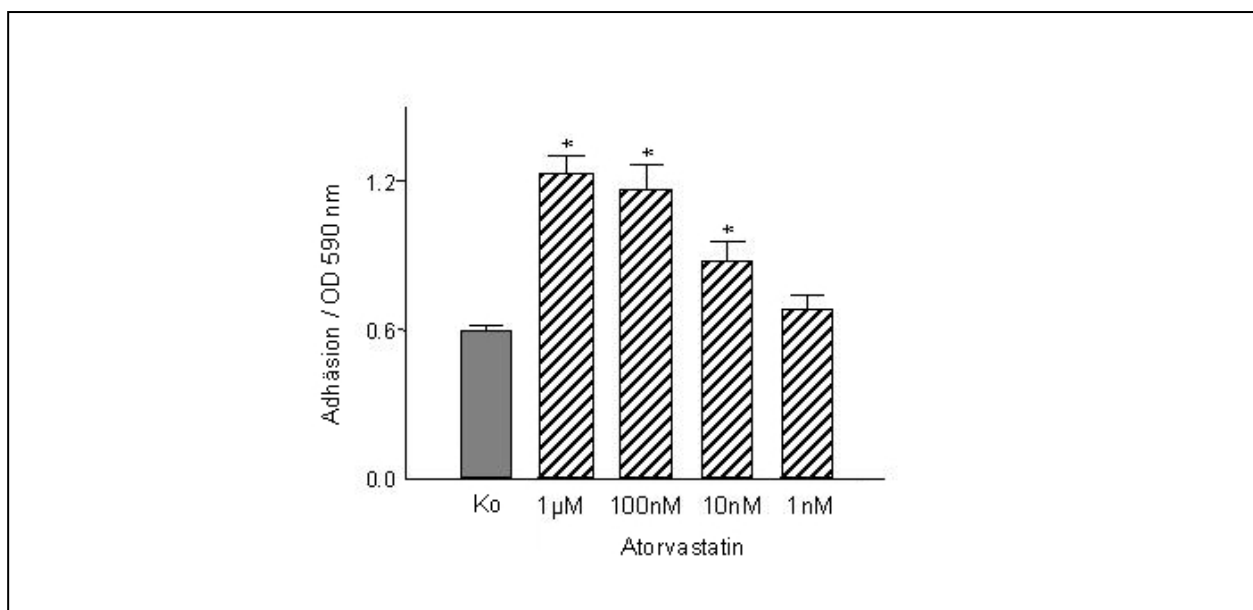
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der Adhäsionsversuche

Vor Messung der Adhäsion von glatten Gefäßmuskelzellen an dem extrazellulären Matrixprotein Kollagen I unter Verwendung Kollagen I-beschichteter Mikrotiter-Platten, wurden die Zellen für 24 bis 48 Stunden bei 37 °C mit den HMG-CoA-Reduktasehemmern Atorvastatin oder Pravastatin in verschiedenen Konzentrationen behandelt.

##### 3.1.1 Adhäsion von VSMCs an Kollagen I nach Stimulation mit Atorvastatin

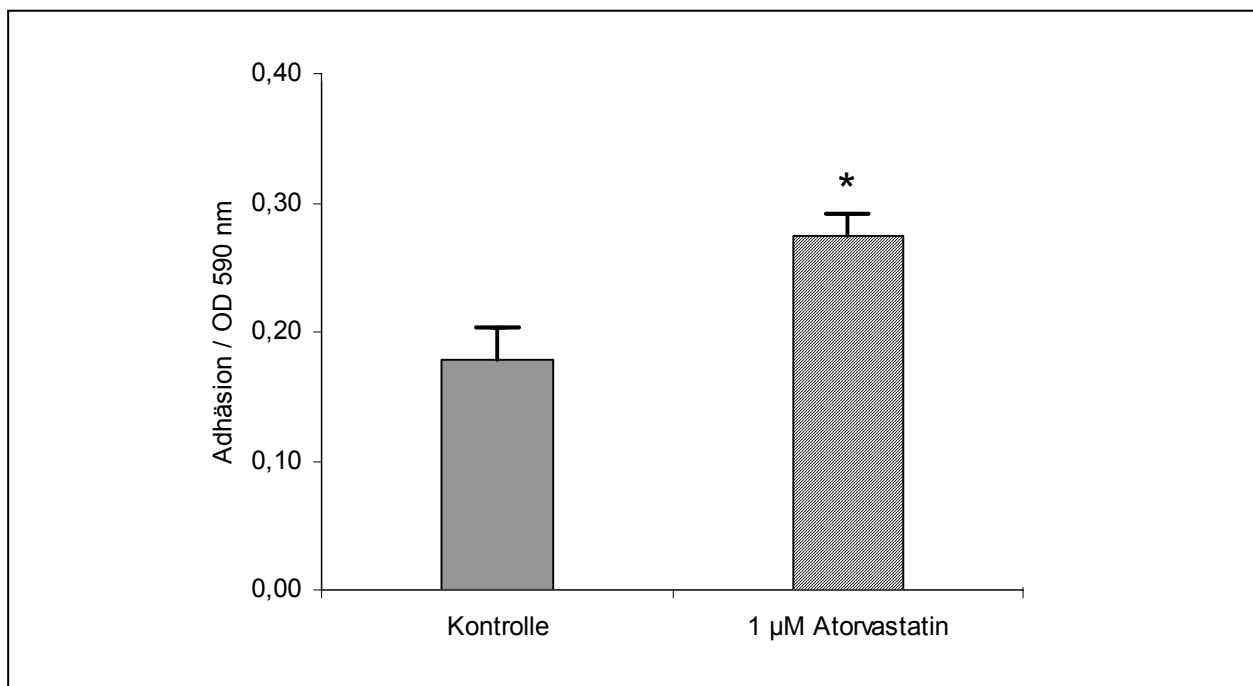
Abbildung 4a zeigt die Versuchsergebnisse nach Behandlung humaner glatter Gefäßmuskelzellen (HSMCs) mit Atorvastatin in den absteigenden Konzentrationen 1 µM, 100 nM, 10 nM und 1 nM. Es wurden 20.000 Zellen pro Schale (well) auf den mit Kollagen I beschichteten Versuchsplatten (20 µg Kollagen I pro Milliliter) ausgebracht. Die Adhäsion erfolgte für eine Stunde bei einer Temperatur von 37 °C.



**Abbildung 4a:** Adhäsion von HSMCs (20.000/Schale) an Kollagen I (20 µg/ml). Die Zellen wurden für 24 h mit Atorvastatin (Ato) behandelt, bevor die Adhäsionsexperimente begannen. Die Zellen konnten für 1 h bei 37 °C adhären (\*:  $p < 0,01$  gegenüber der Kontrolle [Ko]). Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 unterschiedlichen Zellansätzen.

Unter Verwendung der höchsten Atorvastatin-Konzentration (1  $\mu$ M) war eine hochsignifikante Zunahme der Adhäsion von HSMCs an Kollagen I von  $204 \pm 13,2$  % zu beobachten. Die Vorstimulation der Zellen mit einer Atorvastatin-Konzentration von 100 nM führte zu einer Adhäsionszunahme von  $187 \pm 11,6$  %, die Stimulation mit einer Konzentration von 10 nM zu einer Adhäsionszunahme von  $141 \pm 7,0$  % (beide  $p < 0,01$ ).

Vergleichbare Ergebnisse waren nach Stimulation aortaler glatter Muskelzellen von Ratten (RSMCs) mit Atorvastatin (1  $\mu$ M) für eine Dauer von 24 – 48 Stunden zu beobachten (siehe Abbildung 4b). Gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe war ein hochsignifikanter Anstieg der Adhäsion auf  $154 \pm 5,8$  % festzustellen.

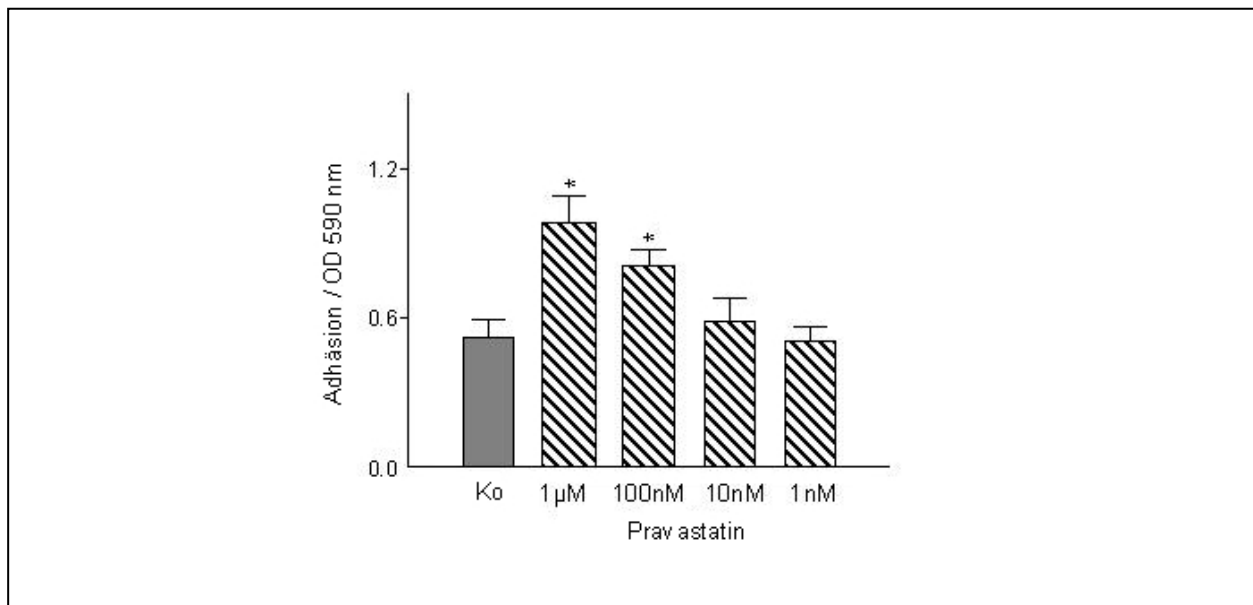


**Abbildung 4b:** Adhäsion von RSMCs (20.000/Schale) an Kollagen I (20  $\mu$ g/ml). Die Zellen wurden mit Atorvastatin behandelt, bevor die Adhäsionsexperimente begannen. Die Zellen konnten für 30 Min. bei 37 °C adhären (\*:  $p < 0,01$  gegenüber der Kontrolle). Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 unterschiedlichen Zellansätzen.

### 3.1.2 Adhäsion von VSMCs an Kollagen I nach Stimulation mit Pravastatin

In der Abbildung 5 sind die Ergebnisse der Adhäsionsversuche nach 24-stündiger Stimulation aortaler glatter Muskelzellen von Ratten (RSMCs) mit Pravastatin in den oben bereits genannten Konzentrationen (1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM) dargestellt.

Die Adhäsion der Zellen an Kollagen I-beschichteten Mikrotiter-Platten nahm nach Pravastatin-Stimulation zu. Das Maximum der Adhäsionssteigerung wurde nach Behandlung mit der höchsten Pravastatin-Konzentration (1  $\mu$ M) beobachtet und betrug  $178 \pm 10,2$  % ( $p < 0,01$ ). Eine Stimulation der Zellen mit Pravastatin in einer Konzentration von 100 nM resultierte ebenfalls in einer deutlichen Adhäsionszunahme von  $148 \pm 9,4$  %. Auch dieses Ergebnis war hochsignifikant ( $p < 0,01$ ).



**Abbildung 5:** Adhäsion von RSMCs (20.000/Schale) an Kollagen I (20  $\mu$ g/ml). Behandlung der Zellen für 24 h mit Pravastatin vor Beginn der Adhäsionsexperimente. Die Zellen konnten für 30 Min. bei 37 °C adhären (\*:  $p < 0,01$  gegenüber der Kontrolle [Ko]). Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 unterschiedlichen Zellansätzen.

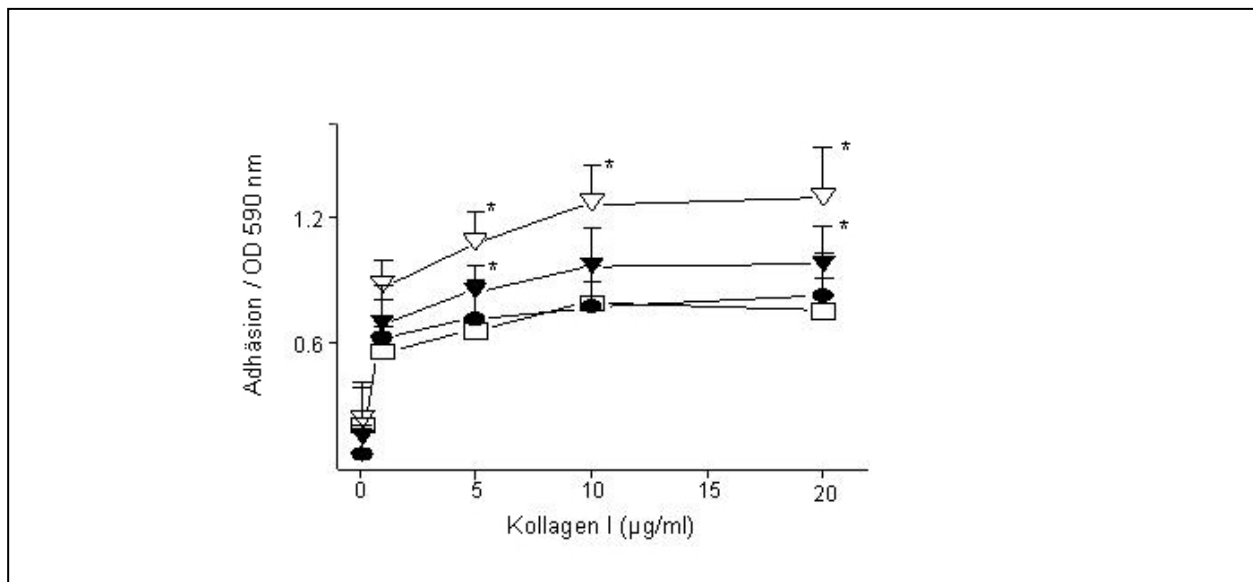
Adhäsionsuntersuchungen mit HSMCs nach Stimulation mit Pravastatin (1  $\mu$ M) sind im Kapitel 3.1.4 dargestellt und zeigten ebenfalls eine signifikante Zunahme der Adhäsion.

### 3.1.3 Adhäsion von VSMCs an Kollagen I nach Atorvastatin-Stimulation in Abhängigkeit von der Kollagen-Konzentration

Ziel der nachfolgenden Experimente war, festzustellen, ob die unter Statin-Einfluss beobachtete Adhäsionszunahme glatter Gefäßmuskelzellen an Kollagen I (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.2) durch eine Affinitätssteigerung des Kollagen-I-Rezeptors verursacht wird.

Hierfür wurden humane glatte Gefäßmuskelzellen (HSMCs) nach einer 24-stündigen Stimulation mit Atorvastatin auf Kollagen I-beschichtete Platten mit steigenden Kollagen-Konzentrationen von 0,1 µg/ml bis 20 µg/ml ausgebracht. Die gewählten Atorvastatin-Konzentrationen waren 1 µM, 10 nM und 0,1 nM (siehe Abbildung 6).

Zu beobachten war eine graduelle Adhäsionszunahme der mit Atorvastatin behandelten Zellen in Abhängigkeit von der Kollagen-Konzentration. Die Adhäsion der Zellen nahm nach Stimulation mit Atorvastatin (1 µM und 10 nM) signifikant gegenüber den Kontrollgruppen zu ( $p < 0,05$ ). Eine klare Linksverschiebung der Adhäsionskurven wurde nicht nachgewiesen. Dies zeigt, dass die Affinität der Rezeptoren gegenüber Kollagen I nach Statin-Behandlung nicht signifikant verändert war.



**Abbildung 6:** HSMCs wurden mit Atorvastatin (1 µM, weißes Dreieck; 10 nM, schwarzes Dreieck; 0,1 nM, weißes Quadrat) oder Kontrollansatz (schwarzer Kreis) für 24 h behandelt, bevor die Adhäsionsexperimente mit steigenden Konzentrationen von Kollagen I durchgeführt wurden ( $n = 8$ ; \*:  $p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle).

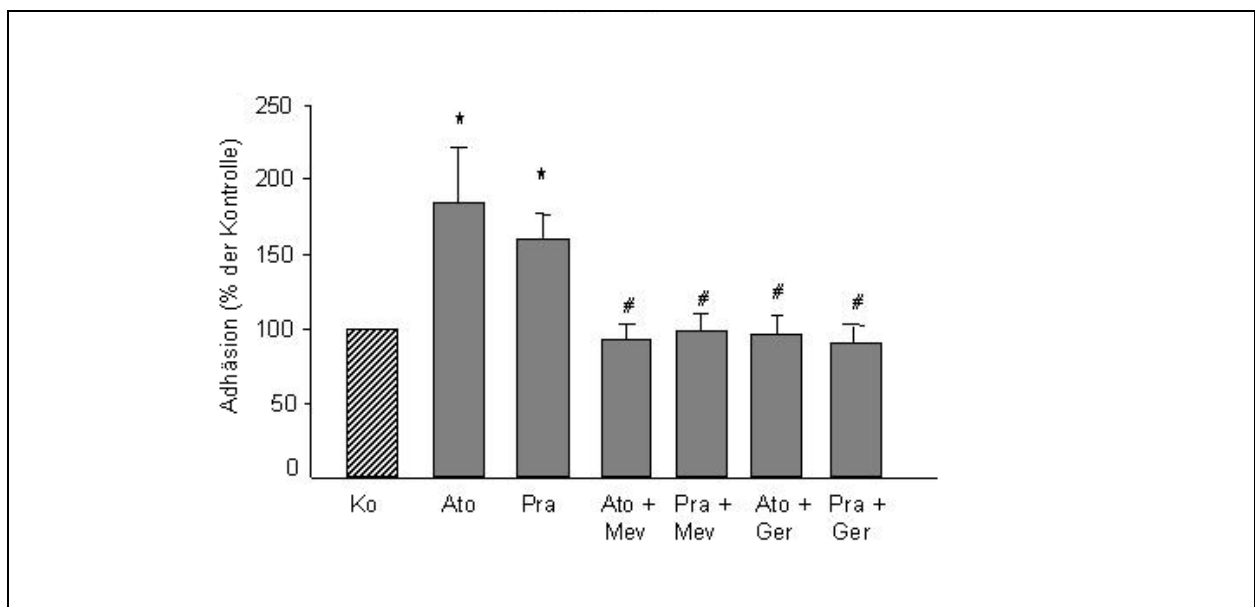


### 3.1.4 Adhäsion von VSMCs an Kollagen I nach Ko-Stimulation mit HMG-CoA-Reduktasehemmern und Mevalonat oder Geranyl-Geraniol

Ein Großteil der direkten zellulären Effekte von HMG-CoA-Reduktasehemmern wird bekanntermaßen durch die Hemmung der Isoprenoidbiosynthese und eine hierdurch verminderte Isoprenylierung von Rho-Proteinen verursacht.

Um diesen Zusammenhang hinsichtlich des unter Statinbehandlung gesteigerten Adhäsionsverhaltens vaskulärer glatter Muskelzellen an Kollagen I zu untersuchen, wurden die Zellen entweder mit Atorvastatin bzw. Pravastatin alleine oder gleichzeitig mit Mevalonat bzw. Geranyl-Geraniol stimuliert (siehe Abbildung 7a).

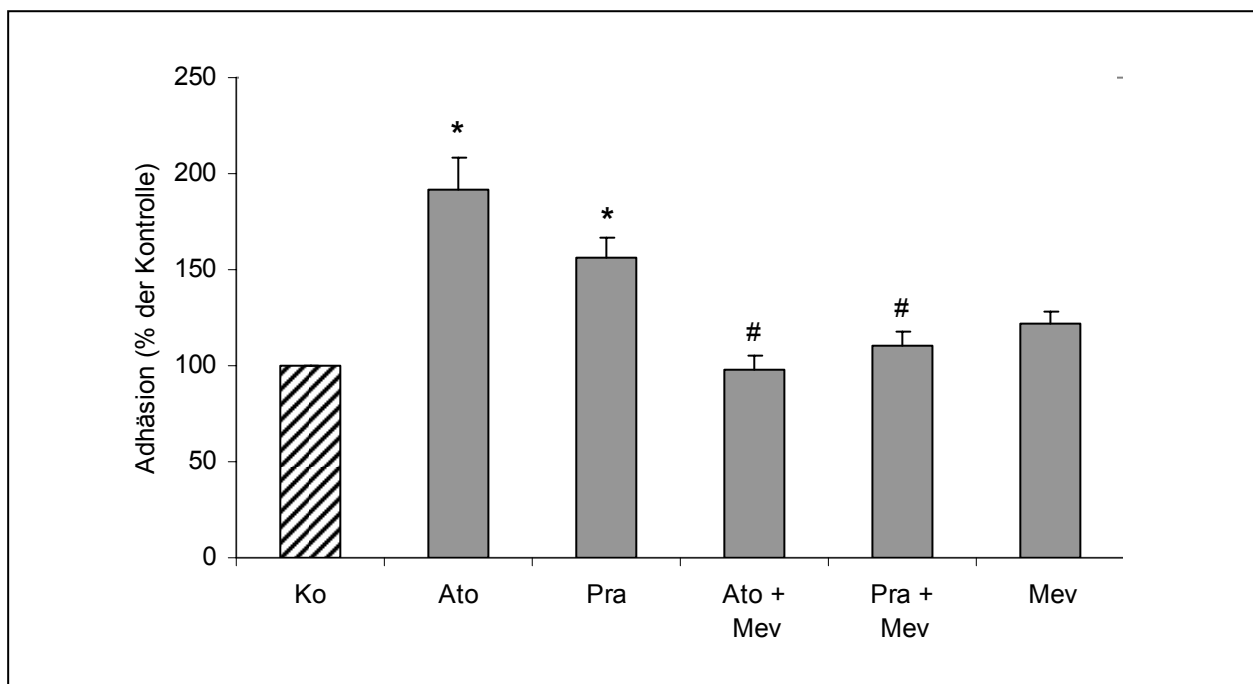
Die hier gezeigten Versuche wurden mit humanen glatten Gefäßmuskelzellen nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden mit den jeweiligen Substanzen durchgeführt. Die gewählten Konzentrationen waren 0,1  $\mu\text{M}$  für Atorvastatin, 1  $\mu\text{M}$  für Pravastatin, 10  $\mu\text{M}$  für Mevalonat und 10  $\mu\text{M}$  für Geranyl-Geraniol.



**Abbildung 7a:** HSMCs wurden für 24 h mit Atorvastatin (Ato, 0,1  $\mu\text{M}$ ) oder Pravastatin (Pra, 1  $\mu\text{M}$ ), mit oder ohne Mevalonat (Mev, 10  $\mu\text{M}$ ) oder Geranyl-Geraniol (Ger, 10  $\mu\text{M}$ ), behandelt. Die Adhäsion wurde auf Kollagen I-beschichteten (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) Platten bestimmt. Die Experimente wurden vierfach durchgeführt mit drei unterschiedlichen Ansätzen von HSMCs (\*:  $p < 0,05$  versus den unbehandelten Kontrollen [Ko], #:  $p < 0,05$  versus Atorva- oder Pravastatin allein). Die Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

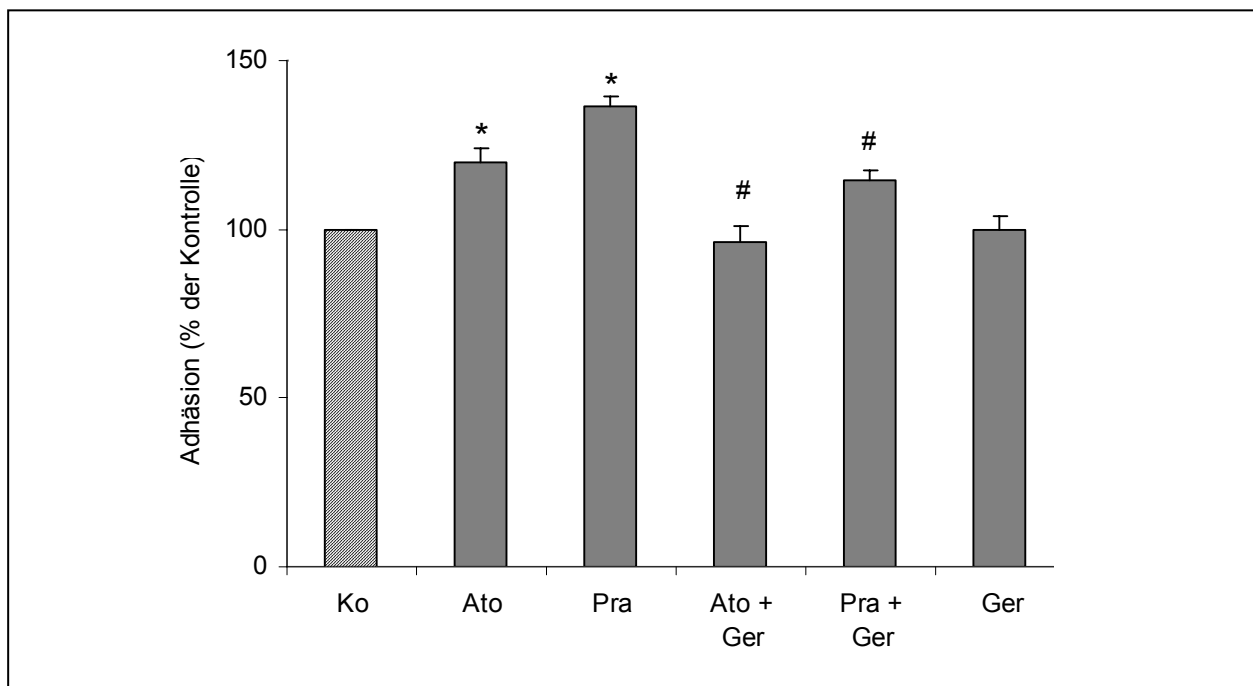
Gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe war ein signifikanter Anstieg der Zell-Adhäsion nach Behandlung mit Atorvastatin oder mit Pravastatin zu verzeichnen ( $p < 0,05$ ). Die statininduzierte Zunahme der Adhäsion war hingegen vollständig reversibel bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen einem der Statine und mit Mevalonat oder Geranyl-Geraniol ( $p < 0,05$  gegenüber Behandlung mit Atorvastatin oder Pravastatin alleine).

Dieser Effekt konnte ebenso bei Behandlung von RSMCs nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7b und 7c). Die Stimulation mit einem der beiden HMG-CoA-Reduktasehemmer resultierte in einer hochsignifikanten Adhäsionssteigerung der Zellen an der extrazellulären Matrix. Eine Ko-Stimulation mit Mevalonat, einem Zwischenprodukt der Isoprenoidbiosynthese, verhinderte diesen proadhäsiven Effekt. Die alleinige Behandlung mit Mevalonat hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Zellen.



**Abbildung 7b:** RSMCs nach Stimulation mit Atorvastatin (Ato, 0,1  $\mu$ M) oder Pravastatin (Pra, 1  $\mu$ M), mit oder ohne Mevalonat (Mev, 10  $\mu$ M). Die Experimente wurden dreifach durchgeführt (\*:  $p < 0,01$  versus den unbehandelten Kontrollen [Ko], #:  $p < 0,01$  versus Atorva- oder Pravastatin allein). Die Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Die Antagonisierbarkeit des Statin-Effekts war auch bei gleichzeitiger Stimulation von RSMCs mit einem Statin und mit dem Isoprenoid Geranyl-Geraniol zu beobachten.



**Abbildung 7c:** RSMCs nach Stimulation mit Atorvastatin (Ato, 0,1  $\mu\text{M}$ ) oder Pravastatin (Pra, 1  $\mu\text{M}$ ), mit oder ohne Geranyl-Geraniol (Ger, 10  $\mu\text{M}$ ). Die Experimente wurden zweifach durchgeführt (\*:  $p < 0,01$  versus den unbehandelten Kontrollen [Ko], #:  $p < 0,01$  versus Atorva- oder Pravastatin allein). Die Daten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.2 Ergebnisse der Migrationsversuche

Die Migrationsversuche wurden mit humanen glatten Gefäßmuskelzellen auf Kollagen I-beschichteten Filtern durchgeführt. Als chemotaktisch wirkende Substanz wurde der Wachstumsfaktor PDGF-BB (10 ng/ml) verwendet. Die Vorbehandlung der Zellen erfolgte mit verschiedenen Integrin-Antikörpern, den Peptidsequenzen RGD und RGE oder mit den HMG-CoA-Reduktasehemmern Atorvastatin bzw. Pravastatin. Die Ergebnisse sind in den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2 aufgeführt und in den Abbildungen 8 und 9 graphisch dargestellt.

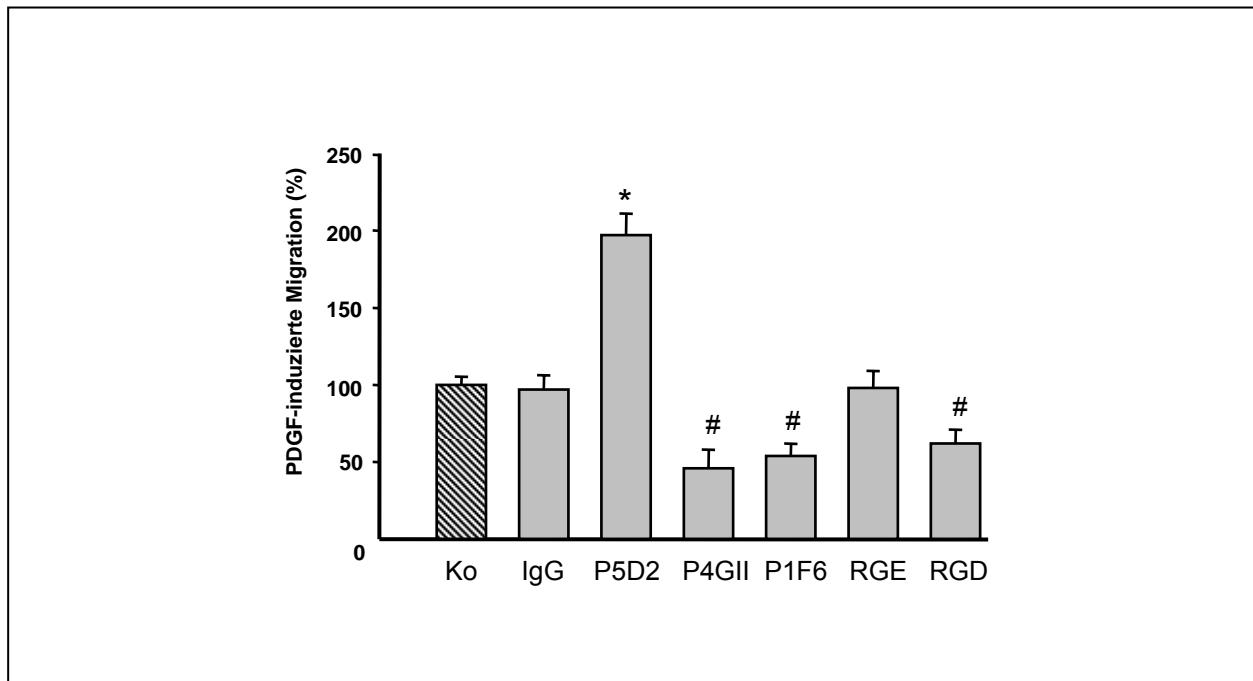
#### 3.2.1 Migration glatter Gefäßmuskelzellen (HSMCs) nach Vorbehandlung mit Integrin-Antikörpern

Eine signifikante Zunahme der Migration glatter Gefäßmuskelzellen war nach der Hemmung von  $\beta_1$ -Integrinen mit dem spezifischen Antikörper P5D2 (25  $\mu\text{g/ml}$ ) zu beobachten, wobei sich die Migrations-Rate hierunter nahezu verdoppelte ( $p < 0,01$ , siehe Abbildung 8). Die Behandlung der Zellen mit einem  $\beta_1$ -Integrin-stimulierenden

Antikörper (clone P4GII, 25 µg/ml) resultierte hingegen in einer Hemmung der Migrations-Rate um mehr als 50 % ( $p < 0,01$ ).

RGD (100 µM) - eine Peptidsequenz (Arg-Gly-Asp) verschiedener Matrixproteine, an die einige Integrine binden können - sowie Antikörper gegen  $\alpha_v\beta_5$ -Integrine (P1F6, 25 µg/ml) führten ebenfalls zu einer Abnahme der Chemotaxis, wie es bereits bei Experimenten mit der Verwendung von Gelatine-beschichteten Filtern beschrieben wurde (73).

Kontrollversuche mit unspezifischem IgG (25 µg/ml) oder RGE-Hexameren (100 µM) änderten die Rate der Migration entlang des durch PDGF-BB erzeugten Gradienten nicht.

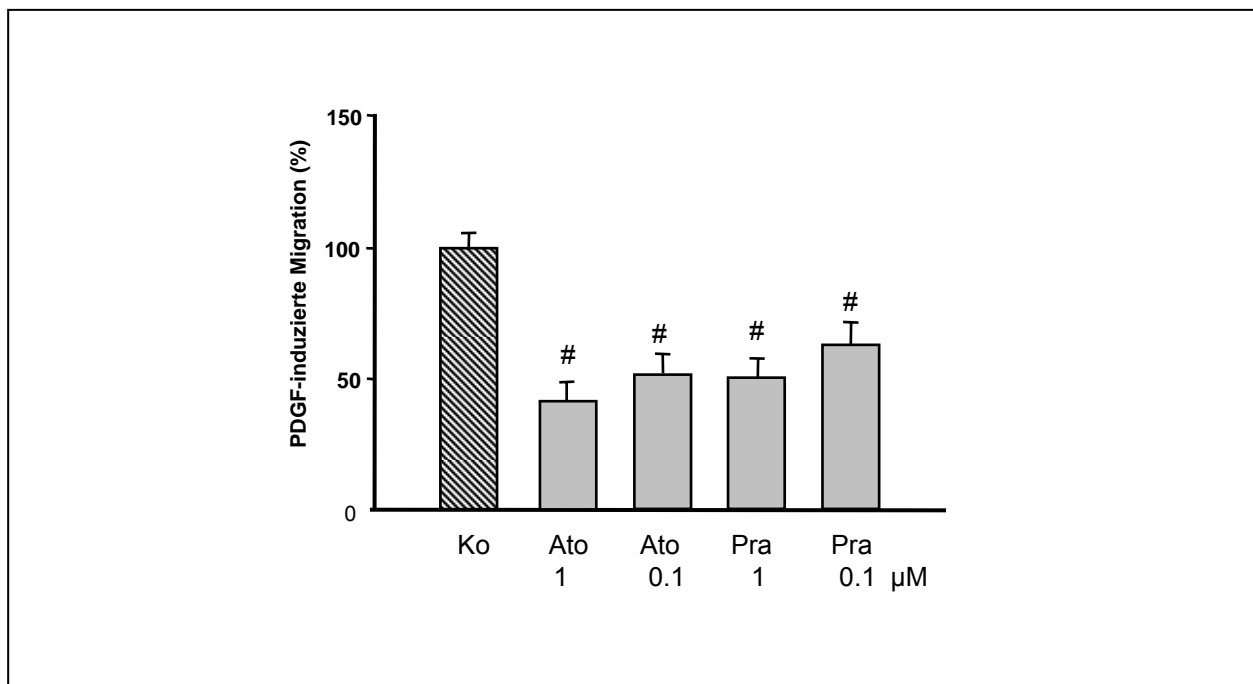


**Abbildung 8:** Die Migration von HSMCs, induziert durch PDGF-BB (10 ng/ml), wurde durch  $\beta_1$ -Integrin-aktivierende Antikörper (P4GII, 25 µg/ml), durch blockierende Antikörper gegen  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin (P1F6, 25 µg/ml), oder durch RGD (100 µM) gehemmt. Im Gegensatz dazu verstärkte die Vorbehandlung der HSMCs mit  $\beta_1$ -Integrin-blockierenden Antikörpern (P5D2) die Migration gegenüber dem PDGF-BB-Gradienten signifikant.

Diese Daten zeigen als wesentliches Ergebnis, dass die *Inhibition* von  $\beta_1$ -Integrin-Rezeptoren die Chemotaxis von HSMCs auf Kollagen I um nahezu 50 % zu steigern vermag, wohingegen die *Stimulation* der  $\beta_1$ -Integrin-Rezeptoren zu einer Abnahme der Migrationsrate führt.

### 3.2.2 Migration glatter Gefäßmuskelzellen (HSMCs) nach Vorbehandlung mit Atorvastatin oder Pravastatin

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse der Migrationsversuche nach einer 24-stündigen Vorbehandlung der humanen glatten Gefäßmuskelzellen mit verschiedenen Konzentrationen der HMG-CoA-Reduktasehemmern Atorvastatin oder Pravastatin (1  $\mu$ M und 0,1  $\mu$ M) dargestellt. Wie im zuvor geschilderten Versuch wurde die Chemotaxis der Zellen durch PDGF-BB (10 ng/ml) induziert.



**Abbildung 9:** HSMCs wurden für 24 h mit Atorvastatin (Ato, 1  $\mu$ M oder 0,1  $\mu$ M), Pravastatin (Pra, 1  $\mu$ M oder 0,1  $\mu$ M), oder Kontrollmedium (Ko) behandelt, bevor die PDGF-induzierte Chemotaxis auf Kollagen I untersucht wurde. Beide Statine hemmten die Chemotaxis der HSMCs signifikant (n = 6 in drei unterschiedlichen Ansätzen; Mittelwert  $\pm$  SEM; #: p: < 0,01 gegenüber der Kontrolle).

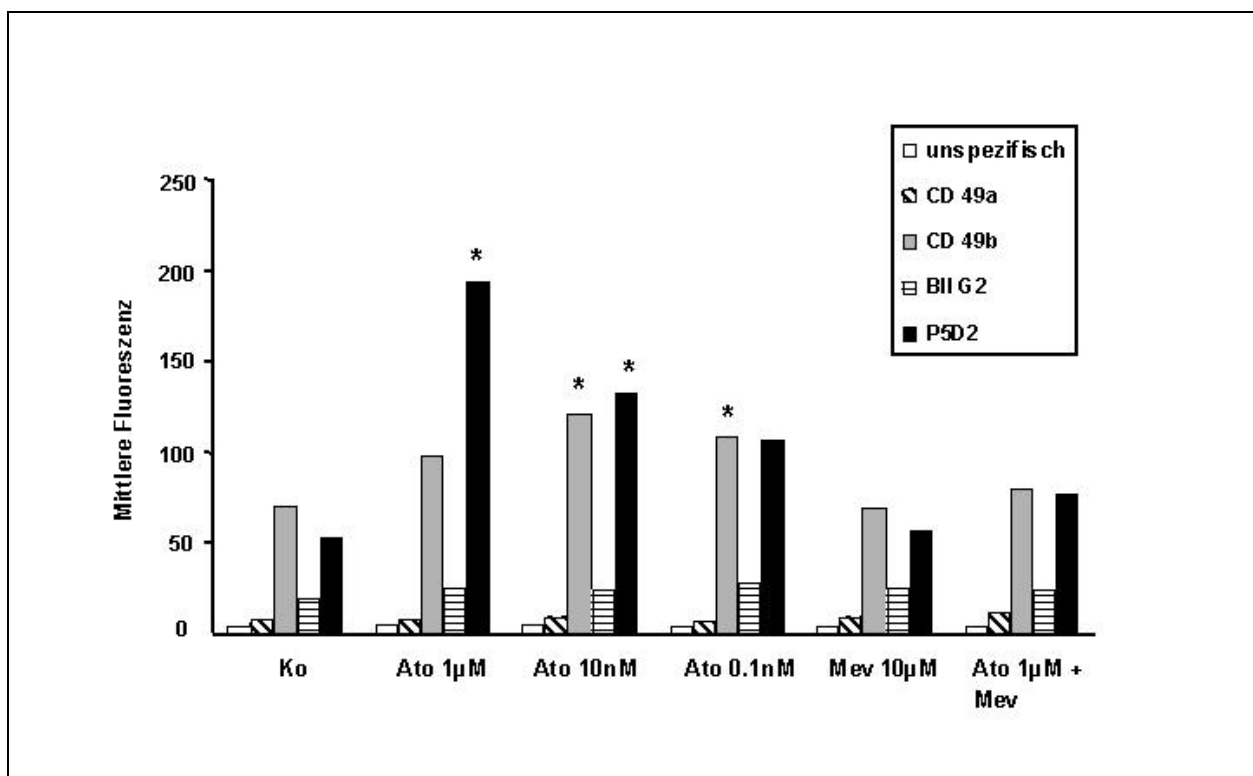
Die Vorbehandlung der Zellen, sowohl mit Atorvastatin als auch mit Pravastatin, führte zu einer signifikanten Abnahme der Migration der HSMCs auf Kollagen I um nahezu 50 %, wobei eine stärkere Migrations-Hemmung nach Behandlung mit der jeweils höheren Statin-Konzentration (1  $\mu$ M) beobachtet werden konnte.

Von anderen Untersuchern konnte bereits gezeigt werden, dass der anti-migratorische Effekt durch die Zugabe von Mevalonat antagonisierbar ist (74)

### 3.3 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Um die Ursache des beobachteten Effekts von HMG-CoA-Reduktasehemmern, also die Zunahme der Kollagen I-abhängigen, integrinvermittelten Adhäsion und die Abnahme der Migration glatter Muskelzellen, zu ermitteln, wurde die Expression ihres Oberflächenrezeptors für Kollagen I, des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrins, untersucht.

Die Untersuchung der Integrin-Expression auf der Zelloberfläche humaner glatter Gefäßmuskelzellen (HSMCs) erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analysen nach vorheriger 24-, bzw. 48-stündiger Atorvastatin-Behandlung. Die Zellen wurden inkubiert mit den Antikörpern Anti- $\alpha_1$ - (CD49a), Anti- $\alpha_2$ - (CD49b), Anti- $\beta_1$ - (P5D2) und Anti- $\alpha_5$ -Integrin (BIIG2), welche anschließend indirekt mittels FITC-Antikörpern nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Ergebnisse der Integrin-Rezeptor-Untersuchung auf kultivierten, humanen glatten Gefäßmuskelzellen (HSMCs) mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden inkubiert mit nichtspezifischem Maus-IgG, Anti- $\beta_1$  (P5D2, 5  $\mu\text{g/ml}$ ), Anti- $\alpha_1$  (CD49a), Anti- $\alpha_2$  (CD49b) oder Anti- $\alpha_5$  (BIIG2, 5  $\mu\text{g/ml}$ ). Die Stimulation der Zellen erfolgte für 24 h mit Atorvastatin (Ato) in 0,4 % FCS-enthaltendem Medium. Die Experimente wurden zweifach wiederholt mit unterschiedlichen Ansätzen von HSMCs.

Als Ergebnis war eine signifikante Zunahme von Bindungsstellen für Anti- $\beta_1$  (P5D2) und Anti- $\alpha_2$  (CD49b) nach Behandlung mit Atorvastatin (0,1  $\mu\text{M}$ ) für 24 oder 48 Stunden zu verzeichnen. Diese nach Statin-Stimulation vermehrte Expression der Integrin-Rezeptoren  $\beta_1$  und  $\alpha_2$  wurde durch vorherige Zugabe von Mevalonat blockiert.

### 3.4 Ergebnisse der RT-PCR

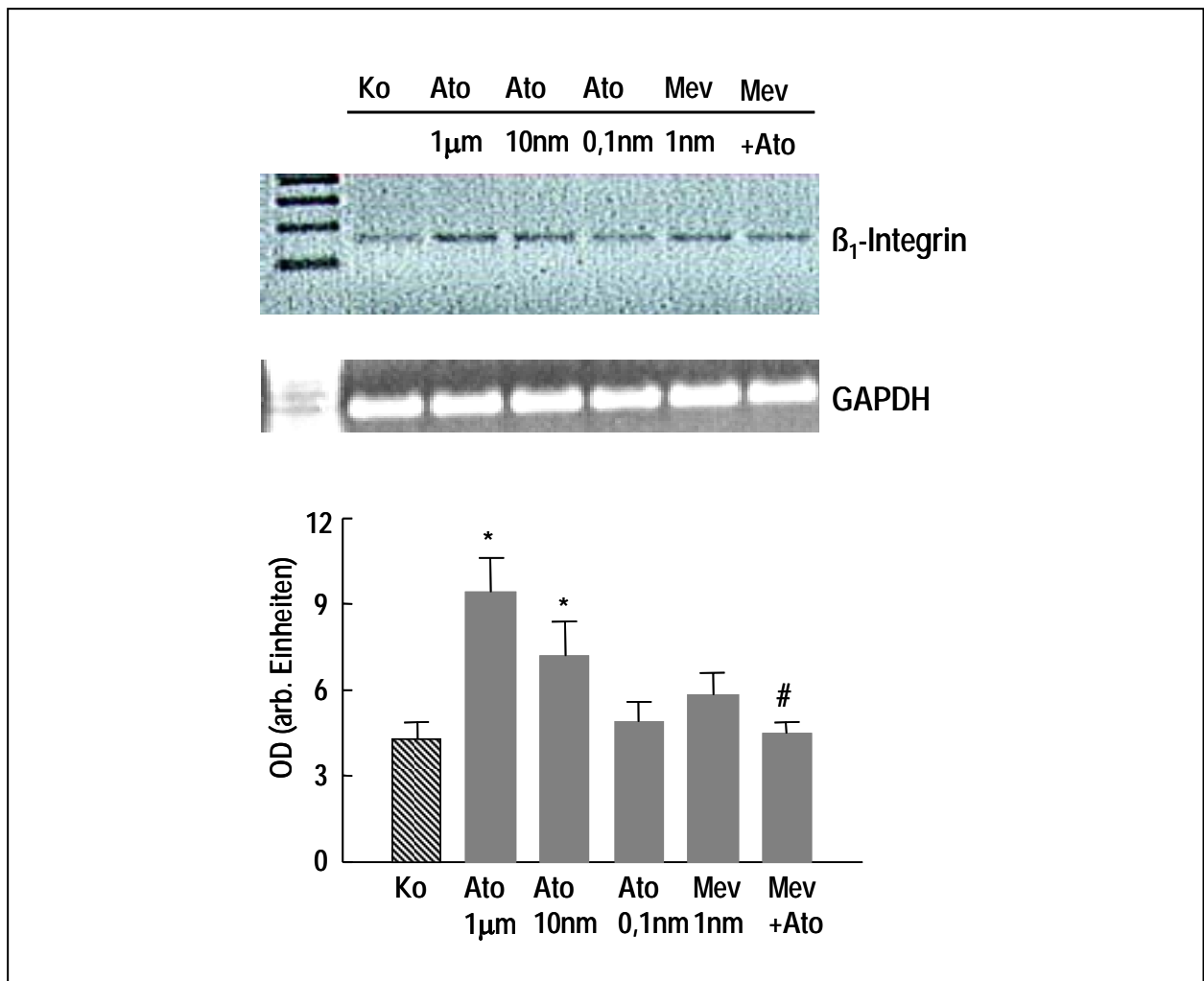
Eine Zunahme der Expression von  $\beta_1$ -Integrinen in HSMCs bestätigten auch die Ergebnisse der durchgeführten PCR (siehe Abbildung 11).

Die mRNA-Konzentrationen wurden mittels RT-PCR bestimmt. Nach der Synchronisation des Zellzyklus durch Inkubation unter Serum-Entzug (0,4 % FCS) für 48 Stunden wurden die humanen, glatten Gefäßmuskelzellen mit Atorvastatin in verschiedenen Konzentrationen, mit oder ohne Zugabe von Mevalonat, für 8 bis 24 Stunden stimuliert.

Der Gehalt an  $\beta_1$ -Integrin-mRNA war in den mit der höchsten Atorvastatin-Konzentration (1  $\mu\text{M}$ ) behandelten Zellen nach 16 Stunden verdoppelt ( $p < 0,05$ ), wie in Abbildung 11 dargestellt. Die Inkubation mit einer niedrigeren Atorvastatin-Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  zeigte eine ebenfalls noch signifikante, 1,6-fache Zunahme des mRNA-Gehalts ( $p < 0,05$ ), wohingegen sich bei der Inkubation mit 0,1 nM Atorvastatin kein signifikanter Effekt mehr nachweisen ließ.

Die beobachtete Expressionssteigerung wurde nahezu vollständig durch die zeitgleiche Behandlung mit Mevalonat (10  $\mu\text{M}$ ) während der Statin-Behandlung verhindert. Die ausschließliche Inkubation mit Mevalonat hatte keinen feststellbaren Effekt.

Die gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass die unter Statin-Einfluss verminderte chemotaktische Aktivität der HSMCs zum Teil auf die Expressionszunahme von  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin-Rezeptoren infolge einer blockierten Isoprenoidbiosynthese zurückzuführen ist.



**Abbildung 11:** Ergebnis einer repräsentativen RT-PCR mit der Transkription der  $\beta_1$ -Integrine in humanen glatten Gefäßmuskelzellen (HSMCs). Die Zellen wurden mit Atorvastatin (Ato) in verschiedenen Konzentrationen und Mevalonat (Mev) für 16 h inkubiert. GAPDH, ein ubiquitäres, nicht reguliertes „Housekeeping-Gen“, wurde als interner Standard für die RNA-Bestimmung benutzt (n = 3). Mittelwert  $\pm$  SEM; \*: p: < 0,05, #: p: < 0,05 gegenüber Atorvastatin alleine.



## 4. Diskussion

Der Einfluss von HMG-CoA-Reduktasehemmern auf das funktionelle Verhalten glatter Gefäßmuskelzellen, eines Zelltyps, der wesentlich an Prozessen der Atherogenese und der fortgeschrittenen Atherosklerose beteiligt ist (27, 28, 29), wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht und trägt entscheidend zu den antiatherogenen Eigenschaften dieser Substanzklasse bei (11). Der klinische Nutzen beruht, neben den antiinflammatorischen und antiaggregatorischen Effekten, insbesondere auf einer statininduzierten Hemmung der Migrations- und Proliferationsbereitschaft der glatten Muskelzellen, woraus eine Abnahme der Intimahyperplasie und der Plaqueprogression resultiert (20, 33, 74).

Für die Migration und Proliferation sowie für zahlreiche andere Funktionen der vaskulären, glatten Muskelzellen, ist ein enger Kontakt mit der umgebenden extrazellulären Matrix erforderlich, die sich in Arterien überwiegend aus Laminin, Fibronectin, Kollagen I und Kollagen IV zusammensetzt (75, 76, 77, 78). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von den HMG-CoA-Reduktasehemmern Atorvastatin und Pravastatin auf die Adhäsion und auf die PDGF-induzierte Migration kultivierter, glatter Gefäßmuskelzellen an dem extrazellulären Matrixprotein Kollagen I untersucht. Kollagen I ist ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix in Gefäßwänden und in der fibrösen Kappe fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen.

Der Kontakt und die Interaktion von Zellen mit den extrazellulären Matrixproteinen der Gefäßwand wird in erster Linie durch Mitglieder der Integrin-Familie vermittelt. Integrine sind heterodimere, transmembranäre Adhäsionsrezeptoren, die unter Einbeziehung des Zytoskeletts und zytoskelettassoziierter Proteine zum einen zu strukturellen Veränderungen der Zellen beitragen und ihre Verankerung im Gewebe ermöglichen, des Weiteren aber auch entscheidende Signaltransduktionsprozesse unterhalten, die für das Überleben, die Differenzierung, die Proliferation und die Fortbewegung der Zellen verantwortlich sind (60).

Kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen adhärieren an Kollagen I hauptsächlich unter Vermittlung von  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinen (57, 79). Es sollte daher gezielt analysiert werden, ob nach Statin-Behandlung eventuell zu beobachtende Veränderungen der Zell-Matrix-Interaktion mit der Aktivität oder der Expression dieser Adhäsionsrezeptoren in

Zusammenhang stehen. Bekanntermaßen zählt ein Großteil der statininduzierten Effekte auf Gefäßzellen zu den cholesterolunabhängigen, sogenannten „pleiotropen Effekten“, die im Wesentlichen auf einer Hemmung der Mevalonat- und Isoprenoidbiosynthese beruhen und infolge dessen zu einer Aktivitätsabnahme isoprenoidabhängiger Rho-GTPasen führen. Rho-GTPasen gehören zur Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine und stehen in enger Verbindung mit Signaltransduktionswegen, die für integrinvermittelte Zellstrukturveränderungen und Zellfunktionen erforderlich sind (62). Neben dem Statin-Einfluss auf die  $\beta_1$ -Integrinvermittelte Zell-Matrix-Interaktion wurde in dieser Arbeit daher zusätzlich deren Abhängigkeit von der gehemmten Isoprenoidsynthese (und folglich Rho-Inaktivierung) untersucht.

Die Stimulation arterieller glatter Gefäßmuskelzellen (HSMCs und RSMCs) mit Atorvastatin oder Pravastatin resultierte in einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Adhäsionszunahme an Kollagen I (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.2). Die Adhäsionssteigerung war nach Behandlung der Zellen mit Atorvastatin ausgeprägter als nach Behandlung mit Pravastatin, was Folge der unterschiedlichen chemischen Grundstruktur der Substanzen sein könnte. Pravastatin ist durch mehrere freie OH-Gruppen hydrophiler als Atorvastatin und wird in die Hepatozyten durch einen aktiven Transportmechanismus aufgenommen, den extrahepatische Zellen nicht besitzen. Die Diffusion von Pravastatin durch die Plasmamembran extrahepatischer Zellen ist aus diesem Grund nur erschwert möglich (20, 80). Wenn auch geringer ausgeprägt als nach Behandlung mit Atorvastatin, war die Adhäsionszunahme nach Pravastatin-Stimulation jedoch signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht, sowohl bei HSMCs als auch bei RSMCs.

Um zu untersuchen, ob der beobachtete proadhäsive Effekt der HMG-CoA-Reduktasehemmer auf eine Hemmung der Isoprenoidsynthese zurückzuführen ist, wurde das Adhäsionsverhalten der Zellen nach einer gleichzeitigen Behandlung mit einem Statin und mit Mevalonat oder Geranyl-Geraniol analysiert (siehe Kapitel 3.1.4). Die unter Statin-Einfluss signifikant gesteigerte Adhäsion der Zellen an Kollagen I war durch gleichzeitige Behandlung mit Mevalonat oder Geranyl-Geraniol antagonisierbar. Dies spricht dafür, dass die unter Statin-Behandlung gesteigerte Adhäsion glatter

Muskelzellen an Kollagen I Folge eines verminderten Aktivitätszustand der isoprenoidabhängigen Rho-GTPasen ist.

Es war anzunehmen, dass der ausgeprägte proadhäsive Effekt beider HMG-CoA-Reduktasehemmer durch  $\beta_1$ -Integrine vermittelt wird, die als hauptverantwortliche Rezeptoren für die Bindung glatter Gefäßmuskelzellen an die extrazelluläre Matrix, unter anderem an Kollagen I, gezeigt werden konnten (57). Grundsätzlich kann eine integrinvermittelte Adhäsionszunahme von Zellen an einem Liganden, zum Beispiel an einem Matrixprotein, durch zwei wesentliche Mechanismen verursacht werden. Sie kann als Folge einer gesteigerten Integrin-Expression, also einer zunehmenden Anzahl dieser Rezeptoren, auftreten und / oder als Folge einer gesteigerten Affinität gegenüber dem Liganden, die auf Konformitätsänderungen der Integrin-Rezeptoren zurückgeführt wird. Nach heutigem Kenntnisstand können diese Konformitätsänderungen sowohl durch die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne des Integrin-Rezeptors, als auch durch intrazelluläre Vorgänge herbeigeführt werden. Ein gut und bereits frühzeitig untersuchtes Beispiel für einen solchen intrazellulären Aktivierungsprozess ist der GPIIb/IIIa-Rezeptor auf Thrombozyten (81, 82), das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin, dessen therapeutische Hemmung mittels GPIIb/IIIa-Antagonisten (z. B. Abciximab) eine wichtige Therapiemaßnahme bei der Behandlung des akuten Myokardinfarktes darstellt. Unter physiologischen Bedingungen ist der Rezeptor auf den in der Blutbahn zirkulierenden Thrombozyten nicht aktiviert und bindet keinen seiner möglichen löslichen Liganden. Bei einer Aktivierung der Thrombozyten, zum Beispiel durch Thrombin oder ADP, wird auch der Integrin-Rezeptor in einen Zustand hoher Affinität gegenüber Fibrinogen oder von Willebrand Faktor versetzt und die Bildung von Thromben begünstigt (81). Es wird angenommen, dass dieser Vorgang durch die kurzen intrazytoplasmatischen Domänen der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrine reguliert wird, dessen Interaktion mit den in Plättchen aktivierten Signalen (G-Proteine, Proteinkinasen, pH-Anstieg,  $Ca^{2+}$ -Anstieg) letztlich auch zu einer Konformationsänderung der extrazellulären Domänen führt (83, 84, 85). Man nennt diesen Prozess „inside-out signaling“ (60, 82). Ein im Zusammenhang mit intrazellulär ausgelösten Adhäsionsverstärkungen häufig genannter Begriff ist die so genannte „Avidität“ (lat. avidus: gierig nach). Die Avidität bezeichnet die Fähigkeit des Rezeptors multivalente Bindungen mit der extrazellulären Matrix einzugehen, also mehrere Matrixproteine zu binden und hierdurch die Adhäsion zu festigen, während die Affinität im engeren Sinne die chemische Bindungsneigung gegenüber einem Liganden beschreibt und durch die

Gleichgewichtskonstante bestimmt werden kann. Häufig scheinen beide Vorgänge gemeinsam die Festigkeit der Bindung zwischen Integrin und Matrix zu beeinflussen. Um in dieser Arbeit zu untersuchen, ob die statininduzierte Adhäsionszunahme der Zellen an Kollagen I durch eine gesteigerte Adhäsionsbereitschaft der Integrin-Rezeptoren verursacht wird, also durch eine Zunahme der Affinität und / oder Avidität, wurden Adhäsionsversuche mit humanen glatten Gefäßmuskelzellen durchgeführt, die nach Stimulation mit Atorvastatin auf Mikrotiter-Platten mit steigenden Kollagen-Konzentrationen ausgebracht wurden (siehe Kapitel 3.1.3). Das Ergebnis sprach *gegen* eine Affinitätssteigerung der Rezeptoren gegenüber Kollagen I nach Atorvastatin-Behandlung. Zwar konnte auch in diesen Versuchen eine signifikante Adhäsionszunahme der Zellen nach Stimulation mit dem Statin gegenüber den unbehandelten Kontrollen verzeichnet werden, es zeigte sich hierbei jedoch eine graduelle Adhäsionszunahme bei steigenden Kollagen-Konzentrationen, hingegen keine verstärkte Bindung der Zellen bei niedrigeren Konzentrationen im Sinne einer Linksverschiebung der Bindungskurven.

Die Tatsache, dass die Adhäsionszunahme der glatten Muskelzellen an Kollagen I nach einer Behandlung mit HMG-CoA-Reduktasehemmern nicht auf eine Steigerung der Adhäsionsneigung der Kollagen-Rezeptoren zurückzuführen war, führte zu dem Rückschluss, dass sie auf einer Zunahme der Rezeptoranzahl beruhen könnte. Diese Annahme bestätigte sich sowohl in den durchflußzytometrischen als auch in den PCR-Untersuchungen (siehe Kapitel 3.3 und 3.4). Nach Behandlung von HSMCs mit Atorvastatin für 24 Stunden konnte in der Durchflusszytometrie eine signifikante Zunahme der antikörpermarkierten  $\beta_1$ - und  $\alpha_2$ -Integrin- Untereinheiten auf den Zelloberflächen festgestellt werden, welche gemeinsam den  $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptor für Kollagen I bilden. Eine Ko-Stimulation mit Mevalonat verhinderte die Expressionszunahme. Ein vergleichbares Ergebnis zeigten die RT-PCR-Untersuchungen, bei denen eine Verdoppelung der  $\beta_1$ -Integrin-mRNA nach Behandlung mit Atorvastatin festgestellt wurde, wohingegen die Menge der gemessenen RNA nach einer Ko-Stimulation mit Atorvastatin und Mevalonat dem Niveau der unbehandelten Kontrollen entsprach. Die naheliegende Schlussfolgerung, dass die Zunahme der Integrinexpression auf eine Inaktivierung der Rho-GTPasen durch Statine zurückzuführen ist, scheint durchaus plausibel und vereinbar mit den bekannten Einflüssen dieser kleinen G-Proteine auf die Regulation von Transkriptionsfaktoren (25, 54, 86, 87).

Die in vitro gesteigerte Adhäsion der Zellen an Kollagen I durch Steigerung der  $\beta_1$ -Integrin-Rezeptor-Expression könnte in vivo in mehrfacher Hinsicht zu den antiatherogenen Eigenschaften der HMG-CoA-Reduktasehemmer beitragen. In erster Linie ist denkbar, dass die Bindung der VSMCs an Kollagenfasern der fibrösen Kappe fortgeschrittener atherosklerotischer Plaques verstärkt, und deren Stabilität somit begünstigt wird. Es ist bekannt, dass die Plaquestabilität maßgeblich von dem Vorhandensein glatter Muskelzellen und von Kollagenfasern in der fibrösen Kappe abhängig ist (40, 41).

Inwieweit die beobachtete Adhäsionszunahme an Kollagen I einen positiven Effekt in der Frühphase der Atherogenese darstellen könnte, ist spekulativ, zumal die Basalmembran in der Umgebung glatter Muskelzellen überwiegend Kollagen IV und Laminin enthält, welche bevorzugt von den  $\alpha_1\beta_1$ - und den  $\alpha_7\beta_1$ -Integrinen gebunden werden (88, 89).

Die Adhäsion von Zellen an der extrazellulären Matrix ist jedoch, wie bereits diskutiert, weit mehr als ein nur mechanischer Vorgang (90). Zahlreiche Zellfunktionen setzen die Adhäsion der Zellen an der Matrix voraus, und oft sind Integrine die entscheidenden Vermittler von den Signalen der Matrix und den hierdurch ausgelösten zellulären Antworten. Unter Einbeziehung des Zytoskeletts und assoziierter Signaltransduktionswege tragen sie zu der erforderlichen Balance zwischen fester Verankerung oder Fortbewegung, Differenzierung oder Proliferation, Überleben oder Sterben der Zellen bei. Ein klassisches Beispiel für die Wichtigkeit und Komplexität der Adhäsion ist die Abhängigkeit der Zellproliferation und der Apoptosehemmung von der Verankerung an der Matrix, der sogenannten „anchorage dependence“ (91). Die durch Wachstumsfaktorrezeptoren aktivierten intrazellulären Signaltransduktionswege bedürfen einer zusätzlichen Stimulation durch die Zell-Matrix-Bindung, um den Zellzyklus zu durchlaufen. Weiterhin führt der Verlust des Kontakts mit der Matrix bei den meisten Zellen zur Apoptose, ein Phänomen, das als „anoikis“ (griechisch: Heimatlosigkeit) bezeichnet wird, und welches verhindert, dass Zellen sich außerhalb des für sie vorgesehenen Gewebes entwickeln (55).

Es ist anzunehmen, dass eine Adhäsionszunahme glatter Muskelzellen an Kollagen I (unter Vermittlung der  $\alpha_2\beta_1$ -Integrine) weitere zelluläre Funktionen beeinflusst.

Auch die Migration von Zellen entlang der extrazellulären Matrix ist ein adhäsionsabhängiger Prozess. Um zu untersuchen, ob die beobachtete, statininduzierte Adhäsionszunahme an Kollagen I durch die Expressionssteigerung des Kollagen I-Rezeptors mit einer Abnahme der Migrationsbereitschaft der glatten Gefäßmuskelzellen einhergeht, wurden Migrationsversuche mit humanen glatten Gefäßmuskelzellen unter Verwendung kollagenbeschichteter Filter durchgeführt. Der chemotaktische Gradient wurde durch den Wachstumsfaktor PDGF-BB erzeugt. PDGF gilt als eine der stärksten mitogenen und chemoattraktiven Substanzen in atherosklerotisch veränderten Gefäßen in vivo und auch in vitro (27, 92). Die Behandlung der Zellen erfolgte vor Beginn der Migrationsversuche mit verschiedenen Integrin-Antikörpern, wobei dem Einfluss der hemmenden oder stimulierenden  $\beta_1$ -Integrin-Antikörper das Hauptinteresse galt, oder mit den HMG-CoA-Reduktasehemmer Atorvastatin bzw. Pravastatin (siehe Kapitel 3.2).

Die Behandlung humaner glatter Gefäßmuskelzellen mit Atorvastatin oder Pravastatin resultierte in einer signifikanten Abnahme der PDGF-induzierten Migration auf Kollagen I. In Korrespondenz zu den Adhäsionsversuchen war der antimigratorische Effekt nach Stimulation der Zellen mit Pravastatin zwar signifikant, jedoch geringer ausgeprägt als nach Stimulation mit Atorvastatin. Eine Abhängigkeit von der gewählten Pravastatin-Konzentration ist wenig wahrscheinlich. Die hier verwendeten Konzentrationen entsprechen bei beiden Statinen den für die Cholesterolsenkung therapeutisch wirksamen Serumspiegeln. Andere Arbeitsgruppen konnten selbst unter Anwendung deutlich höherer (nicht toxischer) Pravastatin-Konzentrationen keine Migrationshemmung nachweisen (20). Vor diesem Hintergrund ist das in dieser Arbeit gezeigte Ergebnis unerwartet hinsichtlich der antimigratorischen Effektivität von Pravastatin.

Eine signifikante Abnahme der Chemotaxis konnte auch nach Behandlung der Zellen mit einem spezifischen,  $\beta_1$ -Integrin-aktivierenden Antikörper beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führte die Hemmung der  $\beta_1$ -Integrine durch Behandlung mit dem blockierenden Antikörper P5D2 zu einer Zunahme der Migrationsrate auf das Doppelte gegenüber der Kontrolle. Somit konnte eine Abhängigkeit der Chemotaxis von den  $\beta_1$ -Integrin-Rezeptoren belegt werden. Die Stimulation der Zellen mit einem HMG-CoA-Reduktasehemmer oder mit dem rezeptoraktivierenden Antikörper verhielten sich gleichsinnig im Sinne einer Abnahme der Chemotaxis.

Das in den Migrationsexperimenten verwendete RGD ist eine Tripeptid-Sequenz (Arginin-Glycin-Aspartat), die in den meisten, soweit bekannt jedoch nicht in allen Matrixproteinen vorkommt (93, 94). RGD wird wiederum von vielen, aber nicht von allen Integrinen erkannt und dient der Bindung des Rezeptors an das Matrixprotein (93, 95). In Versuchen wird das Tripeptid als kompetitiver Antagonist verwendet, der mit den jeweiligen extrazellulären Matrices oder anderen Liganden um die Bindungsstellen des Integrin-Rezeptors konkurriert und somit antagonistische Effekte auf die Integrin-Matrix-Interaktion ausüben kann. Der migrationshemmende Einfluss von RGD auf die Funktion des Vitronektin-Rezeptors  $\alpha_v\beta_5$ , der als migrationsfördernd gilt, wurde zuvor bereits von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt (73).

Die Hemmung der Migration glatter Gefäßmuskelzellen durch verschiedene HMG-CoA-Reduktasehemmer konnte in zahlreichen Versuchen nachgewiesen werden und zählt zu den cholesterolunabhängigen, pleiotropen Effekten. Die Bedeutung der Migrationshemmung für den Prozess der Atherogenese ergibt sich aus der Tatsache, dass glatte Gefäßmuskelzellen, die in gesunden Arterien in der Gefäßmedia residieren und einen differenzierten, kontraktilen Phänotyp aufweisen (96), in atherosklerotischen veränderten Gefäßen verstärkt in die Intima migrieren, proliferieren, Bindegewebe sezernieren, und auf diesem Weg zur Intimaverdickung und zur Plaquebildung beitragen (97, 98). Dieser Pathomechanismus ist auch entscheidend an der Entwicklung von Restenosen nach Koronarangioplastien oder Thrombendarteriektomien beteiligt (99, 100), wo als auslösender Faktor die interventionsbedingte Intimaverletzung angesehen wird. In nicht iatrogen „geschädigten“ Gefäßen werden Endothelverletzungen durch modifiziertes LDL-Cholesterin, arteriellen Hypertonus und viele andere Risikofaktoren begünstigt. Die Abhängigkeit der Migration / Chemotaxis von Integrin-Rezeptoren und deren Kontakt mit der Matrix ist grundsätzlich für zahlreiche Zellen bekannt und unter bestimmten Umständen von pathophysiologischer Bedeutung. Die Rolle der bekannten Integrin-Rezeptoren glatter Gefäßmuskelzellen und die Bedeutung ihres Kontaktes mit verschiedenen Matrices ist trotz intensiver Forschung bisher noch nicht vollständig geklärt. Als weitgehend gesichert gilt, dass Fibronektin und einer der wesentlichen Fibronektin-Rezeptoren ( $\alpha_5\beta_1$ ) die Migrations- und Proliferationsbereitschaft glatter Muskelzellen fördern und zur Intimaverdickung und Restenosierung nach Koronarangioplastien beitragen (101, 102, 103). Vergleichbare Eigenschaften werden

den Vitronektin-Rezeptoren  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  attestiert (73, 104, 105), während Laminin und seine Rezeptoren  $\alpha_7\beta_1$  (und  $\alpha_1\beta_1$ ) mit einem kontraktilen, differenzierten Phänotyp vergesellschaftet sind (106, 107, 108).

Über die Bedeutung der Kollagen-Rezeptoren  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_2\beta_1$  ist weniger bekannt. Kontrovers zu den Ergebnissen dieser Arbeit, die eine Abnahme der Chemotaxis unter Vermittlung der  $\alpha_2\beta_1$ -Integrine vermuten lassen, berichteten namhafte Autoren bereits von einem gegenteiligen Effekt dieser Rezeptoren bei vergleichbarem Versuchsaufbau und bei Verwendung der gleichen chemoattraktiven Substanz (79). Auf der anderen Seite weisen zahlreiche Ergebnisse darauf hin, dass die  $\beta_1$ -Integrine, somit auch die Kollagen-Rezeptoren  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_2\beta_1$ , die Adhäsion der Zellen an der Matrix verstärken, die Migration jedoch hemmen (109, 110). Die Aktivierung von  $\beta_1$ -Integrinen vermindert die PDGF-induzierte Migration, wie Seki et al. zeigen konnten, und in Tierversuchen war ein Rückgang der  $\beta_1$ -Integrinexpression nach interventioneller Schädigung der Gefäßwand in den migrierenden glatten Muskelzellen festzustellen (111).

In der vorliegenden Arbeit konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass HMG-CoA-Reduktasehemmer die Expression von  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin-Rezeptoren glatter Gefäßmuskelzellen steigern und hierdurch die durch diesen Rezeptor vermittelte Adhäsion an Kollagen I verstärken, während die PDGF-induzierte Chemotaxis vermindert wird. Die statininduzierte Adhäsionszunahme an Kollagen I infolge der Expressionssteigerung des Kollagen I-Rezeptors könnte zu den bekannten antimigratorischen Effekten der HMG-CoA-Reduktasehemmer beitragen. Unter Berücksichtigung der bestehenden Einschränkungen hinsichtlich der Übertragbarkeit experimentell erhobener Daten auf das Verhalten der Zellen in vivo, ist wahrscheinlich, dass die hier in vitro gezeigten Einflüsse von Atorvastatin und Pravastatin auf den  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin-Rezeptor und auf die Interaktion der glatten Gefäßmuskelzellen mit Kollagen I, sowohl in der kardiovaskulären Primär- als auch in der Sekundärprävention eine Rolle spielen könnten.

Die Antagonisierbarkeit des unter Statin-Einfluss veränderten, integrinvermittelten Adhäsions- (und Migrationsverhaltens) der vaskulären, glatten Muskelzellen durch Zugabe von Mevalonat oder Geranyl-Geraniol lässt auf eine ursächliche Beteiligung der gehemmten Isoprenoidbiosynthese schließen. Ein Zusammenhang mit der daraus folgenden Inaktivierung der isoprenoidabhängigen Rho-GTPasen ist anzunehmen, wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht unmittelbar erforscht. Für eine gezieltere



Untersuchung wäre die Durchführung dieser Experimente unter Verwendung Rho-spezifischer Antikörper erforderlich. Die bekannte Tatsache, dass Rho-GTPasen und Integrine in großem Ausmaß an denselben Zellfunktionen beteiligt sind, dass beide eng mit dem Zytoskelett verbunden sind, und dass beide gemeinsame Wege der Signaltransduktion regulieren können, macht einen Zusammenhang noch wahrscheinlicher. Vincent et al. konnten einen Mechanismus für die Hemmung der Migration von Endothelzellen nachweisen, der auf die Inaktivierung von Ras und RhoA zurückzuführen war, und infolge dessen eine Abnahme der Matrix-Metalloproteinase-2 Sekretion und eine Desorganisation von Aktin-Stressfasern zu beobachten waren (112).

Bei der Diskussion eines möglichen antiatherogenen Nutzens des gezeigten proadhäsiven und antimigratorischen Effekts gilt es mehrere potenzielle Einschränkungen zu berücksichtigen:

Die experimentellen Bedingungen der Zellkultur spiegeln nicht die natürliche Umgebung der Zellen in der Gefäßwand wider. Die Expression von Integrinen kann bei kultivierten und gefäßständigen Zellen erheblich variieren. Darüber hinaus sind Unterschiede der Integrin-Expression in gesunden und in atherosklerotisch veränderten Gefäßen bekannt, und auch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ist unter pathophysiologischen Bedingungen verändert. Skinner, Raines und Ross konnten anhand durchflusszytometrischer und immunzytochemischer Analysen zeigen, dass glatte Gefäßmuskelzellen gesunder Arterien überwiegend  $\alpha_1\beta_1$ -, aber nahezu keine  $\alpha_2\beta_1$ -Integrine exprimieren, wohingegen die Expression in kultivierten glatten Muskelzellen ein umgekehrtes Muster aufweist, also nahezu ausschließlich  $\alpha_2\beta_1$ -Integrine nachweisbar sind. Die Umkehrung der Verteilung begann unmittelbar nach Explantation und Isolation der Zellen aus humanen, gesunden Arterien und zeigte sich bereits während der ersten Passagen der Zellkultur (79). Weiterhin sind die Zellen in der Gefäßwand zahlreichen externen Stimuli ausgesetzt, zum Beispiel dem Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, dem Kontakt mit anderen Zellen und auch dem Kontakt mit mehr als nur einem Matrixprotein. Eine größere Klarheit hinsichtlich der tatsächlichen physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung verschiedener Integrin-Rezeptoren in vivo kann oftmals nur durch die zusätzliche Untersuchung krankhafter oder künstlich herbeigeführter Gendefekte erhalten werden. So besteht beispielsweise eine erhebliche Diskrepanz hinsichtlich der Forschungsergebnisse, die bei der Untersuchung der Vitronektin-Rezeptoren  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  erhoben werden

konnten (113). Während zahlreiche pharmakologische Studien unter Verwendung von Antikörpern oder Peptiden auf eine entscheidende Mitwirkung dieser Rezeptoren bei der Neovaskularisation hinwiesen und sie als möglichen Angriffspunkt therapeutischer Interventionen auszeichneten, konnte diese Annahme in genetischen Ablationsstudien (Knockout Mäuse) und bei der Untersuchung humaner Genmutationen überwiegend nicht bestätigt werden (114). Hingegen erwiesen sich die Ergebnisse pharmakologischer und genetischer Untersuchungen des spezifischen Fibronektin-Rezeptors  $\alpha_5\beta_1$  als nahezu durchgehend konkordant bezüglich der angiogenetischen Wirkung des Rezeptors und seines Liganden, und ein hemmender Antikörper (Volociximab) befindet sich im Stadium der klinischen Erprobung zur Behandlung solider Tumoren (115).

## 5. Zusammenfassung

HMG-CoA-Reduktasehemmer spielen eine entscheidende Rolle in der kardiovaskulären Primär- und Sekundärprävention. Neben der Senkung des LDL-Cholesterols ist der positive Effekt der Therapie mit HMG-CoA-Reduktasehemmern auf steroidunabhängige Faktoren, insbesondere auf die verminderte Bildung von Isoprenoiden, zurückzuführen. Hierdurch lassen sich zahlreiche protektive, direkte vaskuläre Effekte, unter anderem auf glatte Gefäßmuskelzellen begründen, die zu einer Verminderung der Migration und Proliferation dieser Zellen in der Gefäßintima und zu einer erhöhten Plaquestabilität beitragen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die HMG-CoA Reduktasehemmer Atorvastatin und Pravastatin die Adhäsion humaner, glatter Gefäßmuskelzellen (HSMCs) und aortaler glatter Gefäßmuskelzellen von Ratten (RASMCs) an Kollagen I, einem Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix in Gefäßwänden, durch eine vermehrte Expression von  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin-Rezeptoren verstärken. Die  $\alpha_2\beta_1$ -Integrine der glatten Gefäßmuskelzellen sind als die wichtigsten Rezeptoren für Kollagen I bekannt. Eine Stimulation der Zellen mit Atorvastatin (0,1  $\mu\text{M}$ ) führte bis zur Verdopplung der Adhäsion humaner glatter Gefäßmuskelzellen an Kollagen I ( $p < 0,01$ ), Pravastatin verstärkte die Adhäsion bis zu 1,8-fach ( $p < 0,01$ ) nach einer Stimulationsdauer von mindestens 24 Stunden. Die Zugabe von Mevalonat oder dem Isoprenoid Geranyl-Geraniol verhinderte den statininduzierten Effekt auf die glatten Gefäßmuskelzellen, sodass als Ursache der beobachteten Adhäsionszunahme eine Abhängigkeit von der verminderten Isoprenoidbiosynthese und einer hierdurch verursachten Inaktivierung der isoprenoidabhängigen Rho-GTPasen anzunehmen ist.

Durchflusszytometrische Untersuchungen erbrachten den Nachweis einer gesteigerten Expression von  $\alpha_2$ - und  $\beta_1$ -Integrinen nach Vorbehandlung der Zellen mit Atorvastatin (0,1  $\mu\text{M}$ ) für 24 bzw. 48 Stunden. Die PCR-Analysen zeigten, dass Atorvastatin den Gehalt an  $\beta_1$ -Integrin-mRNA nach 16- und nach 24-stündiger Stimulationsdauer signifikant ansteigen ließ. Der Effekt war reversibel nach Zugabe von Mevalonat. Weiterhin hemmten Atorvastatin und Pravastatin die PDGF-induzierte Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen auf Kollagen I. Im Gegensatz dazu verdoppelte die

Inhibition von  $\beta_1$ -Integrinen mit dem spezifischen Antikörper P5D2 die Migrationsrate der Zellen nahezu.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die HMG-CoA-Reduktasehemmer Atorvastatin und Pravastatin die Interaktion glatter Gefäßmuskelzellen mit dem extrazellulären Matrixprotein Kollagen I durch eine Induktion der  $\alpha_2\beta_1$ -Integrine verstärken und dass dieser Prozess von einer Inaktivierung der Rho-GTPasen abhängig ist.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Eur J Biochem.* 1977;77:31-36.
2. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986;232:34-47.
3. Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninkhake D. Comparative dose efficacy of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (The CURVES Study). *Am J Cardiol* 1998; 81 (5):582-587.
4. Shephert J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin im men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333:1303-1307.
5. Downs JR, Clearfield M, Weis S, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels. Results of AFCAPS/TexCAPS. *JAMA* 1998; 279 (20):1615-1622.
6. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomized trial of cholesterol lowering therapy in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344:1383-1389.
7. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, et al for the Cholesterol and Recurrent Events Trial Investigators. The effect of pravastatin on recurrent coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Engl J Med* 1996; 335:1001-1009.
8. The Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with

coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med* 1998; 339:1349-1357.

9. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease: the Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1971; 74:1-12.

10. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is the relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986; 256:2823-2828.

11. Takemoto M, Liao JK. Pleotropic Effects of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1712-1719.

12. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, et al. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 285:1711-1718.

13. Walters D, Higginson L, Gladstone P. Effects of monotherapy with an HMG-CoA reductase inhibitor on the progression of coronary artery arteriosclerosis as assessed by serial quantitative arteriography. The Canadian Intervention Trial. *Circulation* 1994; 89:959-968.

14. Brown BG, Hillger L, Zhao XQ, Poulin D, Albers JJ. Types of change in coronary stenosis severity and their relative importance in overall progression and regression of coronary disease: observations from the FATS Trial: Familial Atherosclerosis Treatment Study. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 748:407-418.

15. MAAS Investigators. Effect of simvastatin on coronary atheroma. The Multicenter Anti-Atheroma Study (MAAS). *Lancet* 1994; 344:633-638.

16. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *New Engl J Med* 1976; 295:369-377, 420-425.
17. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995; 270:319-324.
18. Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesion of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993; 69:30-37.
19. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *New Engl J Med* 1999; 340:115-126.
20. Bellosta S, Bernini F, Ferri N, et al. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis* 1998; 137:101-109.
21. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343:425-430.
22. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 1998; 273:24266-24271.
23. Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27 (Kip1). *J Biol Chem* 1999; 274:21926-21931.
24. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997; 11:2295-2322.
25. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 270:509-514.
26. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97:1129-1135.

27. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-809.
28. Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: Role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15:1667-1687.
29. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Dzau VJ. Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation* 1998; 98:82-89.
30. Negre-Aminoux P, van Vliet AK, van Erck M et al. Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors: comparison with other human cell types. *Biochem Biophys Acta* 1997; 1345:259-268.
31. Raiteri M, Arnaboldi L, Mc Geady P, et al. Pharmacological control of the mevalonate pathway: Effect on arterial smooth muscle cell proliferation. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281:1144-1153.
32. Soma MR, Parolini C, Donetti E, Fumagalli R, Paoletti R. Inhibition of isoprenoid biosynthesis and arterial smooth muscle cell proliferation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25:20-24.
33. Corsini A, Arnaboldi L, Raiteri M, et al. Effect of the new HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin (BAY W 6228) on migration, proliferation and cholesterol synthesis in arterial myocytes. *Pharmacol Res* 1996; 33:55-61.
34. Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, et al. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2001; 154:87-96.
35. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997; 100:2153-2157.



36. Wassermann S, Laufs U, Baumer AT, et al. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension* 2001; 37:1450-1457.
37. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:61-69.
38. Fuster V. Elucidation of the role of plaque instability and rupture in acute coronary events. *Am J Cardiol* 1995; 76:24C-33C.
39. Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis: evolving concepts. *Circulation* 1990; 82(suppl II):II-47-II-59.
40. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: Role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J* 1993;69:377-381.
41. Burleigh MC, Briggs AD, Lendon CL, Davies MJ, Born GV, Richardson PD. Collagen types I and II, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: Snap-wise variations. *Atherosclerosis* 1992;96:71-81.
42. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. *Circulation* 1994; 90: 775-776.
43. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, et al. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques: potential role of matrix degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 1995; 92:1565-1569.

44. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995; 77:863-868.
45. Bellosta S, Canavesi VM, Pfister P, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1671-1678.
46. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, et al. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases, and tissue factor in vivo, and in vitro. *Circulation* 2001; 103:276-283.
47. Wong B, Lumma WC, Smith AM, Sisko JT, Wright SD, Cai TQ. Statins suppress THP-1 cell migration and secretion of matrix metalloproteinase 9 by inhibiting geranylgeranylation. *J Leukoc Biol* 2001; 69:959-962.
48. Bernini F, Didoni G, Bonfadini G, Bellosta S, Fumagalli R. Requirement for mevalonate in acetylated LDL induction of cholesterol esterification in macrophages. *Atherosclerosis* 1993; 104:19-26.
49. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Sha PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation* 2001; 103:926-933.
50. Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 2004; 265:23-32.
51. Ahmed F, Wyckoff J, Lin EY, et al. GFP expression in mammary gland for imaging of mammary tumor cells in transgenic mice. *Cancer Res* 2002; 62:7166-7169.
52. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997; 389:990-994.

53. Katsumata N, Shimokawa H, Seto M, et al. Enhanced myosin light chain phosphorylations as a central mechanism for coronary artery spasm in a swine model with interleukin-1beta. *Circulation*. 1997; 96:4357-4363.
54. Laufs U, Liao JK. Targeting rho in cardiovascular disease. *Circ Res* 2000; 87:526-528.
55. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin Signaling. *Science* 1999; 285:1028-1033.
56. Clyman RI, Turner DC, Kramer RH. An alpha 1/beta 1-like integrin receptor on rat aortic smooth muscle cells mediates adhesion to laminin and collagen types I and IV. *Arteriosclerosis* 1990; 10:402-209.
57. Clyman RI, McDonald KA, Kramer RH. Integrin receptors on aortic smooth muscle cells mediate adhesion to fibronectin, laminin, and collagen. *Circ Res* 1990; 67:175-186.
58. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48:549-554.
59. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; 268:233-239.
60. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25.
61. Turner CE, Burridge K. Transmembrane molecular assemblies in cell-extracellular matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3:849-853.
62. Clark EA, King WG, Brugge JS, et al. Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol* 1998; 142:573-586.
63. Wayner EA, Gil SG, Murphy GF, et al. Epiligrin, a component of epithelial basement membranes, is an adhesive ligand for alpha 3 beta 1 positive T lymphocytes. *J Cell Biol* 1993; 121:1141-1152.

64. Huhtala P, Humphries MJ, Mc Carthy JB, et al. Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *J Cell Biol* 1995; 129:867-879.
65. 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: American Physiology Society; 1988:69-91.
66. Kappert K, Schmidt G, Doerr G, et al. Angiotensin II and PDGF-BB stimulate beta (1)-integrin-mediated adhesion and spreading in human HSMCs. *Hypertension* 2000; 35:255-261.
67. Liaw L, Almeida M, Hart CE, Schwartz SM, Giachelli CM. Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ Res.* 1994; 74:214-224.
68. Graf K, Xi XP, Yang D, et al. Mitogen-activated protein activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1997; 29:334-339.
69. Law RE, Meehan WP, Xi XP, et al. Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest* 1996; 98:1897-1905.
70. Kaup D. Wirkung der AT2-Überexpression auf Collagen I  $\alpha$  2-mRNAGehalt und Migration porciner kardialer Fibroblasten. Dissertation, Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin, 2003.
71. 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; 97:1818-1827.

72. Regitz-Zagrosek V, Fielitz J, Hummel M, Hildebrandt AG, Hetzer R, Fleck E. Decreased expression of ventricular angiotensin receptor type 1 mRNA after human heart transplantation. *J Mol Med* 1996; 74:777-782.
73. Kappert K, Blaschke F, Meehan WP, et al. Integrins  $\alpha$ v $\beta$ 3 and  $\alpha$ v $\beta$ 5 mediate HSMC migration and are elevated during neointima formation in the rat aorta. *Basic Res Cardiol* 2001; 96:42-49.
74. Axel DI, Riessen R, Runge H, et al. Effects of cerivastatin on human arterial smooth muscle cell proliferation and migration in transfilter cocultures. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35:619-629.
75. Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1988; 107:307-319.
76. Carey DJ. Controls of growth and differentiation of vascular cells by extracellular matrix proteins. *Annu Rev Physiol* 1991; 53:161-177.
77. Mosher DF, Sottile J, Wu C, McDonald JA. Assembly of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4:810-818.
78. Heickendorff L. Laminin, fibronectin and type IV collagen in BM-like material from cultured arterial smooth muscle cells. *Int J Biochem* 1988; 20:381-386.
79. 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; 145:1070-1081.
80. Scott W. Hydrophilicity and the differential pharmacology of pravastatin. In: Wood C, editor. *Lipid Management: Pravastatin and the Differential Pharmacology of HMG-CoA*

Reductase Inhibitors. London Round Table Series no 16. London: Royal Society of Medicine Service, 1989:17-25.

81. Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6:329-357.

82. Ginsberg MH, Du X, Plow EF. Inside-out integrin signalling. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4:766-771.

83. Manning DR, Brass LF. The role of GTP-binding proteins in platelet activation. *Thromb Haemost* 1991; 66:393-399.

84. Shattil SJ, Brugge JS. Protein tyrosine phosphorylation and the adhesive functions of platelets. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3:869-879.

85. Sastry SK, Horwitz AF. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5:819-831.

86. Hernández-Perera O, Pérez-Sala D, Soria E, Lamas S. Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. *Circ Res* 2000; 87:616-622.

87. Pruefer D, Scalia R, Lefer AM. Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2894-2900.

88. Voss B, Rauterberg J. Localization of collagen types I, III, IV and V, fibronectin and laminin in human arteries by the indirect immunofluorescence method. *Path Res Pract* 1986; 181:568-575.

89. Kern A, Eble J, Golbik R, Kühn K. Interaction of type IV collagen with the isolated integrins  $\alpha_1\beta_1$  and  $\alpha_2\beta_1$ . *Eur J Biochem* 1993; 215:151-159.

90. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996; 84:345-357.
91. Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994; 77:477-478.
92. Bornfeldt KE, Raines EW, Nakano T, Graves LM, Krebs EG, Ross R. Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signalling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest* 1994; 93:1266-1274.
93. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987; 238:491-496.
94. Dedhar S, Ruoslahti E, Pierschbacher MD. A cell surface receptor complex for collagen type I recognizes the Arg-Gly-Asp sequence. *J Cell Biol* 1987; 104:585-593.
95. Yamada KM, Kennedy DW. Peptide inhibitors of fibronectin, laminin, and other adhesion molecules: Unique and shared features. *J Cell Physiol* 1987; 130:21-28.  
Clyman
96. Campbell GR, Campbell JH, Manderson JA, Horrigan S, Rennick RE. Arterial smooth muscle: A multifunctional mesenchymal cell. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112:977-986.
97. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983; 49:327-333.
98. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest* 1983; 49:208-215.

99. Schwartz SM. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest* 1997; 99:2814-2817.
100. Liu MW, Roubin GS King SB. Restenosis after coronary angioplasty: potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation* 1989; 1374-1387.
101. Yee KO, Rooney MM, Giachelli CM, et al. Role of  $\beta 1$  and  $\beta 3$  integrins in human smooth muscle cell adhesion to and contraction on fibrin clots in vivo. *Circ Res* 1998; 83:241-251.
102. Pickering JG, Chow LH, Li SH, et al.  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression and luminal edge fibronectin matrix assembly by smooth muscle cells after arterial injury. *Am J Pathol* 2000; 156:453-465.
103. Mercurius KO, Morla AO. Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by inhibition of fibronectin matrix assembly. *Circ Res* 1998; 82:548-556.
104. Dufourcq P, Louis H, Moreau, et al. Vitronectin expression and interaction with receptors in smooth muscle cells from human atheromatous plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:168-176.
105. Corjay MH, Diamond SM, Schlingmann KL, et al.  $\alpha \beta 3$  and  $\alpha \beta 5$  and osteopontin are coordinately upregulated at early time points in a rabbit model of neointima formation. *J Cell Biochem* 1999; 75:492-504.
106. Thyberg J, Blomgren K, Roy J, et al. Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem* 1997; 45:837-846.
107. Thyberg J, Hultgardh-Nilsson A. Fibronectin and the basement-membrane components laminin and collagen type-IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth-muscle cells differently. *Cell Tissue Res* 1994; 276:263-271.



108. Yao CC, Breuss J, Pytela R, et al. Functional expression of the  $\alpha 7$  integrin receptor in differentiated smooth muscle cells. *J Cell Sci* 1997; 110:1477-1487.
109. Seki J, Koyama N, Kovach NL, et al. Regulation of  $\beta 1$ -integrin function in cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1996; 78:596-605.
110. 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; 200:272-284.
111. Koyama N, Seki J, Vergel S, et al. Regulation and function of an activation-dependent epitope of the  $\beta 1$  integrins in vascular cells after balloon injury in baboon arteries and in vitro. *Am J Pathol* 1996; 148:749-761.
112. Vincent L, Chen W, Hong L, et al. Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effects. *FEBS Lett* 2001; 495:159-166.
113. Hynes RO. Cell-matrix adhesion in vascular development. *J Thromb Haemost* 2007; 5:32-40.
114. Reynolds L, Wyder L, Lively JC, et al. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking  $\beta 3$ -integrin or  $\beta 3$ - and  $\beta 5$ -integrins. *Nat Med* 2002; 8:27-34.
115. Ramakrishnan V, Bhaskar V, Law DA, et al. Preclinical evaluation of an anti- $\alpha 5\beta 1$  integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent. *J Exp Ther Oncol* 2006; 5:273-286.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ato	Atorvastatin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
Co	Control, Kontrolle
CoA	Coenzym A
CSE-Hemmer	Cholesterol-Synthese-Enzym-Hemmer
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DPEC	Diethylprocarbonat
ECM	Extracellular matrix, extrazelluläre Matrix
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid (NO)-Synthetase
et al.	et alii, und andere
ERK	Extracellular regulated kinase
FACS	Fluorescence absorbent cell sorting, Durchflußzytometrie
FAK	Focal adhesion kinase
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
F-PP	Farnesyl-Pyrophosphat
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatase-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GG-PP	Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat
Ger	Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
HVSMC	Humane glatte Gefäßmuskelzelle
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
Ko	Kontrolle
L	Liter

LDL	Low density lipoprotein, Lipoprotein niedriger Dichte
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase
Mev	Mevalonat
μM	Mikromolar
Min	Minuten
mM	millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinase
ml	Milliliter
mRNA	Messenger ribonuclein acid, Boten-Ribonukleinsäure
NO	Nitritoxid, Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase chain reaktion, Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PKC	Protein Kinase C
Pra	Pravastatin
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatpufferlösung
RASMC	Ratten-Aorta Gefäßmuskelzelle
RNA	Ribonuclein acid, Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse transcription and polymerase chain reaction
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the mean
VSMC	Vascular smooth muscle cell, glatte Gefäßmuskelzelle
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
z. B.	zum Beispiel

## **8. Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Kristof Graf für die Vergabe des interessanten Themas und für die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Frau Chantel Spencer-Haensch danke ich herzlich für ihren Beistand im Labor, ihre Kompetenz, ihren Humor und ihre Menschlichkeit. Über schwierige Situationen hat mir dieser Zuspruch sehr oft hinweg geholfen.

An dieser Stelle möchte ich auch Brigitte Wollert-Wulff, Britta Hannack und Heike Kallisch dankend erwähnen, die mir mit vielen technischen Tipps und Anregungen zur Seite standen.

Meinen Eltern Michael und Uta Bokemeyer, meinem Bruder Joachim Bokemeyer und meinen Großmüttern gilt mein besonderer Dank, nicht nur für die finanzielle, moralische und beratende Unterstützung während dieser Arbeit. Meine Familie hat mir durch Akzeptanz und Vertrauen viel Kraft gegeben, innere und äußere Hindernisse überwinden zu können.

Für seine Beratung und Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit und für die liebevolle Begleitung danke ich meinem Freund Dr. Daniel Kaup.

Auch meinen Freunden Rainer Löwe, Dr. Peer Scharnberg, Dr. Katharina Friedrich, Dr. Almut Giese und Dr. Peter Baier sei sehr herzlich gedankt für die treue Begleitung und für viele motivierende und erfüllende Momente, privat und beruflich.

Zuletzt möchte ich meiner im Juli 2001 verstorbenen Freundin Viktoria Deecke Dank sagen. Ihre innige Zuneigung, ihre Wärme und Lebensfreude, ihre tiefe Freundschaft zu mir und die schöne gemeinsame Zeit in Berlin, erfüllen mich noch immer mit Zuversicht und Liebe.

## **9. Lebenslauf**

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

## 10. Publikation

Graf K, Kappert K, Stawowy P, Bokemeyer J, Blaschke F, Schmidt G, Kintscher U, Goetze S, Fleck E. Statins Regulate  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin Expression and Collagen I-Dependent Functions in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2003; 41:89–96.

Vortrag beim “2nd European Meeting on Vascular Biology and Medicine” in Ulm am 29.09.2001.

## **11. Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Einfluss von Statinen auf Beta-1-Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Interaktion zwischen vaskulären, glatten Muskelzellen und Kollagen I“ eigenständig verfasst habe, ohne die Hilfe Dritter und ohne Nutzung anderer Quellen als die hier angegebenen. Die Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar.

Berlin, 24.02.2009

Johanna Bokemeyer