

Der Einfluss von N-Cadherin auf die Migration
glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen der Restenoseentstehung

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Julia Stein geb. Dammers

aus Duisburg

Berichter: Herr Privatdozent
Dr. med. Rüdiger Blindt

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Christian Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Atherosklerose	5
1.2	Aufbau der Gefäßwand	7
1.3	Glatte Gefäßmuskelzellen	8
1.4	PTCA	9
1.5	Restenose	10
1.5.1	Phasen der Restenose	10
1.5.2	In-Stent-Restenose	12
1.5.3	Therapie und Prävention der Restenose	12
1.6	Migration und Invasion glatter Gefäßmuskelzellen	14
1.7	Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen	15
1.8	Cadherine	16
1.9	Aktin-Zytoskelett	17
1.10	Ziele	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Zellkultur	21
2.1.1	Zellkulturbedingungen	21
2.1.2	Immunfluoreszenz von Zellen	23
2.1.3	Induktion des Phänotyps	24
2.2	Chemotaxis	25
2.3	Vektorkonstrukte und transiente Transfektion	26
2.4	N-Cadherin-Blockade	29
2.5	Subzelluläre Fraktionierung von Rho A	29
2.6	Western-Blot	29
2.7	Expressionsanalyse im porcinen Restenosemodell	30
2.8	Immunhistochemie	31
2.9	Statistische Analyse	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Expression von N-Cadherin und β -Catenin in vitro	33
3.2	Reduktion des Migrationspotentials durch Transfektion mit N-Cadherin .	35
3.3	Wiederherstellung des Migrationspotentials durch N-Cadherin-Blockade .	35
3.4	N-Cadherin beeinflusst Migration durch Modulation der RhoA-Aktivität .	39
3.5	N-Cadherin beeinflusst das Aktin-Zytoskelett durch Modulation von RhoA	42
3.6	N-Cadherin-Expression in vivo	42

4 Diskussion	49
4.1 Bedeutung von N-Cadherin für die Migration und Proliferation von SMCs	49
4.2 Induktion von Zellmigration durch Veränderung der N-Cadherin-Expression	51
4.3 Assoziation von N-Cadherin-Expression und Modulation des Zytoskeletts	51
5 Zusammenfassung	53
Literatur	55
Abbildungsverzeichnis	60
Danksagung	64
Lebenslauf	65

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose stellt die wichtigste und häufigste krankhafte Veränderung der Arterien dar und gilt als Ursache für die meisten Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems. Sie ist eine entzündliche Veränderung der Gefäßwand mit einer Vielzahl exogener und endogener Ursachen (Hypertonie, Diabetes mellitus, Toxine, u.v.m.), der unterschiedliche pathogenetische Prozesse zugrunde liegen [1], [2].

Die Einteilung der Stadien erfolgt nach morphologischen Kriterien und wurde von der *American Heart Association* (AHA) wie folgt vorgenommen:

Typ I

Bei der Typ I-Läsion, auch als *initial lesion* bezeichnet, zeigen sich lediglich mikroskopische Veränderungen mit Einlagerung von Lipoproteinen unter der Endothelschicht mit nachfolgender Einwanderung von Monozyten und T-Lymphozyten. Makroskopisch sind noch keine Veränderungen zu sehen.

Typ II

Werden die subendothelial eingelagerten Lipoproteine von den Monozyten aufgenommen, bilden sich die sogenannten fettigen Streifen (*fatty streaks*). Diese sind auch mit dem bloßen Auge sichtbar und imponieren an der Gefäßwand als gelbliche Läsionen, die parallel zum Blustrom ausgerichtet sind. Sie entstehen durch die Umwandlung der Monozyten zu Makrophagen, die durch Aufnahme von Lipoproteinen die sogenannten Schaumzellen (*foam cells*) bilden. Zudem fallen einige wenige lipidbeladene Muskelzellen auf. Es bestehen noch keine extrazellulären Lipidablagerungen.

Die initialen Läsionen (Typ I und II) können schon im frühen Kindesalter beobachtet werden, bilden sich aber oft auch spontan wieder zurück.

Typ III

Dieser Typ gilt als Intermediärtyp bzw. *Präatherom* und stellt eine Übergangsform zwischen Typ II und IV dar. Es finden sich zunehmend extrazelluläre Lipidtropfen, die zwischen den eingewanderten Zellen liegen und Kontakt zur Zellmembran haben können.

Diese Partikel können bereits den Muskelzellverband unterbrechen, sind aber noch nicht als Kern organisiert.

Keine dieser drei Frühformen atherosklerotischer Läsionen geht mit einer klinischen Symptomatik einher.

Typ IV

Verbinden sich die Lipidtropfen zu größeren Feldern, die eine Art Kern bilden und die Zellen der Intima auseinanderreiben, spricht man von einer Typ IV-Läsion. Diese Läsion wird auch als *Atherom* bezeichnet. Die Struktur der Intima wird dabei mehr und mehr aufgehoben, so dass dieses Stadium als fortgeschritten gilt. Die interzelluläre Matrix ist hier durch die eingelagerten Lipide ersetzt und die Wandstruktur aufgehoben. Es liegt noch keine fibröse Reaktion des umliegenden Gewebes vor.

Das Auftreten dieser Läsion nimmt mit steigendem Alter zu und kann übergangslos in den komplizierten Typ VIc übergehen.

Typ V

Bei diesem Typ handelt es sich um das sogenannte *Fibroatherom*, die typische atherosklerotische Läsion, auch arteriosklerotischer Plaque genannt. Der Plaque beinhaltet einen Lipidkern, der bindegewebig mit dicken Schichten zusammenhängender Fasern (Kollagen I und III, Glykoproteine) umbaut ist. In einem Teil der Fälle lagert sich zusätzlich Calcium in die Läsion ein. Die Oberfläche des Plaque ist von einer Endothelschicht bedeckt, die Thrombosen verhindert. Ihre Beeinträchtigung hat häufig das Auftreten von Komplikationen zur Folge.

Makroskopisch zeigt sich ein gelblicher, mehr oder weniger ausgebreiteter Plaque im Gefäßlumen. Oft finden sich gleich mehrerer solcher Läsionen, die eine Art Plaquet Teppich bilden.

Die klinische Bedeutung dieses Typs ist abhängig vom Grad der Stenose. Klinische Relevanz besteht erst bei höhergradiger Einengung des Gefäßlumens, so dass eine einfache Atherosklerose dieses Typs nicht ausreicht, das Lumen größerer Gefäße entscheidend zu vermindern. Für die kleinelumigen Koronararterien bedeutet dies jedoch, dass auch diese Art der Plaque schon zu klinischen Symptomen führen kann.

Typ VI

Die Typ VI-Läsion ist der sogenannte komplizierte atherosklerotische Plaque. Eine der Komplikationen kann auch bei weniger ausgedehnten Vorbefunden auftreten, die mit den üblichen kardiovaskulären Voruntersuchungen nicht nachgewiesen wurden. Die AHA unterscheidet folgende Subtypen:

Typ VIa: Ulzeration bzw. Plaqueruptur

Typ VIa ist gekennzeichnet durch einen Substanzverlust an der Plaqueoberfläche. Unter Umständen sind die Fissuren so fein, dass sie auch mikroskopisch nur schwer zu erkennen sind.

Typ VIb: Hämorrhagie oder Hämatom

Hierbei gelangt Blut in den Plaque, wobei vor allem der Lipidkern betroffen ist, und kann so eine rasche Vergrößerung des Volumens verursachen. Diese Komplikation ist relativ häufig und führt oft zu klinischen Symptomen. In einigen Fällen liegt zusätzlich eine Ulzeration vor.

Typ VIc: Thrombose

Die Thrombose stellt die wichtigste Komplikation der Atherosklerose dar. Der zugrundeliegende Plaque muss nicht notwendigerweise besonders groß sein. Entscheidend ist der Verlust der thromboresistenten endothelialen Oberfläche, sei es funktionell oder anatomisch, im Rahmen einer Ulzeration. Die Folge kann eine vollständige Okklusion des Gefäßlumens sein oder lediglich ein Teilverschluss. Der Thrombus kann in der Folgezeit durch verschiedene Mechanismen organisiert und stabilisiert werden. Hierzu gehören die Einwanderung von Makrophagen, Einlagerung von Fibrin und dadurch Immobilisation von Zellen, sowie schließlich eine Neovaskularisation. Die Gefahr einer Embolie nimmt dadurch ab.

1.2 Aufbau der Gefäßwand

Der mikroskopische Aufbau der normalen Arterienwand ist durch eine Dreischichtung gekennzeichnet. Von außen nach innen sind dies die Tunica externa (*Adventitia*), die Tunica media (*Media*) und die Tunica interna (*Intima*) (siehe Abbildung 1).

Die Adventitia, die mit dem umliegenden Gewebe in engem Kontakt steht, besteht vornehmlich aus Kollagenfibrillen, einem lockeren Netz elastischer Fasern und einigen Mastzellen. Zusätzlich finden sich hier Gefäße und Nerven.

Die Tunica media enthält eine unterschiedlich große Menge glatter Muskelzellen, die ringförmig angeordnet sind und als einziger zellulärer Anteil einen Großteil dieser dicksten Schicht ausmachen. Die Muskelzellen produzieren die sie umgebende extrazelluläre Matrix. Darin finden sich hauptsächlich kollagene Fasern vom Typ I und II, Fibronektin und Proteoglykane. Zudem wird die Media von elastischem Material durchzogen, das sich nach außen zur Adventitia als Membrana elastica externa und nach innen zur Membrana elastica interna verdichtet.

Die innere Wandschicht, die Intima, besteht aus einem dünnen bindegewebigen Stratum subendotheliale, in dem sich ebenfalls einzelne Muskelzellen finden, und endet

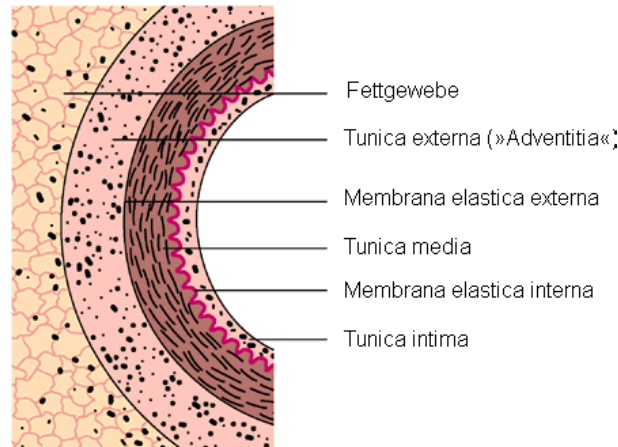


Abbildung 1: Aufbau der Arterienwand^a

^aaus: Sobotta, Hammersen: Histologie. Urban und Schwarzenberg, München, 1985

nach innen mit der Endothelschicht. Das Endothel übernimmt neben metabolischen Funktionen auch eine wesentliche Rolle in der Regulierung des Gefäßtonus (vermittelt über Stickstoffmonoxid [NO]) und der Blutgerinnung (über PDGF [*Platelet-derived Growth Factor*], vWF [von-Willebrand-Faktor], Faktor V und weitere).

1.3 Glatte Gefäßmuskelzellen

In der medialen Wand humaner Arterien finden sich vornehmlich glatte Muskelzellen, deren Tonus, anders als der der meisten Skelettmuskelzellen, dem vegetativen Nervensystem unterliegt. Glatte Muskelzellen finden sich zudem in der Wand vieler Hohlorgane.

Um die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen nachvollziehen zu können, ist es nötig, die hierbei beteiligten Zellen näher zu betrachten. Hierbei ist vor allem die Morphologie glatter Muskelzellen und deren Verhalten im Zellverband von Bedeutung.

Die glatten Gefäßmuskelzellen (SMCs [*smooth muscle cells*]) der Tunica media sind hochspezialisierte Zellen, deren Hauptfunktion die Kontraktion und die Regulation des Blutgefäßdurchmessers und damit des arteriellen Blutdrucks ist. Im Gegensatz zu Skelett- oder Herzmuskelzellen, die vollständig ausdifferenziert sind, behalten SMCs auch im adulten Organismus eine beachtliche Plastizität und können, als Reaktion auf Veränderungen in der lokalen Umgebung, tiefgreifende, aber reversible Veränderungen ihres Phänotyps vornehmen [3]. Diese Plastizität und Variabilität des Phänotyps erlauben es den glatten Muskelzellen, ein großes Spektrum von physiologischen Funktionen zu übernehmen und gleichzeitig auf Verletzungen oder Entzündung der Gefäßwand zu reagieren.

Diese Variabilität lässt sich bei der Betrachtung ihres embryologischen Ursprung nachvollziehen. Während der Embryogenese zeigt sich eine starke Produktion von

extrazellulärer Matrix (EZM) und eine deutliche Expression von SMC-Marker-Genen [4]. In der normalen, adulten Gefäßwand sind diese Prozesse stark reduziert. Hier weisen die SMCs eine sehr niedrige Proliferationsrate auf, zeigen eine niedrige Syntheseaktivität für extrazelluläre Matrixproteine und exprimieren nur einen bestimmten Pool kontraktiler Proteine, Ionenkanäle und Signalmoleküle, die diesen kontraktilen Zelltyp charakterisieren. Darunter finden sich unter anderem SM- α -Aktin, SM-MHC (I, II), Calponin, SM22 α , Desmin, Caldesmon, Metavinculin und Smoothelin [5]. Dieser Phänotyp wird auch als konfluenter oder quieszenter Typ bezeichnet. Er hat eine niedrige Tendenz zur Zellteilung und Proliferation, ist ortsständig und neigt nicht dazu, durch Migration in andere Zellwandschichten zu wandern. Der quieszente Typ zeigt einen hohen Gehalt an Myofilamenten und hat ein ausgeprägtes Zytoskelett mit starker Zell-Zell-Adhäsion. Seine Aufgabe besteht vornehmlich in der Kontraktion der Gefäßwand. In dieser Phase ist die Syntheserate für EZM-Proteine und die der meisten SMC-Marker-Gene extrem gering, kann sich aber im Falle einer Störung dieses Gleichgewichtes, beispielsweise durch Verletzung der Arterienwand oder andere kardiovaskuläre Erkrankungen, schnell verändern. Dieser als *phenotypic modulation* oder *switching* bezeichnete Vorgang geht einher mit einem hohen Potential zur Zellteilung (Proliferation) und Zellwanderung (Migration) der SMCs. Der auch als synthetisierender Typ bezeichnete Phänotyp produziert vermehrt Proteine der extrazellulären Matrix (Sekretion) [6] und zeigt eine verminderte Expression der selektiven SMC-Marker-Gene. Im Vergleich zu den Zellen des quieszenten Typs finden sich deutlich weniger kontraktile Filamente und Zytoskelett-Proteine. Statt dessen exprimiert dieser Zelltyp viele Zellorganellen (Golgiapparat, Endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen) und kann so bei Reparaturvorgängen der Gefäßwand mitwirken [7].

1.4 PTCA

Die perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) ist eine Methode, mit der Koronararterien, die atherosklerotisch verändert oder anderweitig verengt sind, minimalinvasiv aufgeweitet werden können. Seit ihrer Einführung 1977 ist die PTCA mit mehr als 1,5 Millionen Behandlungen weltweit (250.000 allein in Deutschland) zu einer der wichtigsten Behandlungsmethoden der KHK geworden [8].

Bei der PTCA wird ein Katheter in das betroffene Gefäß eingeführt und bis zur Engstelle vorgeschoben. Dort wird das Gefäßlumen durch Plaqueverdrängung und Kompression mittels eines Ballons aufgeweitet.

Eine wesentliche Bereicherung der interventionellen Therapie stellte Mitte der 90er Jahre die Einführung von Gefäßstützen aus Metall, sogenannten *Stents* dar, die im selben Arbeitsschritt in das Gefäß eingebracht werden können. Sie wirken der Rückstellung der Gefäße, dem sogenannten *recoil* der Gefäßwand entgegen und helfen so, das Lumen offen zu halten.

Die mechanischen Eigenschaften der Arterienwand, die durch eingelagerte Fasern und Zellen bestimmt werden, bedingen diese elastische Rückstellkraft der Gefäße. Diese kann bewirken, dass sich das Gefäß nach erfolgter Aufweitung mittels PTCA wieder erheblich verengt.

Die Größe von Recoil und Endvolumen sind dabei stark abhängig von der Ballongröße und der Stenoseform. Das Endvolumen ist dabei umso größer, je größer der Ballon gewählt wurde und der Recoil umso stärker je mehr die Stenose exzentrische Form aufweist [9].

Weitere Komplikationen der PTCA können Blutungen oder ein Herzinfarkt sein. Außerdem besteht das Problem der Restenose (s.u.), das trotz Verbesserung der Technik sechs Monate nach PTCA-Behandlung noch bei 30-40% liegt. Das Einlegen eines Stents wirkt dieser Komplikation zwar entgegen, doch ist auch hier bei etwa 20-30% mit einer Restenose zu rechnen [10].

Eines der Ziele der derzeitigen Forschung richtet sich auf die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften und der Biokompatibilität, die entscheidend die entzündlichen und proliferativen Prozesse in der Gefäßwand beeinflussen [11].

1.5 Restenose

Als Restenose bezeichnet man einen Wiederverschluss des Gefäßes nach Therapie einer Stenose durch eine PTCA-Behandlung.

Blutgefäße, die einer Angioplastie unterzogen werden, reagieren auf das Trauma durch den Katheter mit einer Reihe von thrombotischen und zellulären Veränderungen. Darunter die frühe Plättchenakkumulation, die Replikation medialer SMCs sowie die Migration von glatten Muskelzellen in die Gefäßintima [12], [13].

Ursachen eines Wiederverschlusses sind demnach zum einen die elastische Eigenschaft der Arterienwand, der mit der Einlage eines Stents entgegengewirkt werden soll, zum anderen die oben genannten zellulären Mechanismen, die im Folgenden näher erläutert werden. Die Restenose erfordert häufig einen erneuten Eingriff und stellt somit ein großes sozio-ökonomisches Problem im Rahmen der KHK-Therapie dar.

1.5.1 Phasen der Restenose

1) Thrombusbildung

Unmittelbar nach Verletzung der Gefäßwand durch eine PTCA kommt es zur Bildung von Thromben. Diese entstehen durch die Verletzung der Endothelschicht während der Aufdehnung mit dem Ballon. Subendothelial liegende Strukturen, wie beispielsweise Kollagen, werden freigelegt und stimulieren eine Plättchenaggregation sowie die Anlagerung von Leukozyten.

Dies führt zu einer Thrombosierung des betroffenen Gefäßes, die je nach Beschaffenheit des Plaque unterschiedlich stark ausfällt [14]. Darüber hinaus fehlen dem Endothel durch die Verletzung antithrombotische Faktoren (NO, *tissue-type plasminogen activator* [t-PA], *Urokinaseplasminogenaktivator* [u-PA], etc.), deren Verminderung den Effekt noch verstärkt [15].

2) Neointima und positives vaskuläres Remodelling

Innerhalb der ersten Wochen nach der Intervention erfolgt in einer zweiten Phase die Einengung des aufgeweiteten Lumens durch die Bildung einer sogenannten Neointima.

Dieser Phase kommt eine große Bedeutung im Rahmen der Restenosierung zu. Ursache hierfür sind zelluläre Veränderungen, bei denen durch Proliferation glatter Muskelzellen, sowie durch Sekretion extrazellulärer Matrixproteine eine Einengung des Gefäßes erfolgt. Als vaskuläres Remodelling bezeichnet man in diesem Zusammenhang die strukturelle und funktionelle Adaptation der Blutgefäße als Reaktion auf äußere Reize. Dieser Prozess führt zu einer Modifizierung der Gefäßstruktur durch Modulation des Phänotyps und der Sekretionseigenschaften der glatten Muskelzellen.

Der Ablauf dieser Vorgänge verläuft folgendermaßen:

1. Aktivierung glatter Gefäßmuskelzellen

Die Aktivierung erfolgt in den ersten beiden Tagen nach der Gefäßverletzung. Auslöser hierfür sind Faktoren, die von Thrombozyten, Monozyten, Endothelzellen und verletzten SMCs freigesetzt werden [14]. Vor allem die Blutplättchen verfügen über ein reiches Reservoir an Wachstumsfaktoren und spielen eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Zellaktivierung.

Von diesen Wachstumsfaktoren wurden vor allem PDGF und IGF-1 als potente Stimulatoren für die SMC-Proliferation ausgemacht [14], aber auch viele weitere Einflussfaktoren, wie z.B. TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), Thrombin oder Angiotensin II. Die Stärke der Aktivierung korreliert hierbei mit dem Ausmaß der Läsion [16]. Ursache hierfür ist vor allem die Tatsache, dass das intakte Endothel über antiproliferative Faktoren verfügt, deren Einfluss je nach Größe der Wandläsion vermindert wird [17].

2. Migration medialer SMCs

Nach der Aktivierung beginnt die Phase der Migration. Die glatten Muskelzellen der Media wandern entlang eines Konzentrationsgradienten, stimuliert von PDGF, in die Gefäßintima ein. Hierbei folgen sie dem Konzentrationsanstieg in Richtung des organisierten Thrombus [18]. PDGF ist durch mitogene Effekte an der Aktivierung von medialen SMCs und deren Proliferation beteiligt und spielt eine wichtige Rolle als starkes Chemoattraktans im Rahmen der Zellmigration in die Intima [19].

Weitere Faktoren für die Migration der medialen SMCs sind eine Remodellierung der Basalmembran, eine Veränderung der kollagenen extrazelluläre Matrix sowie eine vermehrte Produktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) [20].

MMPs sind Endopeptidasen, die von SMCs und Makrophagen produziert werden. Sie haben einen wichtigen Anteil an Degradation und Ummodellierung der extrazellulären Matrix (EZM). Die EZM besteht normalerweise aus Struktur- und Adhäsionsproteinen, die in einer Grundsubstanz aus Glykosaminoglykanen eingebettet sind. Schon geringe Veränderungen in der Zusammensetzung können von den Zellen wahrgenommen werden [14]. Wichtig für die Plaquestabilität ist die Balance zwischen der Produktion von MMPs, deren Inhibitoren (TIMPs [*tissue inhibitors of metalloproteinases*]) und der Matrixproduktion durch SMCs [21].

3. Proliferation intimaler SMCs

Die nun in der Gefäßintima liegenden SMCs beginnen im Zeitraum von sieben bis zehn Tagen nach Gefäßtrauma zu proliferieren [16]. Sie produzieren vermehrt extrazelluläre Matrixproteine, hauptsächlich bestehend aus Kollagen I und III. Der Phänotyp der SMCs wird entscheidend beeinflusst von der Interaktion mit der sie umgebenden Matrix. Stehen sie in Kontakt mit der Basalmembran, so verbleiben sie im ruhenden Zustand. Geht dieser Kontakt jedoch bei der Zerstörung der Basalmembran durch Proteasen (MMPs, u-PA) verloren, wirkt dies über verschiedenen Signalwege aktivierend auf die SMCs. Hierbei scheinen vor allem $\alpha 5 \beta 1$ - und $\alpha V \beta 3$ -Integrine beteiligt zu sein, die nach Gefäßtrauma vermehrt exprimiert werden [22], [23].

1.5.2 In-Stent-Restenose

Kommt es nach bereits erfolgter Aufweitung durch PTCA und Einbringen eines Stents erneut zu einer Stenose des Gefäßlumens, bezeichnet man dies als In-Stent-Restenose. Sie resultiert, ebenso wie die einfache Stenose, aus dem Einwachsen von neointimalem Gewebe. Hierbei beginnt die entzündliche Reaktion an den Streben des Stents und führt über einen ähnlichen Signalweg wie auch die einfache Stenose zur Aktivierung und Proliferation der SMCs.

In neuesten Forschungen soll durch das Aufbringen bestimmter Metalllegierungen und Pharmaka die Restenoserate reduziert werden. Sowohl die mechanischen Eigenschaften wie auch die Biokompatibilität sollen so verbessert werden [24].

1.5.3 Therapie und Prävention der Restenose

Im Folgenden werden die wichtigsten der zur Zeit angewandten Therapieverfahren und deren Vor- und Nachteile kurz erläutert. Zu unterscheiden sind dabei primär mechanisch-physikalische Maßnahmen von denen auf der Basis von Medikamenten.

PTCA

An erster Stelle der interventionell-kardiologischen Maßnahmen zur Therapie der KHK sowie der Restenose steht nach wie vor die PTCA. Im Falle der Restenosetherapie kann sie als sogenannte Re-PTCA jedoch nicht das ursprüngliche Lumen wiederherstellen [25]. Die Neointima wird lediglich verlagert und nicht entfernt, wie beispielsweise bei den plaqueablativen Methoden (s.u.). Oft kommt es zu einer erneuten Verengung und ggf. muss sogar ein weiterer Stent eingebracht werden (*stent in stent*).

Medikamentöse Behandlung

Die medikamentöse Behandlung bzw. Prävention der Komplikation einer Restenose wurde auf unterschiedlichen Wegen versucht. Dabei hat sich die systemische Applikation von Medikamenten als wenig wirkungsvoll und gleichzeitig nebenwirkungsreich erwiesen. Einen Ansatz stellt die Behandlung mit Glykoprotein-IIb/IIIa-Blockern dar. Diese Wirkstoffgruppe, der Aciximab und Tirofiban angehören, hemmt in vitro die Migration glatter Gefäßmuskelzellen, hat allerdings nicht konstant in allen Studien zur Restenoseinhibition geführt (EPISTENT-, EPILOG-Studie [26], [27]).

Medikamentbeladene Stents

Ein erfolgreicherer Ansatz zur Prävention der In-Stent-Restenose scheint hier die lokale Therapie mit Hilfe medikamentenbeschichteter Stents zu sein. Hierbei werden konstante Wirkungskonzentrationen vor Ort erreicht und die Nebenwirkungsrate gesenkt. Verwendung finden dabei beschichtete Metall-Stents und Polymerstents, die seit ihrer Einführung bereits in weit über 50 verschiedenen Materialien und Ausführungen getestet wurden. Die Verbesserung der Biokompatibilität ist dabei von entscheidender Bedeutung [11].

Neueste Arbeiten mit Beschichtungen aus Sirolimus oder Paclitaxel konnten bereits gute Ergebnisse bei der Reduktion der Restenoserate erzielen [28].

Plaqueablativ Maßnahmen

Eine der plaqueablativen Maßnahmen ist die direktionale Atherektomie [29]. Hierbei wird ein Katheter verwendet, an dessen Spitze sich eine Schneidevorrichtung befindet. Das entfernte Material wird dann über den gleichen Katheter entfernt. Das relativ starre System eignet sich allerdings vor allem für nicht torquierte Gefäßareale und für nicht zu distal gelegene Läsionen, was die Einsatzmöglichkeiten erheblich einschränkt.

Ein weiteres Verfahren, die Rotablationsatherektomie, verwendet im Gegensatz dazu einen Bohrkopf, der die Plaque in kleinsten kapillargängigen Teilchen abträgt, die dann über die Gefäße abfließen und vom retikulo-endothelialen System (RES) des Körpers eliminiert werden. Diese Therapiemaßnahme wird vorwiegend bei stark verkalkten oder

langstreckigen Gefäßläsionen eingesetzt, da sie vor allem in diesen Fällen Vorteile zu haben scheint.

Die Vorteile beider plaqueablativen Verfahren gegenüber der Behandlung mit PTCA sind jedoch nicht eindeutig erwiesen. In vergleichenden Studien wie der ROSTER- und der ARTIST-Studie erreicht im einen Falle die Atherektomie- und im anderen die PTCA-Therapie bessere Ergebnisse [30], [31].

Weitere Verfahren, die auf dem Prinzip der Entfernung der Plaque beruhen, sind die Laser-Angioplastie und der sogenannte *cutting balloon*. Beide Verfahren zeigten allerdings keine signifikant besseren klinischen Ergebnisse als die nach PTCA bzw. Rotablationsatherektomie [32], [33].

Brachytherapie

Ein vornehmlich physikalisches Therapieverfahren stellt die Brachytherapie dar. Hierbei werden Strahlenquellen verwendet, die entweder direkt oder in Form eines strahlenden Stents ins Gefäß eingebracht werden. Am Menschen werden nur wenige radioaktive Isotope angewendet. Die hierbei üblichen Materialien sind α - oder β -Strahler. Die Auswirkungen ähneln dabei denen bei der Strahlentherapie onkologischer Erkrankungen. Das übermäßig proliferierende neointimale Gewebe wird, ebenso wie schnell wachsende neoplastische Zellen, in seinem Wachstum gehemmt und so die Stenose verkleinert. Die endovaskuläre Bestrahlung hemmt aber nicht nur das überschießende Zellwachstum, sondern soll auch das unerwünschte Schrumpfen der Gefäßwand nach PTCA verhindern.

Diese Methode wird jedoch seit der Einführung der medikamentbeladenen Stents nicht mehr angewendet.

1.6 Migration und Invasion glatter Gefäßmuskelzellen

Migration von Zellen bedeutet eine gerichtete Wanderung in Folge von Chemotaxis, d.h. auf einen chemischen Reiz gerichtet. Von Invasion spricht man, wenn diese Zellwanderung unter Auflösung der Basalmembran in Fremdgewebe stattfindet.

Die Migration glatter Gefäßmuskelzellen spielt eine wichtige Rolle in den pathologischen Prozessen, die bei einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen von Bedeutung sind. Hierunter finden sich beispielsweise die Atherosklerose, die Restenose nach PTCA und Stent-Implantation, aber auch Gefäßerkrankungen nach Transplantation [34], [35]. Alle diese Prozesse sind durch molekulare Mechanismen charakterisiert, die zu einer Migration medialer SMCs in die Gefäß-Intima und nachfolgender intimaler Proliferation führen.

Das Potential der Zelle zur Migration hängt von einer komplexen Regulation ab, die verschiedenen genetischen Mechanismen unterliegt. Diese zeichnen sich aus durch die Umorganisation des Zytoskeletts, die vermehrte bzw. verminderte Sekretion von

Membrankomponenten (Integrine, Adhäsionsmoleküle), den Einfluss von Zytokinen und Proteasen, sowie eine veränderte Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktion [36], [37], [38].

Im Stadium der Migration bildet die Zelle typische Zellausläufer aus, mit deren Hilfe sie sich fortbewegt. Man unterscheidet die sogenannten *lamellipodia*, die eine breite, flache Struktur aufweisen, von den sogenannten *filopodia*, die eine dünne, zylindrische Form haben und als nadelartige Fortsätze imponieren. Beide können sich im Rahmen der Zellmigration reversibel in allen drei Dimensionen aus der Zelle ausstülpfen. Sie enthalten keine Zellorganellen, gehen jedoch fast immer mit der lokalen Vermehrung von Aktinfilamenten einher. In den Filopodien sind diese Aktinfilamente in parallel angeordneten Bündeln gruppiert, während sie in den Lamellipodien Querverbindungen aufweisen und eine Art Netz bilden [38]. Generell wird angenommen, dass der zur Fortbewegung der Zelle nötige Antrieb von einer dynamischen Umwandlung des Aktingerüsts unterstützt wird. Dadurch wird eine Protrusion an der Vorderseite und eine Retraktion an der Hinterseite der Zelle verursacht [39].

Anreiz zur Wanderung von Zellen können verschiedene Stimuli in Form von Chemokinen sein, von denen PDGF und IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) die bedeutendsten sind [40]. PDGF gilt dabei als stärker mitogen als IGF-1 [41]. Freigesetzt werden diese Faktoren von Thrombozyten und apoptotischen SMCs. Der Vorgang der Migration wird gefördert durch eine vermehrte Synthese von MMPs beziehungsweise eine Verminderung der Inhibitoren (TIMPs) im Rahmen des Remodellings der Basalmembran.

1.7 Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

In der Intima der Gefäßwand findet im Rahmen der Restenoseentstehung eine Proliferation glatter Muskelzellen statt. Die glatte Muskelzelle produziert in diesem Stadium vermehrt extrazelluläre Matrix, bestehend aus Kollagen Typ I und III, kleinen Mengen von Kollagen Typ VI, Fibronektin, Elastin und Proteoglycanen, in ihre Umgebung und verändert dabei ihren Phänotyp.

Dem proliferierenden Phänotyp wird eine entscheidende Rolle im Prozess der Atherosklerose, der Restenose nach Stent-Implantation und den Komplikationen nach Gefäßtransplantation zugeschrieben [42]. Diese Vorgänge werden maßgeblich durch eine Dedifferenzierung der SMCs in den extrazellulärmatrix-produzierenden Typ beeinflusst. Glatte Muskelzellen dieses Phänotyps können durch Proliferation und Zellmigration in die Intima zu einer Gefäßokklusion führen. Neben diesem sogenannten *phenotypic switching*, das eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Atherosklerose spielt, sind auch viele weitere Zelltypen, wie beispielsweise Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophile und Endothelzellen in dieses komplexe Krankheitsbild involviert [2]. Durch die Dedifferenzierung und Proliferation der Muskelzellen und die Produktion extrazellulärer Matrix bildet sich die sogenannte *Neointima*, die im Rahmen der Restenoseentwicklung zu einem Gefäßverschluss führt [43], [44]. Die Umwandlung in einen anderen Phänotyp konnte in

verschiedenen Studien auch ohne Stimuli durch Chemokine hervorgerufen werden, indem man die Zellen unter speziellen Kulturbedingungen wachsen ließ [3], [45]. So können die verschiedenen Phänotypen glatter Gefäßmuskelzellen auch in vitro gezüchtet werden und auf ihre unterschiedliche Expression von Zytoskelett- und Adhäsionsproteinen untersucht werden.

1.8 Cadherine

Die Pathogenese der Restenose wird von einer Reihe zellulärer Mechanismen bestimmt. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Gruppe der Cadherine. Aus diesem Grund sollen im Folgenden Aufbau und Funktion dieser Proteine, sowie deren Schlüsselrolle in der Entstehung verschiedener Erkrankungen erläutert werden.

Cadherine stellen eine wichtige Gruppe von Adhäsionsmolekülen dar, die mit Hilfe Ca^{2+} -abhängiger homophiler Interaktion den Zellkontakt vermitteln [46], [47]. Bis heute sind bereits mehr als 80 Mitglieder der Cadherin-Gruppe identifiziert, darunter die klassischen Cadherine (z.B. E-Cadherin, N-Cadherin oder VE-Cadherin), desmosomale Cadherine (Desmoglein, Desmocollin), Protocadherine, CNRs (*cadherin-related neuronal receptors*), Fat-Cadherine, sieben-transmembran-Cadherine und Tyrosinkinasen.

Cadherine lagern sich über einen reißverschlussähnlichen Mechanismus zu Homodimeren zusammen. Der intrazelluläre Teil ist bei allen Mitgliedern einer Unterklasse konstant. Im Falle der klassischen Cadherine interagiert er mit p120 und β -Catenin an verschiedenen Stellen der zytoplasmatischen Domäne. Letzteres bindet wiederum α -Catenin und schließlich Vinculin und andere Proteine des Zytoskeletts. So organisiert sich eine als *zonula adherens* oder auch *adherens junction* bezeichnete Zellstruktur, deren Aufbau in Abbildung 2 dargestellt ist.

Die *zonula adherens* erfüllt neben der Rolle eines zytomechanischen Zellkontaktes auch die wichtige Aufgabe, Zellwandproteine mit dem in der Zelle liegenden Aktin-Zytoskelett zu verbinden. Somit fallen den Cadherinen nicht nur Aufgaben in der Signaltransduktion von Zelle zu Zelle zu, sondern auch eine entscheidende Beteiligung an der Morphogenese [48].

Die dynamische Umwandlung der Zell-Zell-Adhäsion spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie beispielsweise der Embryologie, der Zellalterung, der Wundheilung, der Tumormetastasierung und der Zellmigration. Wesentlich beteiligt an den damit verbundenen Signalwegen sind die GTPasen der Rho-Familie, wie beispielsweise RhoA, Rac1 und Cdc42 [49].

Bereits gut belegt ist die veränderte Expression von Cadherinen im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Umwandlung von Zellen im Prozess der Kanzerogenese. Hierbei zeigt sich eine verminderte Expression von Cadherinen mit der Folge erhöhter Invasivität der transformierten Tumorzellen [50].

Glatte Gefäßmuskelzellen exprimieren verschiedene Cadherine, darunter N-Cadherin,

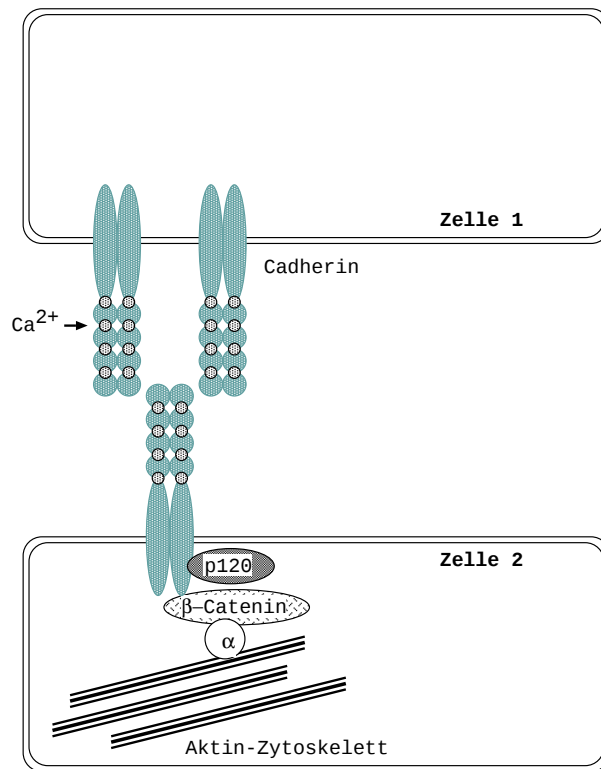


Abbildung 2: Zonula adherens

R-Cadherin, T-Cadherin, Cadherin-6b und E-Cadherin. Letzteres kommt aber auch in Fibroblasten, Herzmuskelzellen, Linsenepithel und Gefäßendothel vor. Insbesondere N-Cadherin spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen und kann, wie andere Cadherine, Zellwachstum und -migration durch Kontaktinhibition beeinflussen.

Im Prozess der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen scheinen Cadherine eine wichtige Rolle zu spielen, auch wenn diese im Einzelnen bislang noch unklar ist [51], [52].

1.9 Aktin-Zytoskelett

In der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts fällt den kleinen GTPasen eine entscheidende Rolle zu. In dieser Gruppe von Proteinen (20-40 kDa Molekulargewicht) sind Rho, Rac und Cdc42 die wichtigsten Vertreter.

Die GTPasen binden alternierend die Guaninnukleotide GDP und GTP (Guanin-Diphosphat bzw. -Triphosphat) und ändern dabei ihre Proteinkonformation. Die inaktive Form stellt das Rho-GDP dar (Abb. 3a), dessen Aktivierung durch den Austausch von GDP gegen das energiereiche GTP erfolgt. Dieser Prozeß wird durch die sogenannten *guanidine exchange factors* (GEFs) katalysiert, die die starke Rho-GDP-Bindung destabilisieren und gleichzeitig die GTPase frei halten, so dass GTP gebunden werden

kann (Abb. 3b). Das aktivierte Rho bindet mit seinem carboxyterminalen Ende an die Zellmembran. Bei Aktivierung durch extrazelluläre Faktoren (Abb. 3c) kann die GTPase dann freies Phosphat abspalten und kehrt so unter Energiegewinn in den inaktiven Zustand zurück. Die *GTPase-activating proteins* (GAPs) unterstützen diese intrinsische Aktivität der GTPasen und somit deren Inaktivierung [49] (Abb. 3d).

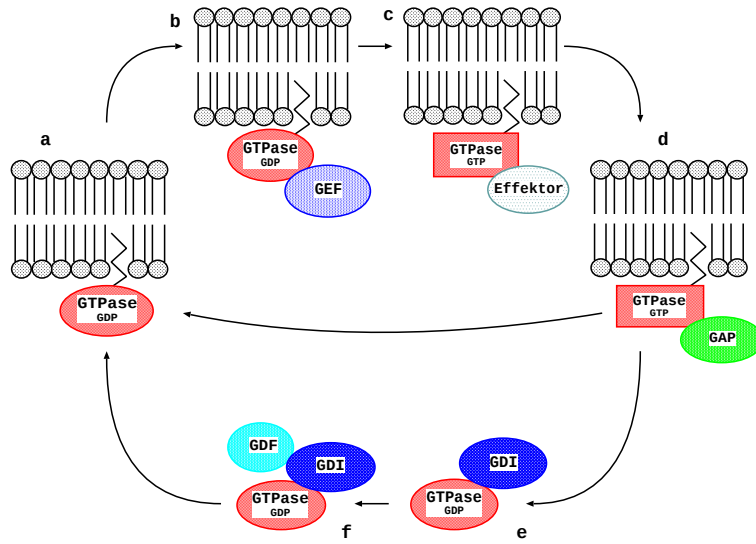


Abbildung 3: Zyklus der RhoA-Aktivierung

Die Rho-GTPasen liegen schließlich noch in einer weiteren Form vor. Hierbei spielen die sogenannten *guanine nucleotide dissociation inhibitors* (GDIs) eine wichtige Rolle. Sie stabilisieren den Verbleib der inaktiven GTPase in GDP-gebundener Form im Zytoplasma und bilden so die *Rho-GDI-Komplexe* (Abb. 3e). Ihre Dissoziation wird von den *GDI dissociation factors* (GDFs) katalysiert (Abb. 3f) und unterliegt der Regulation durch Ezrin, Radixin und Moesin (ERM).

Vor allem die GTPasen Rho, Rac und Cdc42 kontrollieren sowohl die Adhäsion, als auch die Polarität und Bewegung von Zellen bei Vorgängen wie Embryogenese, Wundheilung und Zellwanderung [39]. Diese Regulationsproteine bilden eine Kaskade, die der Initiator für die Ausbildung von Filopodien, Lamellipodien und den als *stressfibers* bezeichneten kontraktiven Aktin-Myosin-Filamenten ist [53]. Dabei spielt Rho vor allem für die Formation der *stressfibers* und damit assoziierten fokalen Adhäsionen eine wichtige Rolle, während Rac vornehmlich die Protrusion von Lamellipodien und Cdc42 die der Filopodien triggert [39]. Dabei besteht zwischen der Aktivität der drei Proteine eine hierarchisch angeordnete Vernetzung.

Für RhoA wurde eine wichtige Rolle im Rahmen der Migration und DNA-Synthese in glatten Muskelzellen beschrieben [54]. Charrasse et al. [55] beschreiben eine Deaktivierung von Rac und Cdc42 durch Adhäsion von N-Cadherin in Skelettmuskeln, während für RhoA eine Aktivierung zu erfolgen scheint.

1.10 Ziele

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es, zu untersuchen, welcher Zusammenhang zwischen der N-Cadherin-Expression und der Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen besteht.

Um die Rolle von N-Cadherin und seinen Bindungspartnern in der Pathogenese der Restenose zu untersuchen, soll vor allem das Phänomen der Migration glatter Gefäßmuskelzellen und die Dynamik von Zell-Zell-Kontakten, sowie deren Modulation betrachtet werden. Erreicht werden soll dadurch ein besseres Verständnis der Regulationsmechanismen, hauptsächlich auf der Ebene der Adhäsionsproteine, die auf Prozesse wie Zellwanderung und nicht zuletzt auf die Entstehung von Gefäßstenosen Einfluss nehmen.

Hierzu kommen im wesentlichen zwei Modelle zur Anwendung. Auf der einen Seite ist dies ein in-vitro-Modell zur differenziellen Untersuchung glatter Gefäßmuskelzellen in der Zellkultur. Die so gewonnenen Zellen werden in der Boyden-Kammer auf ihre chemotaktischen Eigenschaften untersucht, sowie durch Transfektion und Behandlung mit Antikörpern in ihrer Proteinexpression beeinflusst. Auf der anderen Seite steht ein Tiermodell mit dessen Hilfe die differentielle Proteinexpression in vivo durch immunhistochemische Analyse in Koronararterien des Schweins nachgewiesen werden soll. Beide Ansätze liefern Hinweise auf die Zusammenhänge von Proteinexpression, Zellmigration und Zellproliferation.

Letztendlich sollen diese Studien dazu beitragen, Lösungsansätze zu erarbeiten, die Fortschritte auf dem Gebiet der Therapie und Prävention der Restenose nach PTCA- und Stent-Therapie ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Für das in-vitro-Modell macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass die Ausprägung der verschiedenen Phänotypen humaner glatter Gefäßmuskelzellen auch künstlich in der Zellkultur provoziert werden kann [6]. Die so gezüchteten Zellkulturen können dann auf die differentielle Expression bestimmter Proteine und ihre Migrationseigenschaften untersucht werden. Mit Hilfe der Zellkultur verfügt man über ausreichende Mengen an Zellmaterial, um auch über schwach exprimierte Proteine Aussagen treffen zu können.

Eine weitere Methode, die erwünschte Differenzierung von proliferierenden und quieszenten Myozyten zu erreichen, ist die der *Transfektion*. Hierbei kann der entsprechende Zellpool mit unterschiedlichen Vektoren bestückt und so in seiner Proteinexpression beeinflusst werden.

2.1.1 Zellkulturbedingungen

SMC

Die glatten Gefäßmuskelzellen, die für die Zellkultur verwendet wurden, stammen aus koronaren Bypassoperationen der Klinik für Herz-, Gefäß- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Aachen. Während der Operation resizierte Reststücke der Arteriae mammae wurden uns zur Präparation zur Verfügung gestellt. Eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten lag dazu vor.

Zur Isolierung der zu gewinnenden Zellen wurde zunächst das Gefäß von umliegendem Gewebe (Fett, Bindegewebe) getrennt und freigelegt. In einem zweiten Schritt musste dann die eigentliche muskuläre Arterienwand von den anhaftenden Schichten (Intima, Adventitia und Endothelschicht) befreit werden. Übrig blieb so allein die Media, in der nun ausschließlich SMCs vorliegen sollten.

Das präparierte Arterienstück wurde dann in wenige mm^2 große Teile zerschnitten, die jeweils einzeln in einer Kammer einer 6-Loch-Kulturplatte (Falcon-Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ausgesät und mit *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM/Nut.Mix F-12 mit Glutamax (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)) bedeckt wurden.

Zur Vermeidung mikrobieller Besiedlung wurden dem Medium zusätzlich Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (10 $\mu g/ml$) und Amphotericin B, sowie 10% fetales Kälber-

serum (FKS, Gibco BRL, Gaithersburg, USA) zugesetzt.

Zur weiteren Kultivierung der Muskelzellen wurden diese unter einer Atmosphäre von 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Das Auswachsen der Zellen aus dem Gewebestück dauert bei diesen Bedingungen etwa 1-2 Monate. Während der Wachstumsphase erfolgte alle 2 Tage ein Mediumwechsel und eine Begutachtung des Wachstums mittels Lichtmikroskop [Olympus Optical Co. (Europa) GmbH CK3, Hamburg, Deutschland] bei 100- und 400-facher Vergrößerung.

Für die Passagierung der SMCs wurde in subkonfluent wachsenden Zellkulturen das Medium abgesaugt, mit PBS (*phosphate-buffered saline*) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gewaschen und die Zellen mit 0,025% Trypsin (Sigma Aldrich, St.Louis, USA) bedeckt. Anschließend wurde in PBS resuspendiert und durch Zentrifugation (5 Min. bei 1000 U/min) ein Zellpellet gewonnen. Dieses wurde in Nährmedium aufgenommen und je nach Zelldichte in Kulturflaschen von 25 cm^2 oder 75 cm^2 Grundfläche (beide von Falcon-Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ausgesät und erneut kultiviert.

Die für die Versuche verwendeten Zellen stammen aus Kulturen der dritten bis siebten Passage. Diese wurden zudem zur Vermeidung spenderabhängiger Effekte gepoolt, d.h. es wurden jeweils Zellen von 3-4 Spendern in einer Kultur, der sogenannten *Charge*, zusammengefasst.

Die Identifikation der Zellen als SMCs erfolgte zum einen anhand ihres Erscheinungsbildes. SMCs zeigen unter dem Lichtmikroskop eine spindelzellartige Zellmorphologie und ein typisches Berg-Tal-Muster, das sogenannte *hill and valley growth pattern*. Zum anderen erfolgte eine Zuordnung mittels indirekter Immunfluoreszenz mit monoklonalem Smooth-Muscle-Actin (SMA), welches die Zellen als Muskelzellen ausweist. So konnte ein Anteil glatter Gefäßmuskelzellen von > 95% in einer Kultur erreicht werden.

HUVEC

Die Innenwand von Gefäßen des menschlichen Körpers wird durch eine einschichtige Endothelzellschicht gebildet. Zur Kultivierung humaner umbilikaler Endothelzellen (HUVEC) wurden nach Einwilligung der Spender Nabelschnüre aus dem Kreißsaal des Universitätsklinikums Aachen verwendet.

Diese wurden zunächst mit HEPES-Puffer (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) gespült, und anschließend mit Kollagenase gefüllt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurden die Endothelzellen durch leichtes Massieren von der Gefäßwand gelöst und die Kollagenase-Lösung in ein Gefäß abgelassen. Die Nabelschnur wurde mit 20 ml serumfreiem Medium nachgespült. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei 1100 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 4 ml serumhaltigen Medium resuspendiert. Die Aussaat erfolgte in eine T25-Kulturflasche (Falcon-Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), die bei 37°C, 5% CO_2 und 10%

O₂ inkubiert wurde.

Für die Passage wurden die Endothelzellen durch 1 ml Kollagenase mit 1 ml EDTA/BSA für 15 Minuten bei 37°C abgelöst, zentrifugiert und aufgenommen in 10 ml Medium in einer T75-Kulturflasche (Falcon-Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) weitergezüchtet.

Zur Herstellung des Endothelzell-konditionierten Mediums für den Invasions-Assay wurden proliferierende HUVEC 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Nach Zentrifugation zur Entfernung von Zelltrümmern wurde das Medium bei -20°C bis zu den Versuchen ohne Zugabe von anderen Zusätzen gelagert.

2.1.2 Immunfluoreszenz von Zellen

- Antikörper

Der monoklonale Antikörper (Maus) gegen Smooth-Muscle-Actin- α (Klon 1A4, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA, 1:500) und ein Antikörper gegen von-Willebrand-Factor VIII (vWF, 1:200) von Dako (Glostrup, Danemark) dienen zur Identifizierung des Zelltyps. Der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper TRITC (DAKO, Glostrup, Danemark) wurde mit einer Verdünnung von 1:1500 eingesetzt.

TRITC-konjugiertes Phalloidin für die Immunfluoreszenz zur Darstellung des Zytoskeletts und nichtimmunes IgG1 (Maus) als Negativkontrolle stammen beide von Sigma (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA).

Identifizierung des Zelltyps

Die sichere Identifizierung der aus der Zellkultur gewonnenen Zellen als glatte Gefäßmuskelnzellen erfolgte durch die indirekte Immunfluoreszenz. Als spezifischer Marker für das Vorliegen von Muskelzellen diente Smooth-Muscle-Actin- α (SMA- α). Für die Negativkontrolle eignet sich der in Endothelzellen, aber nicht in Muskelzellen vorkommende von-Willebrand-Faktor VIII, dessen Abwesenheit eine Verunreinigung der Kultur mit Endothelzellen ausschließt.

Für die Immunfluoreszenz wurden vom proliferierenden Phänotyp 20×10^3 Zellen und vom konfluenten 100×10^3 Zellen auf einem Objektträger (Labtex-Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ausgesät und für 12 Stunden inkubiert.

Nach Spülung mit PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) folgte die Fixierung in Methanol bei -20°C für 10 Minuten. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Rehydratation in PBS und eine 30-minütige Blockade durch 3% BSA (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) in PBS.

Die Zellen wurden nun mit monoklonalem Anti-Smooth-Muscle-Actin- α Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung von Antikörperresten wurde anschließend dreimal mit PBS gespült und dann der fluoreszenzmarkierte Zweit-

Antikörper aufgetragen. Hierzu wurde ein TRITC-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1500 in 3% BSA in PBS verwendet. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss für 1 Stunde.

Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Zellen zur Kontrastierung der Zellkerne mit 2 μ l DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole-Dihydrochlorid) (1 μ g/ml) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) in 30-50 μ l Mounting Medium (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence, Vector Laboratories, Burlingame, USA) behandelt und der Objektträger luftdicht verschlossen.

Die Betrachtung der Zellen erfolgte unter einem für Immunfluoreszenz ausgestatteten Mikroskop (Leitz, Wetzlar, Deutschland).

Darstellung des Zytoskeletts

Die Zellkulturen wurden auf Objektträgern (Labtex, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ausgesäht. Diese wurden zunächst vorsichtig mit PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gewaschen und anschließend sofort mit 3,7% Formaldehyd in PBS für 5 Minuten fixiert. Die Zellen wurden getrocknet, indem sie mit Aceton behandelt wurden, und anschließend mit 0,1% Triton X-100 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) durchlässig gemacht.

Für 40 Minuten wurde dann in einer Lösung aus 50 g/ml fluoreszierendem Phalloidin (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) in PBS inkubiert. Überschüssiges Phalloidin wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt.

2.1.3 Induktion des Phänotyps

Für die Experimente zur Zellmigration wurden Zellen mit unterschiedlichen migratorischen Eigenschaften genutzt. Die verschiedenen Phänotypen glatter Muskelzellen können dazu durch entsprechende Zellkulturbedingungen induziert werden [56]. Hierzu wurden die Zellen in DMEM (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) bis zum Erreichen eines subkonfluenten Zustandes kultiviert.

Zur Induktion des quieszenten Typs wurden sie dann 5 Tage vor dem Invasions-Versuch in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml in einer Kulturflasche (Falcon-Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit einer Grundfläche von 75 cm^2 ausgesäht. Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens (Kontaktinhibition) wurde den Zellen dann 3 Tage lang das Serum entzogen. So entstanden Zellen, die denen der ruhenden SMCs in der Tunica media eines intakten Gefäßes ähnelten.

Um den mobilen Phänotyp zu induzieren, der die Fähigkeit zur Invasion aufweist, wurden 2 Tage vor Versuchsdurchführung konfluente SMCs passagiert und in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml in einer T75-Kulturflasche ausgesät.

Beide Ansätze wurden unter den in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert.

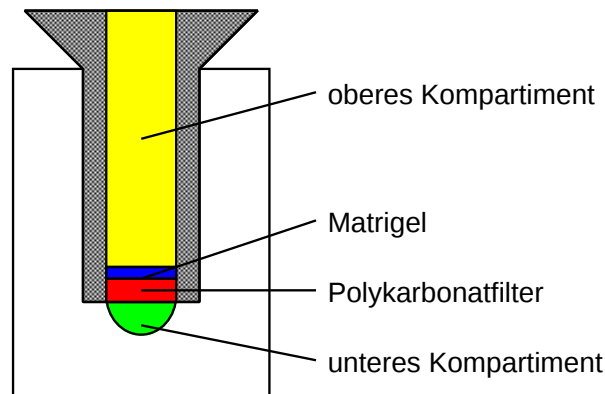


Abbildung 4: Aufbau der Boyden-Kammer

2.2 Chemotaxis

Für die Invasions-Versuche wurde eine sogenannte *Boyden-Kammer* (Costar, Cambridge, USA) verwendet. Mit diesem Modell soll die Invasivität der Muskelzellen und ihre Reaktion auf einen bestimmten Stimulus untersucht werden. Man nutzt hierbei die Tatsache, dass SMCs die Eigenschaft haben, einem chemischen Reiz zu folgen und in Richtung des Stimulus migrieren zu können (Chemotaxis) [56].

Zu Beginn der Restenoseentstehung spielt die Wanderung von glatten Muskelzellen in die Neointima eine entscheidende Rolle. Der folgende Versuch basiert auf dem Modell unterschiedlicher Migrationspotentiale primärer SMCs abhängig von ihrem Phänotyp [6], [56]. Dazu wurden beide Phänotypen *in vitro* induziert, indem die Zellen entweder in ihrer Proliferation gestoppt (konfluente Zellkulturbedingungen und Serumdepletion) oder durch Anwesenheit von Serum oder Wachstumsfaktoren als proliferierender Typ kultiviert wurden. Die Reaktion beider Zelltypen auf einen promigratorischen Stimulus wurde anschließend in der Boydenkammer getestet. Der Aufbau der Kammer ist in Abbildung 4 dargestellt.

Die Hauptbestandteile bilden zwei Kammern, die von einer Membran getrennt werden. Das untere Kompartiment enthält die als Stimulus wirkende Lösung, während sich im oberen Teil die zu untersuchenden Zellen befinden.

Ist ein ausreichender Stimulus gegeben, wandern die Zellen nun entlang des Konzentrationsanstiegs durch die Membran in Richtung des unteren Kompartiments. An der Unterseite der Membran können die gewanderten Zellen dann ausgezählt werden. Ein starker Migrationsstimulus *in vivo* ist PDGF. Eine ähnliche Wirkung hat auch Endothelzell-konditioniertes Medium (ECM), das aus einer Nabelschnur-Endothelzellreihe gewonnen wurde (HUVEC, Kapitel 2.1.1). Es übt den gleichen Wachstumsreiz auf SMCs aus wie PDGF [6], [56].

Um zusätzlich zu den Migrationseigenschaften auch die Fähigkeit der Zellen zu testen, aktiv die Basalmembran zu durchwandern, wurden die Eigenschaften der trennenden

Membran den in-vivo-Bedingungen möglichst nahe angeglichen. Der Polykarbonat-Filter (Nucleopore, Pleasanton, USA) hatte einen Durchmesser von 13 mm und eine Porengröße von 8 μm . Zusätzlich wurde der Filter mit Matrigel (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) beschichtet. Dieses enthält Laminin, Kollagen IV, Entactin und Heparansulfat und stellt so die Bestandteile der Basalmembran nach, durch die die Zellen in vivo bei der Restenoseentstehung in die Intima wandern. Das übliche Matrigel wurde dazu 1:3 mit *aqua bidest.* verdünnt und mit 52 μl aufgetragen. Dies entspricht einer Dicke von 40 μm . Zur Verfestigung des Matrigels wurde es danach für ca. 30 Minuten bei 37°C, 95% Raumluft und 5% CO_2 inkubiert (Vgl. [56]).

Zellkulturmedium DMEM (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) (10% FCS) wurde mit Endothelzellen aus der HUVEC-Zellkultur konditioniert und in das untere Kompartiment der Boyden-Kammer gefüllt. Der Polycarbonatfilter dienten als Trennung von oberem und unterem Kompartiment. In das obere Kompartiment wurde die Zellsuspensionen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml gefüllt. Diese wurden durch Abtrypsinieren mit 0,05% Trypsin und 0,04% EDTA in PBS aus den Kulturflaschen gelöst, zentrifugiert (1000 U/min) und in Zellkulturmedium (DMEM/Nut.Mix F-12 ohne FKS) resuspendiert. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und dann mit der entsprechenden Menge DMEM/Nut.Mix F-12 ohne FKS aufgefüllt, um die gewünscht Dichte zu erhalten. 800 μl dieser Suspension wurden in die obere Kammer eingefüllt.

Nach Inkubation der Kammer für 4 Stunden bei 37°C wurde die Membran von den übrigen Komponenten getrennt und die auf der Filteroberseite verbliebenen Zellen zur besseren Differenzierung entfernt. Die an der Unterseite haftenden Zellen, die durch den Filter gewandert waren, wurden 30-60 Sekunden in Methanol fixiert und jeweils ca. 30 sec. zuerst in Eosinlösung, dann in Hämatoxilin (beide von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gefärbt.

Die Auszählung erfolgte unter dem Mikroskop bei einer 200-fachen Vergrößerung. Dazu wurden jeweils 3 Filter auf einen Objektträger gelegt und in je 5 Gesichtsfeldern die Zellen auf der Filterunterseite ausgezählt.

2.3 Vektorkonstrukte und transiente Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das epigenetische Einbringen von fremder DNA in eine Wirtszelle. Sie wird verwendet, um zu untersuchende Zielzellen aus der Zellkultur künstlich mit einer spezifischen DNA zu versehen, die für die Expression der gewünschten Proteine kodiert.

Um die DNA in die Zellen einzuführen, benötigt man einen sogenannten *Vektor*. Dies bezeichnet ein Transportmedium zur Übertragung von Fremd-DNA in eine Empfängerzelle. Diese Vektoren sind meist *Plasmide*, d.h. kleine ringförmige Doppelstrang-DNA, die natürlicherweise in Bakterien, wie beispielsweise *Escherichia coli* vorkommen. Die

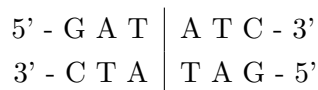
gewünschte DNA kann in ein Plasmid eingebaut werden, wenn beide entsprechende Schnittstellen aufweisen, die von der gleichen *Restriktions-Endonuklease* erkannt werden. Restriktions-Endonukleasen sind Enzyme, die bestimmte Basensequenzen im Doppelstrang der DNA erkennen und voneinander trennen, so dass freie Enden entstehen. So können versetzte Schnittstellen, sogenannte *sticky ends* (z.B. durch EcoRI) oder gerade Enden (*blunt ends*, z.B. durch EcoRV) resultieren. Passen die so entstehenden freien Basenpaare zusammen, können sie mit Hilfe einer DNA-Ligase verbunden werden. Die Fremd-DNA ist somit in das Plasmid integriert und kann, eingeführt in Bakterien, vervielfältigt werden.

In diesem Versuchsaufbau diente *pBluescript II KS* (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) als Vektor. Dies ist ein Phagmid-Vektor mit 2961 Basenpaaren, der sich von pUC19 herleitet. Er enthält einen Replikationsursprung und eine sogenannte *multiple cloning side* mit RNA-Promotern zur Produktion von *sense* bzw. *antisense* RNA-Transkripten des klonierten Inserts. Außerdem beinhaltet der Vektor das lacZ Gen, welches für die Selektion von blau und weiß der rekombinanten Phagmide sorgt, sowie ein Ampicillin-Resistenz-Gen für die antibiotische Selektion des Vektors.

Zum Zerschneiden der Doppelstränge wurden folgende Endonukleasen verwendet:

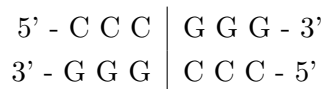
- *EcoRV*

Dieses Enzym stammt aus *Escherichia coli* und produziert glatt endende Fragmente. Es schneidet jeweils zwischen Adenin (A) und Thymin (T) und erkennt die Sequenz



- *SmaI*

Diese Endonuklease produziert ebenfalls *blunt ends* ohne überstehende Kanten. Die Schnittstelle liegt an der Grenze zwischen Guanin (G) und Cytosin (C) in folgender Sequenz:



Um zu diesen Fragmenten passende glatte Enden zu generieren, wurde das sogenannte *Klenow Fragment* verwendet. So bezeichnet man einen der beiden großen Peptid-Abschnitte der DNA-Polymerase I des Bakteriums *Escherichia coli*. Es fungiert als Polymerase und Exonuklease. Ist das gewünschte Vektorkonstrukt hergestellt, wird es mit Hilfe geeigneter Zellen kloniert. Zur Klonierung wurde der Expressions-Vektor *pCMX-PL1* verwendet. Dies ist ein eukaryotischer Vektor mit einem Promotor des humanen Cytomegalievirus und einem Replikationsursprung.

Für die Amplifizierung der codierenden Region des humanen N-Cadherin-Gens mittels PCR (*polymerase chain reaction*) wurden folgende Primer verwendet:

N-Cad for (5'-GAC GGA TCC CGG CCC CTC TCC GCC TCC ATG)

N-Cad rev (5'-GAC GGA TCC GTT CAC CCT GAA GTT CAG TC).

Das PCR-Produkt wurde anschließend mit dem *Klenow Fragment* behandelt, so dass Fragmente mit *blunt ends* entstanden. Diese konnten dann über die Restriktionsstelle von *SmaI* in den Vektor *pBluescript II KS* eingefügt werden.

Zur Erstellung des Expressions-Vektors für N-Cadherin *sense* wurde das *Bam-XhoI*-Fragment von *pBluescript II KS* in dem Vektor *pCMX-PL1* subkloniert.

Der Vektor N-Cadherin *antisense* wurde hergestellt, indem das *EcoRV-XbaI*-Fragment des *pBluescript II KS*-Vektors in *pCMX PL1* integriert wurde. Auch hier generierte man mit der vorher durchgeführten Klenow-Reaktion glatte Fragmentenden.

Der Expressions-Vektor *pCMV-cN-FLAG-pA* für N-Cadherin *sense* wurde uns freundlicherweise von Prof. Tackeichi (University of Kyoto, Japan) zur Verfügung gestellt. Dieser Vektor enthält einen Promoter des Cytomegalievirus und ein sogenanntes *flag-tag*. Damit bezeichnet man ein Polypeptid-Protein, das in einen Vektor eingeführt wird, um nach der Transfektion eine Selektion der Zellen vornehmen zu können. Es dient zur Erkennung der erfolgreich transfizierten Zellen beispielsweise durch einen Antikörper gegen die Flag-Sequenz.

Zum Einbringen der so generierten DNA in die dafür vorgesehene Zellkultur stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Für die Transfektion von Muskelzellen eignet sich die sogenannte *Elektroporation*. Hierbei wird die Zellmembran mit Hilfe von kurzen Elektroschocks für die Fremd-DNA permeabel gemacht. Das Prinzip dieser Technik beruht auf dem Anlegen einer transmembranären Spannung. Die sonst als Isolierung wirkende Zellmembran verliert ab einem kritischen Wert von 0,4 bis 1 V diese Funktion und es resultiert eine stark erhöhte Leitfähigkeit, die zur Entstehung von hydrophilen Poren in der Zellmembran führt. Diese Poren bleiben über einen Zeitraum von wenigen Sekunden bis zu einigen Minuten relativ stabil, so dass die sie im Reaktionsgefäß umgebende Fremd-DNA aufgenommen wird. (Vgl. [57]).

Zur Induktion der Stromimpulse wurde die speziell für diese Zwecke entwickelte *Amaza Nucleofector Technology* (Amaza, Köln, Deutschland) verwendet. Mit dieser Methode kann eine Transfektions-Effizienz von 50% erreicht werden [58].

Dazu wurden die zu behandelnden Zellen zunächst in 10 ml Pufferlösung (PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)) bei einem pH von 7,5 resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit der gewünschten cDNA versetzt und in eine spezielle Elektroporations-Küvette (Invitrogen, Groningen, Niederlande) überführt. Dabei wurden für 2 bis 5×10^5 SMCs jeweils 5 µg cDNA eingesetzt.

Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen sofort in 4-9 ml Kulturmedium aufgenommen und in T 25-Zellkulturflaschen (Falcon-Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) überführt.

Die elektroporierten Zellen wurden 24 bzw. 48 Stunden nach der Transfektion für die weiteren Versuche verwendet. Als Negativkontrolle der Versuchsreihe dient eine

sogenannte *mock-Kontrolle*. Dies bezeichnet in diesem Falle den Leervektor, in den das jeweilige DNA Stück eingebracht wird.

2.4 N-Cadherin-Blockade

Eine weitere Möglichkeit, die Wirkung von N-Cadherin auf die Zellen zu beeinflussen, stellt die funktionelle Blockade mittels eines inhibitorischen Antikörpers dar. Der N-Cadherin-Antikörper GC-4 (1:100, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) erkennt die extrazelluläre Domäne von N-Cadherin und kann so die Zell-Zell-Adhäsion, die über N-Cadherin vermittelt wird effektiv verhindern. Dieses Verfahren wurde bereits von Takino et al. [59] etabliert.

2.5 Subzelluläre Fraktionierung von Rho A

Zur Auftrennung der zytosolischen und membranösen RhoA-Fraktion mittels Zentrifugation wurden Lysate quieszenter und migratorischer SMCs hergestellt. Der verwendete Lysispuffer enthielt 20 mM Tris (pH 8.0), 250 mM Sucrose, 1 mM PMSF, 10 mM Aprotinin und 10 mM Leupeptin. Der Puffer wurde dabei stets bei einer Temperatur von 0°C gehalten.

Nachdem die Proben dreimal eingefroren und wieder aufgetaut worden waren, wurden sie für 60 Minuten in einer auf 4°C gekühlten Ultrazentrifuge bei 100.000×G zentrifugiert. Der Überstand, der hauptsächlich Zytosol enthielt, wurde als gelöste Fraktion abpipettiert. Das zurückbleibende Pellet wurde zweimal vorsichtig mit Lysispuffer gewaschen und anschließend in 100 ml Lysispuffer resuspendiert. Diesem wurde zusätzlich 1% Triton X-100 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 0,1% SDS (Sodium dodecyl sulfate von Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) zugesetzt.

Bei der folgenden Zentrifugation bei 14.000 U/Min. (4°C, 20 Min.) wurden Zelltrümmer abgetrennt und der Überstand als gebundene Fraktion aufgefangen.

Sowohl für die gebundene Membran-Fraktion, als auch für die gelöste Zytosol-Fraktion wurde der Proteingehalt bestimmt. Im Western-Blot wurden dann äquivalente Proteinmengen eingesetzt und analysiert. Dabei repräsentierten 10 g Protein etwa 1-2% der zytoplasmatischen und 10-20% der membranösen Fraktion.

2.6 Western-Blot

- Antikörper

Zur Darstellung der Proteine im Western-Blot wurden Antikörper gegen N-Cadherin und E-Cadherin (beide in einer Verdünnung von 1:2500), sowie ein Anti- β -Catenin-Antikörper (1:50) verwendet. Alle drei stammen von der Firma

BD Bioscience (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Der Anti-RhoA-Antikörper wurde von der Firma Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA) in einer Verdünnung von 1:200 benutzt. Der Zweitantikörper war ein AP-konjugierter Antikörper (Chemicon International, Temecula, USA) in einer Verdünnung von 1:20.000. Auch für die Darstellung aus der subzellulären Fraktionierung von RhoA wurde ein Anti-RhoA-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA, 1:200) eingesetzt.

Für die Western-Blot Versuche wurden $2 - 5 \times 10^5$ Zellen beider SMC-Phänotypen mit einem Zellspatel aus den Kulturflaschen entfernt und in 400 μ l Lysis-Puffer [50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP 40, 0,5% Desoxycholat und Proteinase Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Deutschland)] aufgenommen. Nach 15 Minuten schütteln wurde das Lysat 5 Minuten bei 14.000 U/min und 4°C zentrifugiert.

Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde daraufhin mittels eines BCA Protein Assays (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) bestimmt.

Als Gel für die Gelelektrophorese wurde ein 0,75 mm dickes Polyacrylamidgel (Biorad, Hercules, USA) mit einer Konzentration von 8,75% verwendet.

Von jeder Probe wurden je 10 μ g Protein in Rotiload-Ladepuffer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert und für 3 Minuten bei 95°C gekocht und anschließend auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Zum Auftrennen der Banden wurde das Gel etwa 40 Minuten in der Elektrophoresekammer bei einer Spannung von konstant 200 V inkubiert.

Die so aufgetrennten Proteine wurden im sogenannten *semidry-Verfahren* in einer Halb-Trocken-Blotkammer (Biorad, Hercules, USA) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) in Tris-Glycin-Methanol-Puffer geblottet. Es wurde 1 Stunde bei 0,4 A geblottet und anschließend eine Stunde in 3% BSA/PBS geblockt.

Die Membran wurde dann für 2 Stunden mit dem jeweiligen primären Antikörper (Anti-N-Cadherin, Anti-E-Cadherin, Anti- β -Catenin oder Anti-RhoA) inkubiert und nach dreimaligem Waschen in PBS mit dem AP-konjugierten Zweitantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt. Nach erneutem Waschen in PBS wurde die Membran mit BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate/ Nitro Blue Tetrazolium) Färbetabletten (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) gefärbt.

2.7 Expressionsanalyse im porcinen Restenosemodell

Für die in-vivo-Analyse der Regulation von Adhäsionsproteinen wurde ein porcines Restenosemodell verwendet, das es ermöglicht, die Auswirkungen von Wandverletzungen der Koronararterien auf Zellebene zu untersuchen. Dieses Modell ist wie folgt aufgebaut:

Männliche Hausschweine von etwa 40 kg Gewicht wurden am Abend vor dem

Gefäßeingriff mit 500 mg Acetylsalicylsäure (ASS) prämediziert. Zur allgemeinen Anästhesie wurden die Schweine mit intramuskulärem Ketamin (20 mg/kg Körpergewicht) und Azaperon (5 mg/kg Körpergewicht) sediert. Nach der anschließenden endotrachealen Intubation erfolgte die Ventilation mit einem Liter Sauerstoff und 3 Litern Stickstoff pro Minute. Die Aufrechterhaltung der Anästhesie während des Experiments wurde durch die intravenöse Gabe von Pentobarbituraten gewährleistet.

Mit Hilfe eines Gefäß-Dopplers wurde die Arteria femoralis in der Leiste aufgesucht und punktiert. Nach Einsetzen einer Schleuse (7F) wurde ein intraarterieller Heparinbolus (10.000 Units) zur Thromboembolieprophylaxe verabreicht und der Katheter vorgeschoben.

Der Führungskatheter konnte nun in die rechte bzw. linke Koronararterie eingeführt werden, wo mit Hilfe eines Ballons eine Wandverletzung der Arterie verursacht wurde. Dabei wurde ein übergroßer Ballon (1,2-facher overstretch) für 30 Sekunden mit 12 atm insuffliert. Als Negativkontrolle diente die nichtdilatierte Arterie der Gegenseite. Nach dem Eingriff erhielten die Schweine eine normale Kost und wurden weiter mit 100 mg ASS behandelt.

Zur Auswertung wurde den Versuchstiere entweder nach 14, 28 oder 90 Tagen eine tödliche Dosis von Barbituraten verabreicht und unmittelbar danach Herz und epikardiale Koronararterien präpariert. Die so gewonnenen Arterien wurden in Segmente von etwa 3 bis 5 mm Länge unterteilt und mit Hilfe üblicher Einbettungstechniken [60] zu histologischen Schnitten von etwa 5 μ m Dicke weiterverarbeitet.

2.8 Immunhistochemie

- Antikörper

Zur Behandlung der histologischen Schnitte wurde ein Antikörper von Takara (Kyoto, Japan) in einer Verdünnung von 1:250 verwendet, der die intrazelluläre Domäne von N-Cadherin erkennt.

Weitere Antikörper waren ein Antikörper gegen β -Catenin (1:50) von BD Bioscience (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und ein Antikörper gegen Smooth-Muscle-Actin- α -(Klon 1A4, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA, 1:400). Die Verdünnung erfolgte in PBS.

Als Zweitantikörper wurde ein HRP-konjugierter Antikörper der Firma Dako (Glostrup, Dänemark, 1:50) verwendet.

Die Immunhistochemie wurde an paraffineingebetteten Schnitten von etwa 5 μ m Dicke durchgeführt, die aus der Tierversuchsreihe mit Koronararterien des Schweins gewonnen worden waren.

Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte nacheinander mit Xylol (10 Min.), absteigender Ethanol-Reihe (96% und 70%, je 4 Min.) und PBS behandelt. Vor der

Behandlung mit dem Antikörper wurden alle Schnitte in der Mikrowelle mit *aqua dest.* und Citronensäuremonohydrat aufgeköcht und nach dem Abkühlen kurz in PBS und anschließend mit 1% H_2O_2 in Methanol inkubiert.

Der Erstantikörper wurde in 0,1% BSA/PBS je nach gewünschter Konzentration verdünnt und bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Die Negativ-Kontrollen wurden statt dessen mit nichtimmunem IgG (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) behandelt.

Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde der HRP-konjugierte Zweitantikörper, ebenfalls in 0,1% BSA/PBS, aufgetragen und 30 Minuten inkubiert. Die Negativ-Kontrollen wurden ebenso behandelt.

Wieder wurde in PBS gewaschen, bevor mit dem DAB-Substrat (Peroxidase-Substrat-Kit Vector Laboratories, Burlingame, USA) unter dem Mikroskop entwickelt wurde.

Die Schnitte wurden zur besseren Kontrastierung mit Hämalaun (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt und anschließend luftdicht verschlossen.

Die Analyse erfolgte mit einem Mikroskop der Firma Leitz.

2.9 Statistische Analyse

Ein Signifikanztest ist ein statistisches Verfahren, das zwischen zwei Hypothesen, der Nullhypothese H_0 und der Alternativhypothese H_1 , entscheidet. Unter der Annahme einer Nullhypothese H_0 ist der P-Wert die Wahrscheinlichkeit (Signifikanzwahrscheinlichkeit) für eine gegebene (beobachtete) experimentelle Situation. Diese Wahrscheinlichkeit ist ein Maß für die Glaubwürdigkeit von H_0 der vorliegenden Daten unter dem entsprechenden Vorwissen. Ist diese Wahrscheinlichkeit klein, kann H_0 abgelehnt werden. Diese als Signifikanztest bezeichnete Prozedur erlaubt es, Aussagen über die Glaubwürdigkeit der vorliegenden Daten zu machen. Als signifikant wurden P-Werte angesehen, die kleiner als 0,05 waren.

Der Invasions-Assay lieferte jeweils zwei Stichproben: die der quieszenten und die der migratorischen Zellreihe. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde der ungepaarte Zweichstichproben t-Test verwendet. Hierbei wurde die Nullhypothese $\mu_1 = \mu_2$ geprüft, also die Annahme, dass sich die Mittelwerte der beiden Ansätze im Invasionsversuch nicht unterscheiden [61].

Alle Berechnungen und Darstellungen wurden mit *Statview 5.0* (SAS, Cary, USA), *XLSTAT-Pro 6.1 Addin* für MS Excel (Addinsoft, New York, USA) und *Microsoft Excel* (Microsoft Corp., Redmont, USA) ausgeführt und erstellt.

Die densitometrische Analyse der Western-Blots erfolgte mit der *Quantity One* Software von Bio-Rad (Version 4.5.0). Für die Analyse der Pixel-Intensität wurden RGB TIFF files aller Bilder in Graustufen konvertiert und anschließend mit Hilfe der *Analysis Software* (Version 3.1) der Firma Soft Imaging System ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von N-Cadherin und β -Catenin in vitro

Migrationsversuch in der Boydenkammer

Nach der Induktion der unterschiedlichen Phänotypen glatter Gefäßmuskelzellen in der Zellkultur wurde das Migrationspotential der verschiedenen Zelltypen in der Boydenkammer getestet.

In Abbildung 5 sind die Unterschiede des Migrationspotentials quieszenter und migratorischer SMCs dargestellt. Beide wurden durch ein Serum stimuliert, welches aus proliferierenden HUVEC-Zellen gewonnen wurde oder mit PDGF versetzt worden war. Hierbei zeigt der quieszente Typ nur eine sehr geringe Migrationstendenz, während der migratorische Typ erwartungsgemäß um ein Vielfaches stärker dem Stimulus folgt. Bezüglich der Stärke des Stimulus zeigten sich keine Unterschiede zwischen der Stimulation mit HUVEC-Medium und der mit PDGF.

Western-Blot

Neben dem unterschiedlichen Migrationspotential sollten nun auch Unterschiede in der Expression von Proteinen in den verschiedenen Phänotypen nachgewiesen werden. Hierzu wurden jeweils Zellen eines Typs mit Hilfe von Western-Blots auf ihre Proteinexpression untersucht und die jeweiligen Expressionsstärken gegenübergestellt (siehe Abbildung 6).

Hierbei konnte eine stark erhöhte N-Cadherin-Expression bei den Zellen des quieszenten Typs festgestellt werden, während in den migratorischen Zellen, die an der Bildung der Neointima beteiligt sind, die Expression herabgesetzt war.

Im Gegensatz dazu blieb die Expression von β -Catenin, dem intrazellulären Bindungspartner von N-Cadherin, in beiden Phänotypen unverändert. Auch die Expression von E-Cadherin blieb in beiden Zelltypen gleichstark.

Alle Versuche wurden jeweils in drei verschiedenen Ansätzen und mit gepoolten SMCs von mindestens 3-4 Spendern durchgeführt.

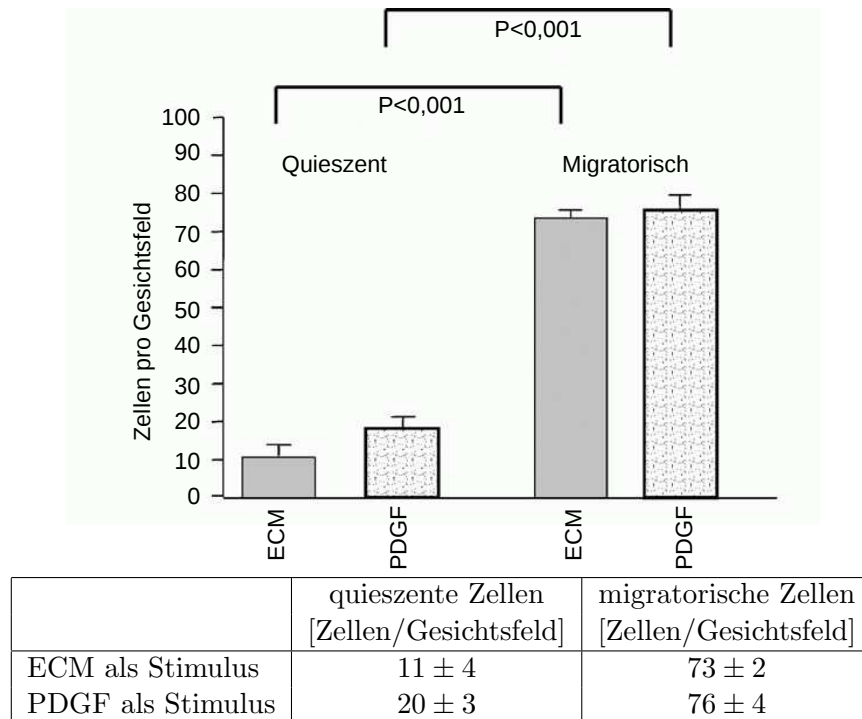


Abbildung 5: Migrationspotential quieszenter und migratorischer SMCs in der Boydenkammer

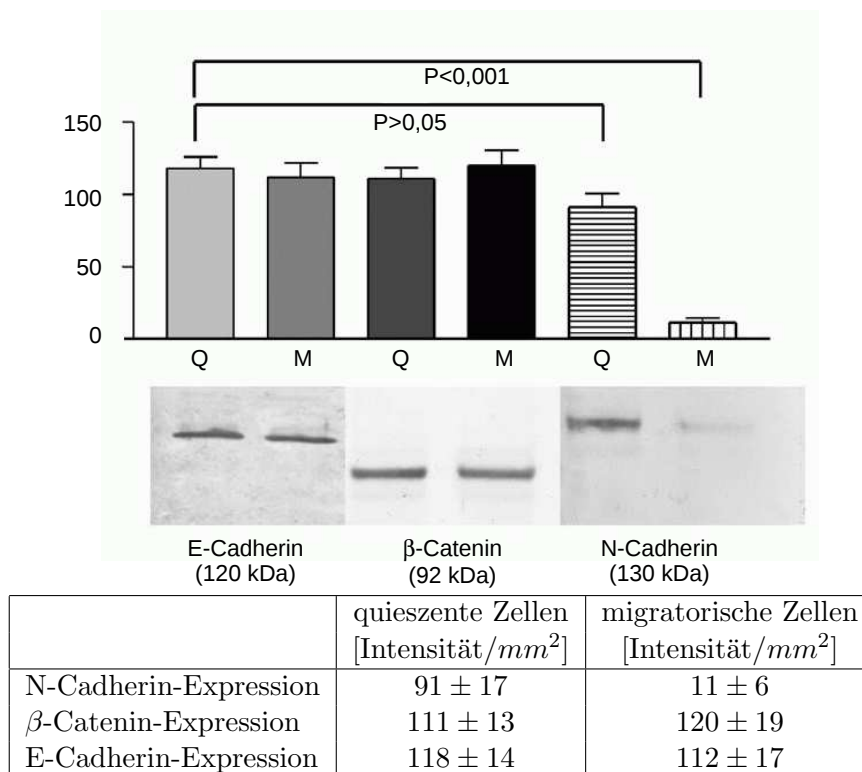


Abbildung 6: Differenzielle Expression von N-Cadherin, β-Catenin und E-Cadherin in SMCs des quieszenten (Q) und migratorischen (M) Phänotyps

3.2 Reduktion des Migrationspotentials durch Transfektion mit N-Cadherin

Um die Folgen einer veränderten Expression von N-Cadherin auf das Migrationspotential von Muskelzellen zu untersuchen, wurden SMCs des migratorischen Typs mit Expressions-Vektoren transfiziert, die für N-Cadherin oder E-Cadherin kodieren. Anschließend wurde die Expression mit Hilfe der Densitometrie bestimmt und das Migrationspotential in der Boyden-Kammer getestet.

Die Ergebnisse der N-Cadherin-Expression nach Transfektion mit unterschiedlich großen Plasmid-Mengen zeigte eine dosisabhängige Heraufregulierung von N-Cadherin. Abbildung 7 zeigt die Signalintensität nach Transfektion mit N-Cadherin *sense* bzw. pCMV-cN. Eine weit höhere Expression konnte nach Transfektion mit pCMV-cN in einer stärkeren Dosierung gezeigt werden (Abb. 8). Die mitgeführte *mock*-Kontrolle, sowie die Transfektion mit E-Cadherin *sense* hatten keine Veränderungen der N-Cadherin-Expression zur Folge (Abbildungen 7 und 8). Die Auswirkung der Expressionsstärke auf das Migrationspotential wurde mit Hilfe der Boyden-Kammer getestet. Die *mock*-Kontrolle diente hierbei stets als Vergleichswert und stand für eine Migration von 100%. Die in den Abbildungen 7 und 8 dargestellten Migrationspotentiale lassen eine Verminderung der Migration bei vermehrter N-Cadherin-Expression erkennen. Hierbei senkte die niedrigere Cadherin-Expression die Migration um etwa 25%, während ein etwa doppelt so starkes N-Cadherin-Signal die Migration um 87% herabsetzt. Die Transfektion mit E-Cadherin veränderte die Migrationseigenschaften der SMCs nicht.

3.3 Wiederherstellung des Migrationspotentials durch N-Cadherin-Blockade

Um die Hypothese zu untermauern, dass die Verminderung der N-Cadherin-Expression die Migration glatter Muskelzellen erleichtert, wurde der Zusammenhang zwischen der Blockade von N-Cadherin und dem Migrationspotential untersucht. Dazu wurde der Anti-N-Cadherin-Antikörper GC-4 verwendet, der die extrazelluläre Domäne des N-Cadherins bindet und dadurch die Bindung über N-Cadherin effektiv verhindert.

Der Migrationsversuch wurde nun mit quieszenten Zellen durchgeführt, deren N-Cadherin-Bindung durch den Antikörper geblockt wurde. Ihr Migrationspotential stieg dadurch deutlich um 87% an. Im Vergleich zu untransfizierten Kontrollen erreichten diese Zellen fast die Migrationseigenschaften des migratorischen Typs und lagen weit über denen der unbehandelten quieszenten Zellen (siehe Abbildung 9). Als Negativkontrolle wurden die quieszenten Zellen mit nichtimmunem IgG1 behandelt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der migratorischen Eigenschaften. Auch bei diesem Versuch wurde mit Zellen von 3-4 Spendern in dreifachen Ansätzen gearbeitet.

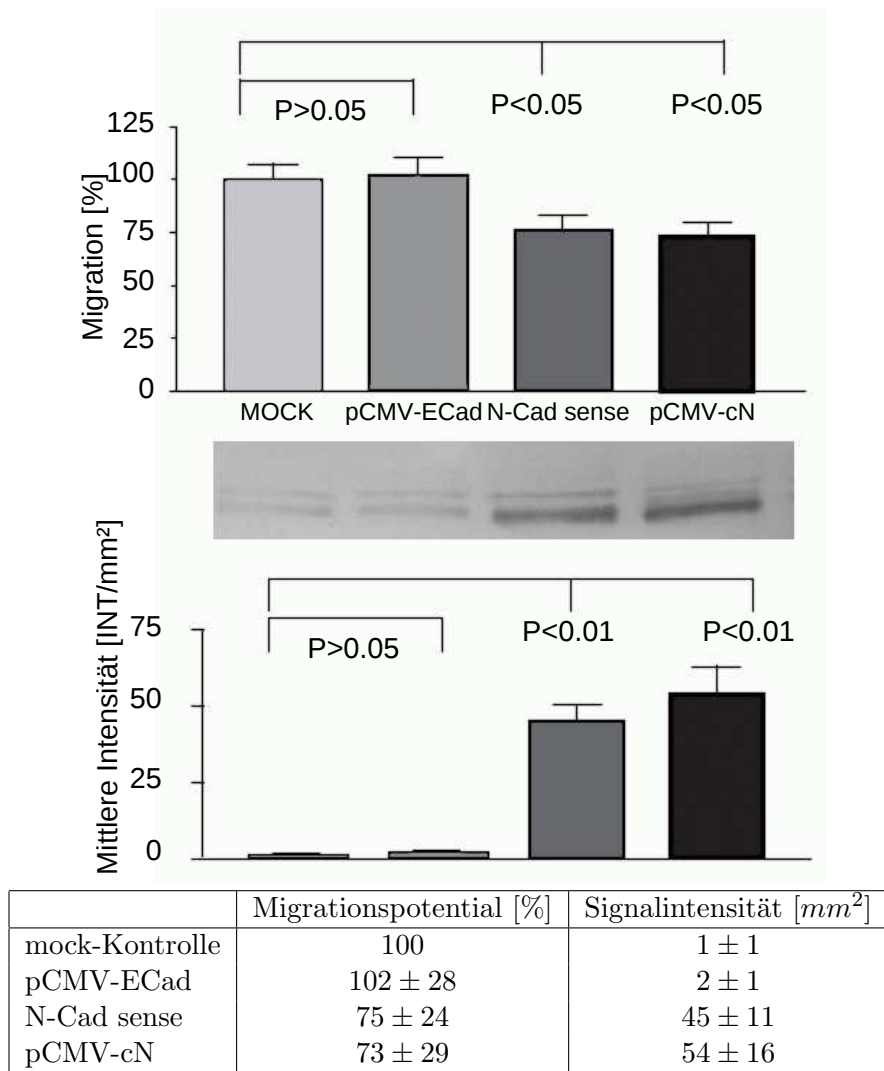


Abbildung 7: Migrationspotential und N-Cadherin-Expression migratorischer SMCs nach Transfektion mit niedriger Dosis

3.3. WIEDERHERSTELLUNG DES MIGRATIONSPOTENTIALS DURCH N-CADHERIN-BLOCKADE

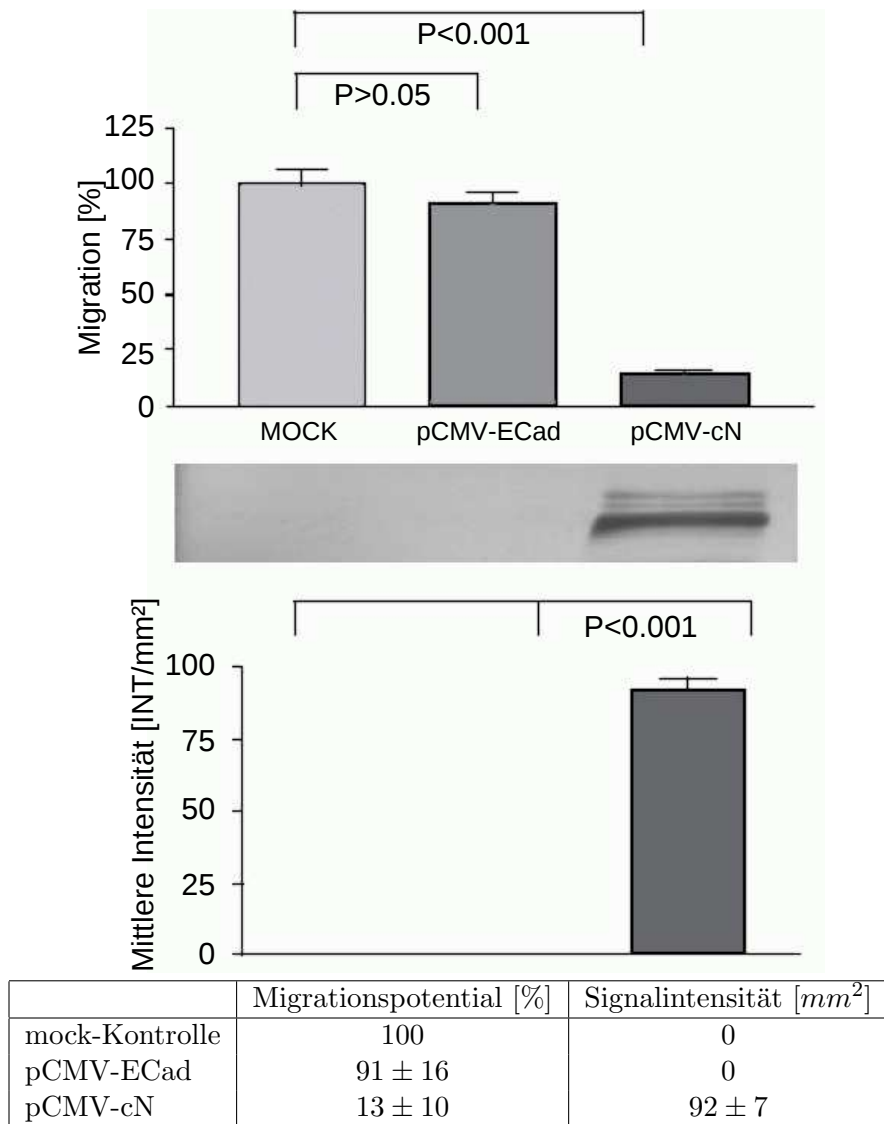


Abbildung 8: Migrationspotential und N-Cadherin-Expression migratorischer SMCs nach Transfektion mit hoher Dosis

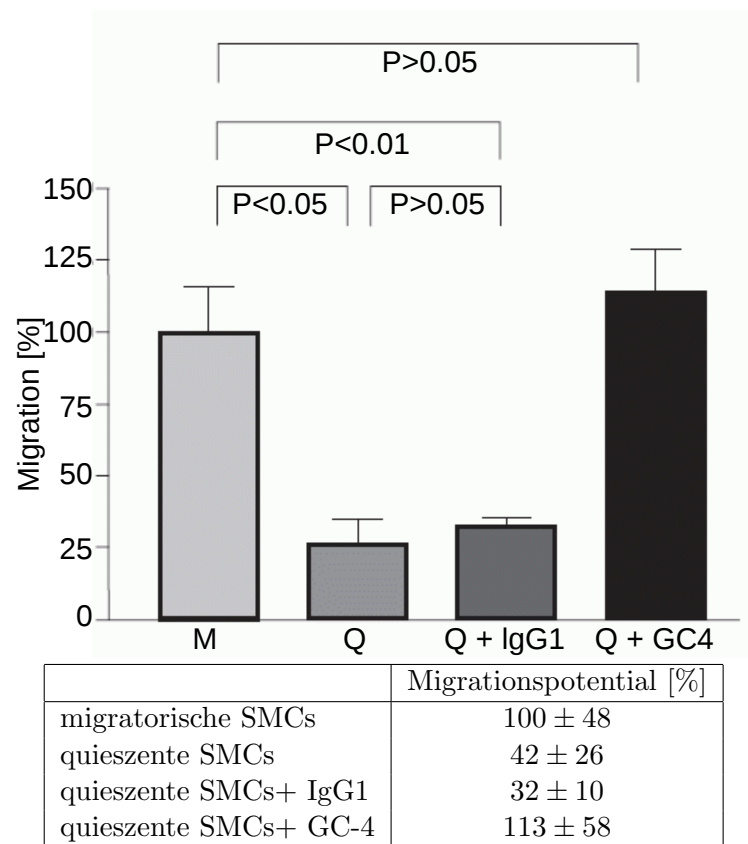


Abbildung 9: Migrationspotentiale quieszenter (Q) und migratorischer (M) SMCs nach Behandlung mit inhibitorischem Antikörper GC4

3.4 N-Cadherin beeinflusst Migration durch Modulation der RhoA-Aktivität

RhoA kann in aktiver und inaktiver Form vorliegen. Im ersten Fall ist es an GTP, im zweiten an GDP gebunden. Das aktivierte RhoA findet sich hauptsächlich an der Zellmembran, während das inaktive im Zytosol vorliegt. Bei seiner Aktivierung wechselt es teilweise die Lokalisation und wandert vom zytosolischen (*soluble fraction*) ins membranöse Kompartiment (*particulate fraction*) [62]. Demnach kann das Aktivitätslevel von RhoA in Zellen unterschiedlichen Phänotyps analysiert werden, indem der Anteil von zytosolischem und membranösem RhoA gegenübergestellt wird.

Dazu wurde die subzelluläre Lokalisation von RhoA jeweils zwei, sechs und zwölf Stunden nach Behandlung mit inhibitorischem GC-4 Antikörper bzw. Transfektion mit N-Cadherin gemessen. Die Werte für die RhoA-Aktivität wurden mit Hilfe der Densitrometrie gemessen und als Intensitäts-Werte angegeben.

Zunächst wurde die RhoA-Aktivität in unbehandelten SMCs der beiden verschiedenen Phänotypen analysiert. Die quieszenten Zellen wiesen eine hohe intrinsische Expression von N-Cadherin auf (Abb. 6), während die migratorischen Zellen deutlich weniger N-Cadherin exprimierten. Im Gegensatz dazu fanden sich in der zytosolischen Fraktion gleichbleibende Expressionswerte von RhoA, in der membranösen Fraktion migratorischer Zellen jedoch eine signifikant niedrigere RhoA-Expression (Abb. 10).

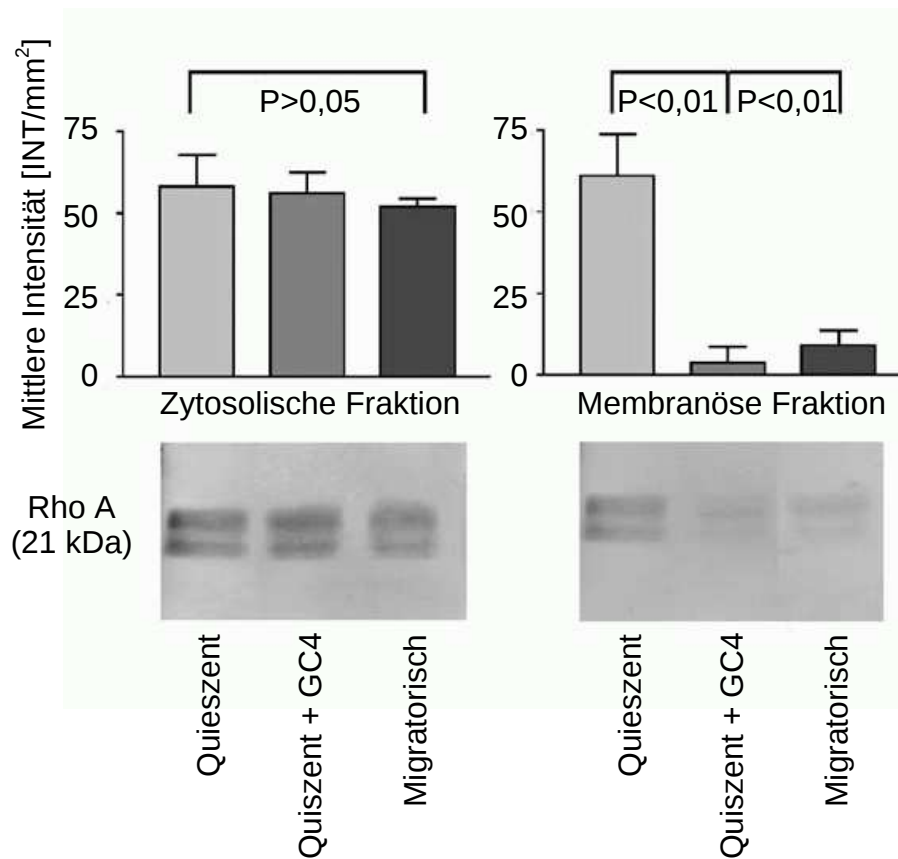
Eine ähnlich verminderte RhoA-Aktivität wurde durch die Behandlung mit inhibitorischem GC-4 Antikörper erreicht. Die Werte waren vergleichbar mit denen in migratorischen SMCs (Abb. 10). Wie auch im vorherigen Fall blieb dabei die zytosolische Fraktion unverändert.

Im dritten Ansatz wurden die Zellen des migratorischen Phänotyps mit einem N-Cadherin *sense* exprimierenden Vektor transfiziert. Dadurch sollte untersucht werden, ob im Umkehrschluss eine Heraufregulierung von N-Cadherin eine RhoA-Aktivierung in diesem Phänotyp induziert.

Im Ergebnis zeigte sich bei den mit dem *sense*-Vektor transfizierten Zellen eine signifikant höhere Aktivität von RhoA in der membranösen Fraktion als bei der Vergleichsprobe (*mock*-Kontrolle) (Abb. 11).

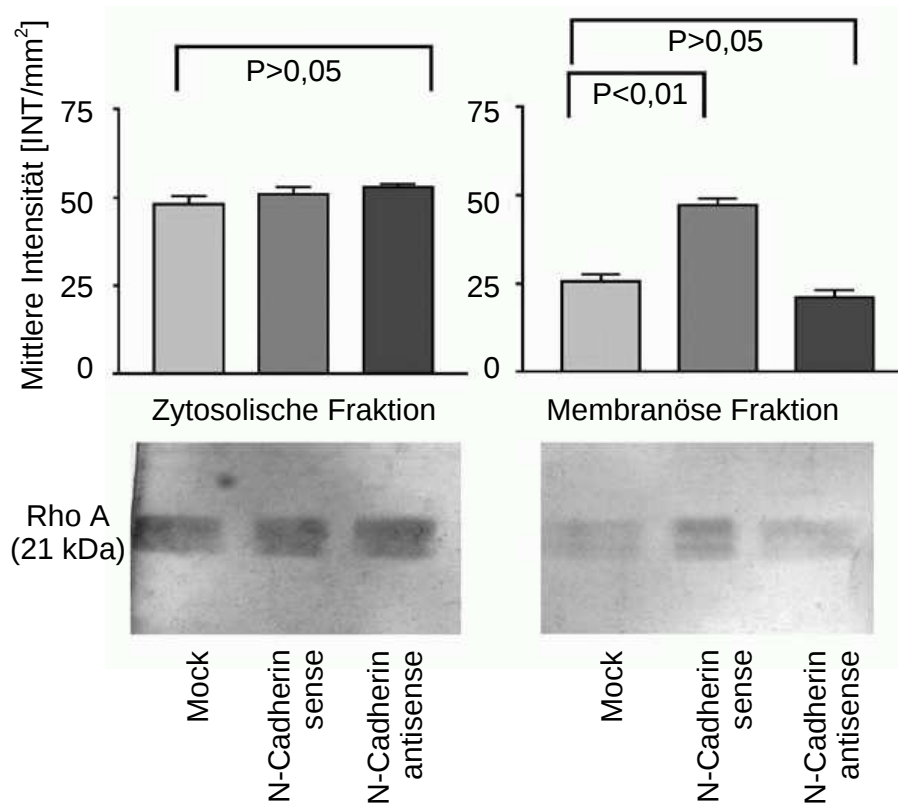
Zur Kontrolle wurde auch die RhoA-Intensität nach Transfektion mit einem *anti-sense*-Konstrukt gemessen. Es gab keine Aktivierung von RhoA und die Werte waren vergleichbar mit denen der *mock*-Kontrolle (Abb. 11). In der zytosolischen Fraktion blieb die Intensität nahezu gleich.

Die angegebenen Ergebnisse wurden jeweils zwölf Stunden nach der Behandlung gewonnen. Zwei bzw. sechs Stunden nach Transfektion konnte nur eine leichte RhoA-Aktivierung festgestellt werden.



	zytosolische Fraktion [Intensität/mm ²]	membranöse Fraktion [Intensität/mm ²]
quieszente SMCs	58 ± 17	61 ± 22
quieszent+GC-4	61 ± 22	4 ± 8
migratorische SMCs	52 ± 4	9 ± 8

Abbildung 10: RhoA-Expression in der zytosolischen und der membranösen Fraktion nach Behandlung mit inhibitorischem Antikörper



	zytosolische Fraktion [Intensität/mm ²]	membranöse Fraktion [Intensität/mm ²]
mock-Kontrolle	48 ± 4	26 ± 4
N-Cadherin sense	51 ± 3	47 ± 4
N-Cadherin antisense	53 ± 1	21 ± 4

Abbildung 11: RhoA-Expression in der zytosolischen und der membranösen Fraktion nach Transfektion

3.5 N-Cadherin beeinflusst das Aktin-Zytoskelett durch Modulation von RhoA

Im folgenden Versuch wurde der Einfluss der RhoA-Aktivität auf das Aktin-Zytoskelett der Zelle untersucht. Sollte es durch eine RhoA-Aktivierung zu einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts kommen, kann dies mit Hilfe der Immunfluoreszenz dargestellt werden. Dazu wurde fluoreszenzmarkiertes Phalloidin verwendet, das es ermöglicht, das Muster der Aktinfasern sichtbar zu machen.

Die Unterschiede in der Formation der Fasern sind in Abbildung 12 dargestellt. In den quieszenten Zellen findet sich ein dichtes Fasernetz entlang der Zellachse. Sie besitzen eine spindelzellartige Form (Abb. 12 A und B). Im Gegensatz dazu sind in den Zellen des migratorischen Typs deutlich wenige Fasern eingelagert. Die Zellkörper sind breiter und es zeigen sich Zellausläufer.

Ein ganz ähnliches Bild ergab sich nach der Behandlung quieszenter Zellen mit GC-4, einem inhibitorischen Antikörper. Bei der Morphologie dieser Zellen konnte ebenfalls ein deutlich reduzierter Anteil an Fasern festgestellt werden (Abb. 12 C und D).

Transfiziert man den migratorischen Zelltyp mit der *mock*-Kontrolle, ist eine reduzierte Faserformation zu beobachten, die der Morphologie untransfizierter Zellen gleicht (Abb. 12 E und F). Im Gegensatz dazu bilden *sense*-transfizierte Zellen ein deutlich verdichtetes Fasernetz aus (Abb. 12 G und H). Die Transfektion mit dem *antisense*-Vektor zeigte Ergebnisse vergleichbar mit denen *mock*-transfizierter Zellen.

3.6 N-Cadherin-Expression in vivo

Nach Untersuchung der differentiellen Expression von N-Cadherin in SMCs und der Evaluation der funktionellen Relevanz, wurde die in-vivo-Expression untersucht.

Zur Analyse der N-Cadherin-Expression in vivo wurden porcine dilatierte und undilatierte Koronargefäße nach 14, 28 oder 90 Tagen verwendet. Die Ausbildung einer Neointima konnte bei allen dilatierten Arterien lichtmikroskopisch festgestellt werden. Ein Maximum war nach 90 Tagen zu verzeichnen. Die nichtdilatierten Arterien zeigten keine Proliferation der Intima. Abbildung 13 A zeigt die Wand einer nichtdilatierten Arterie. Hier findet sich eine starke N-Cadherin-Expression in der Gefäßmedia. Dagegen kann in der Adventitia kein Signal festgestellt werden.

Die Wand eines dilatierten Gefäßes 14 Tage nach dem Eingriff (Abb. 13 B) lässt im Bereich der Neointima eine deutliche Verringerung der N-Cadherin-Expression erkennen. Im Gegensatz dazu exprimiert die umgebende Media weiterhin ein hohes Maß an N-Cadherin. Die Intensität des Signals ist in der Neointima signifikant geringer als in der Media. In der Adventitia konnte keine relevante Expression ausgemacht werden.

Im weiteren Verlauf, 28 Tage nach Intervention, stieg die N-Cadherin-Expression in der Neointima langsam wieder an (Abb. 13 C/D). Nach 90 Tagen hatte die N-Cadherin-

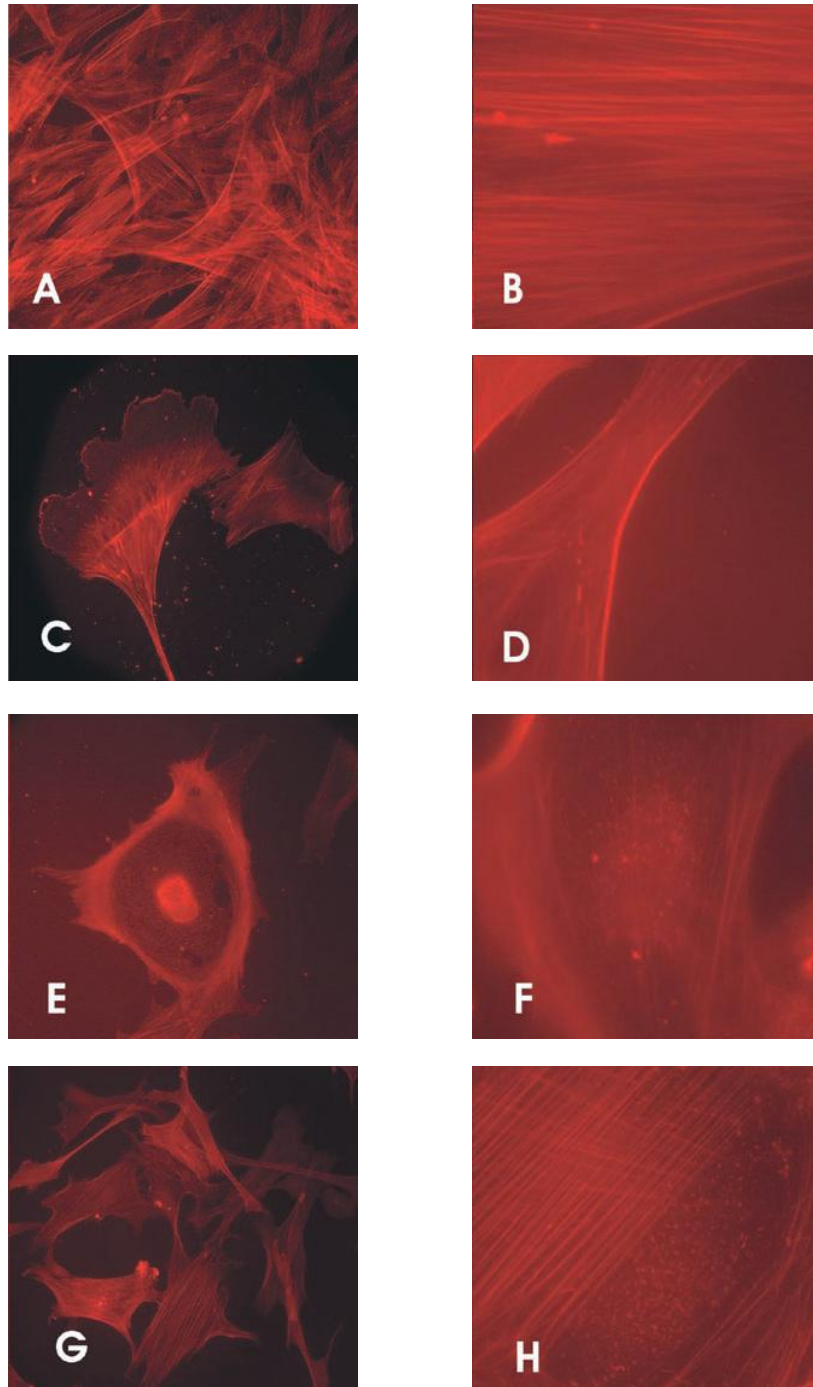


Abbildung 12: *stress-fiber*-Formation in der Immunfluoreszenz nach Behandlung mit inhibitorischem Antikörper (A-D) bzw. nach Transfektion (E-H)

- (A) quieszente SMCs (100-fache Vergrößerung)
- (B) quieszente SMCs (1000-fache Vergrößerung)
- (C) quieszente SMCs, GC-4 Antikörper (100-fache Vergrößerung)
- (D) quieszente SMCs, GC-4 Antikörper (1000-fache Vergrößerung)
- (E) migratorische SMCs, *mock*-Kontrolle (100-fache Vergrößerung)
- (F) migratorische SMCs, *mock*-Kontrolle (1000-fache Vergrößerung)
- (G) migratorische SMCs, N-Cadherin *sense*-Vektor (100-fache Vergrößerung)
- (H) migratorische SMCs, N-Cadherin *sense*-Vektor (1000-fache Vergrößerung)

Expression wieder fast die gleichen Werte erreicht wie in der Media der unverletzten Arterie (Abb. 13 E/F).

Die Quantifizierung der N-Cadherin-Expression zeigt Abbildung 16. Zu beachten ist hierbei, dass der Vergleichswert für die Media in den ersten beiden Fällen aus dem gleichen Gefäß stammt, nach 90 Tagen jedoch aus der einer unverletzten Arterie.

Um sicherzustellen, dass die Unterschiede in der N-Cadherin-Expression auf dem muskelzellspezifischen N-Cadherin basierten, wurde zusätzlich die jeweilige Expression von SMA in der Gefäßwand bestimmt (Abb. 14 und 16 B). Es zeigten sich ähnliche Intensitäten in Media und Neointima aller Gefäße.

In der Analyse der β -Catenin-Expression ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Die Signalintensitäten in der Neointima einer dilatierten Arterie und in der Media einer undilatierten Arterie (Abb. 15 und 16 C) ergaben bei allen Gefäßen 14, 28 und 90 Tagen nach Verletzung etwa gleiche Werte.

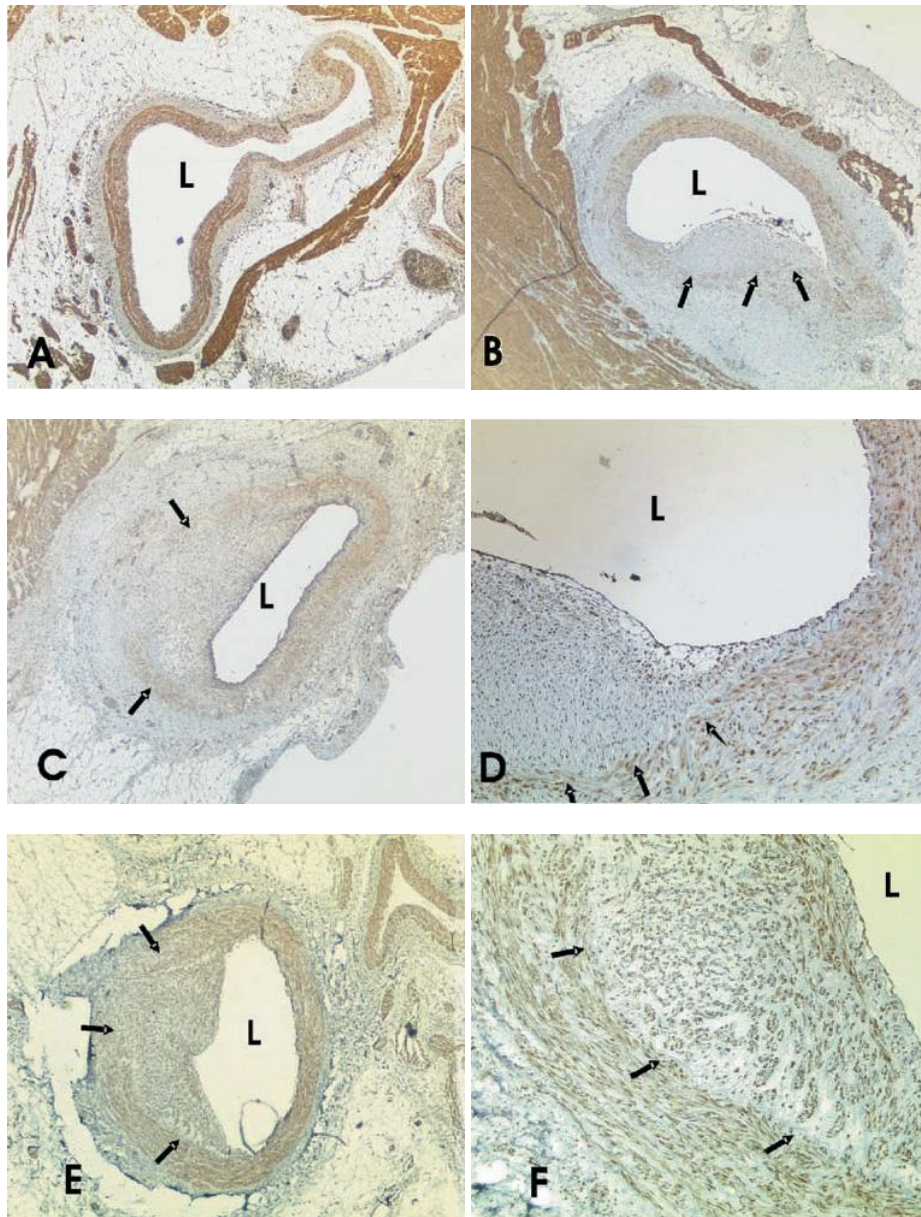


Abbildung 13: N-Cadherin-Expression in immunhistochemischen Schnitten

- (A) Undilatierter Arterie (50-fache Vergrößerung)
- (B) 14 Tage nach Gefäßdilatation (50-fache Vergrößerung)
- (C) 28 Tage nach Gefäßdilatation (50-fache Vergrößerung)
- (D) 28 Tage nach Gefäßdilatation (200-fache Vergrößerung)
- (E) 90 Tage nach Gefäßdilatation (50-fache Vergrößerung)
- (F) 90 Tage nach Gefäßdilatation (200-fache Vergrößerung)

(L= Lumen, Pfeile markieren die Media/Neointima-Grenze)

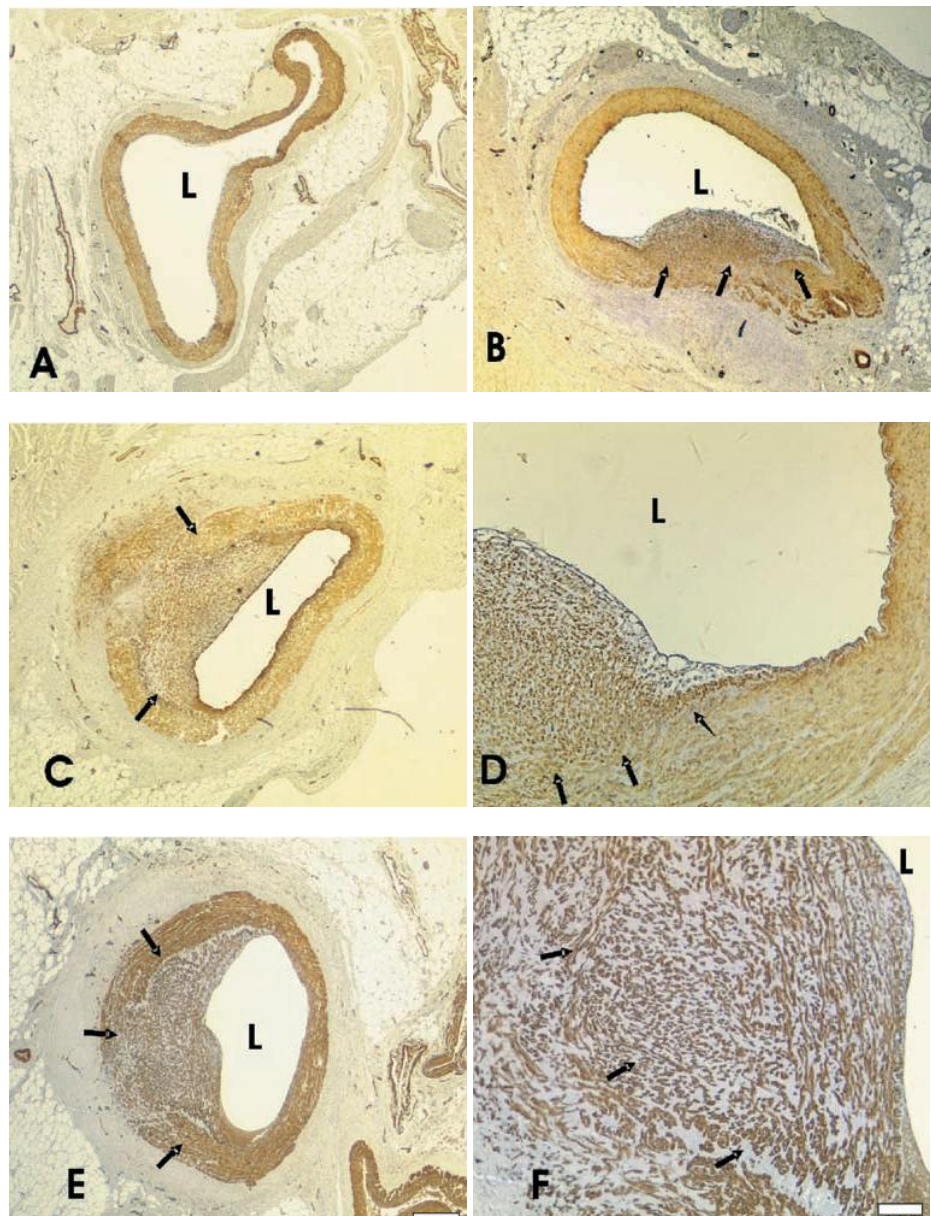


Abbildung 14: SMA-Expression in immunhistochemischen Schnitten

- (A) Undilatierte Arterie (50-fache Vergrößerung)
- (B) 14 Tage nach Gefäßdilatation (50-fache Vergrößerung)
- (C) 28 Tage nach Gefäßdilatation (50-fache Vergrößerung)
- (D) 28 Tage nach Gefäßdilatation (200-fache Vergrößerung)
- (E) 90 Tage nach Gefäßdilatation (50-fache Vergrößerung)
- (F) 90 Tage nach Gefäßdilatation (200-fache Vergrößerung)

(L= Lumen, Pfeile markieren die Media/Neointima-Grenze)

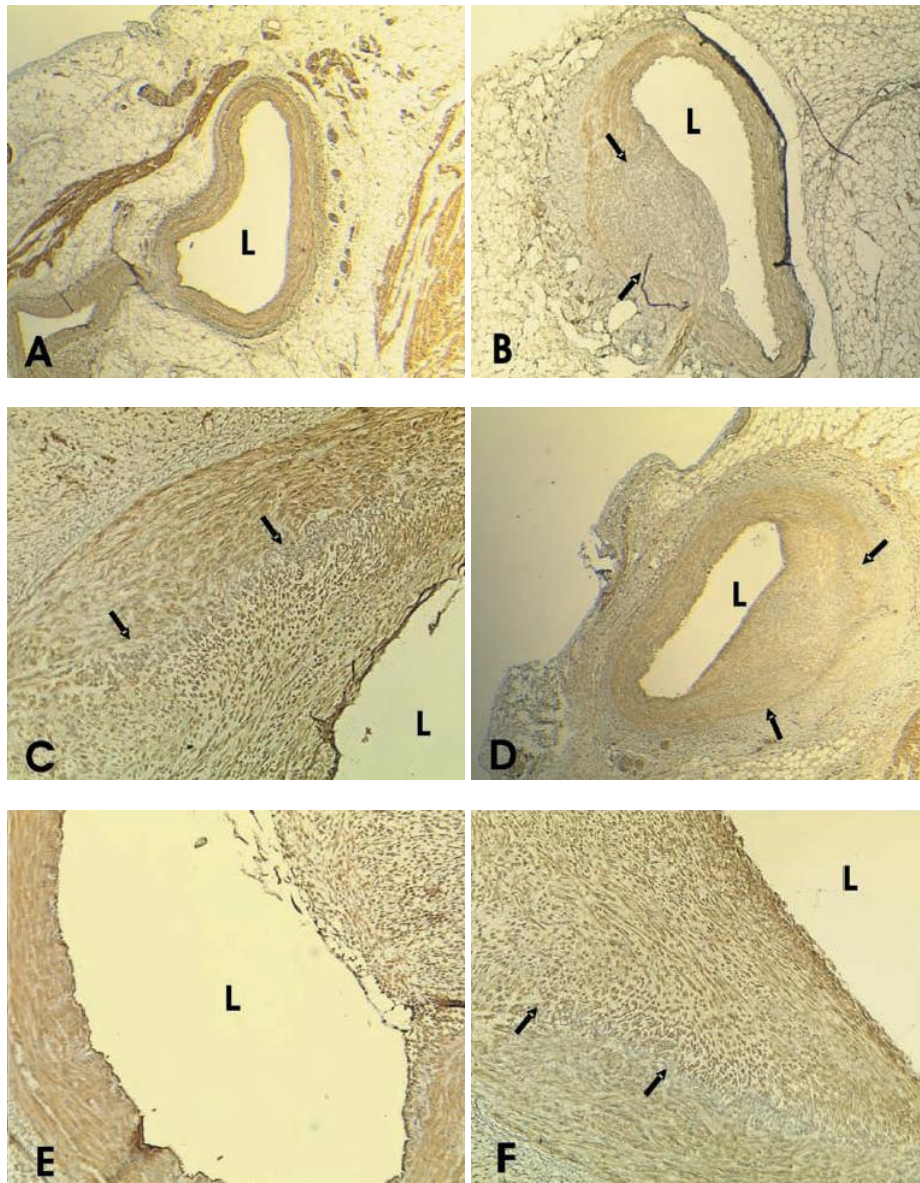


Abbildung 15: β -Catenin-Expression in immunhistochemischen Schnitten

- (A) In der Media einer undilatierten Arterie (50-fache Vergrößerung)
- (B) In der Media 14 Tage nach Gefäßdilatation (50-fache Vergrößerung)
- (C) In der Media 14 Tage nach Gefäßdilatation (200-fache Vergrößerung)
- (D) In der Media 28 Tage nach Gefäßdilatation (50-fache Vergrößerung)
- (E) In der Media 28 Tage nach Gefäßdilatation (200-fache Vergrößerung)
- (F) In der Media 90 Tage nach Gefäßdilatation (200-fache Vergrößerung)

(L= Lumen, Pfeile markieren die Media/Neointima-Grenze)

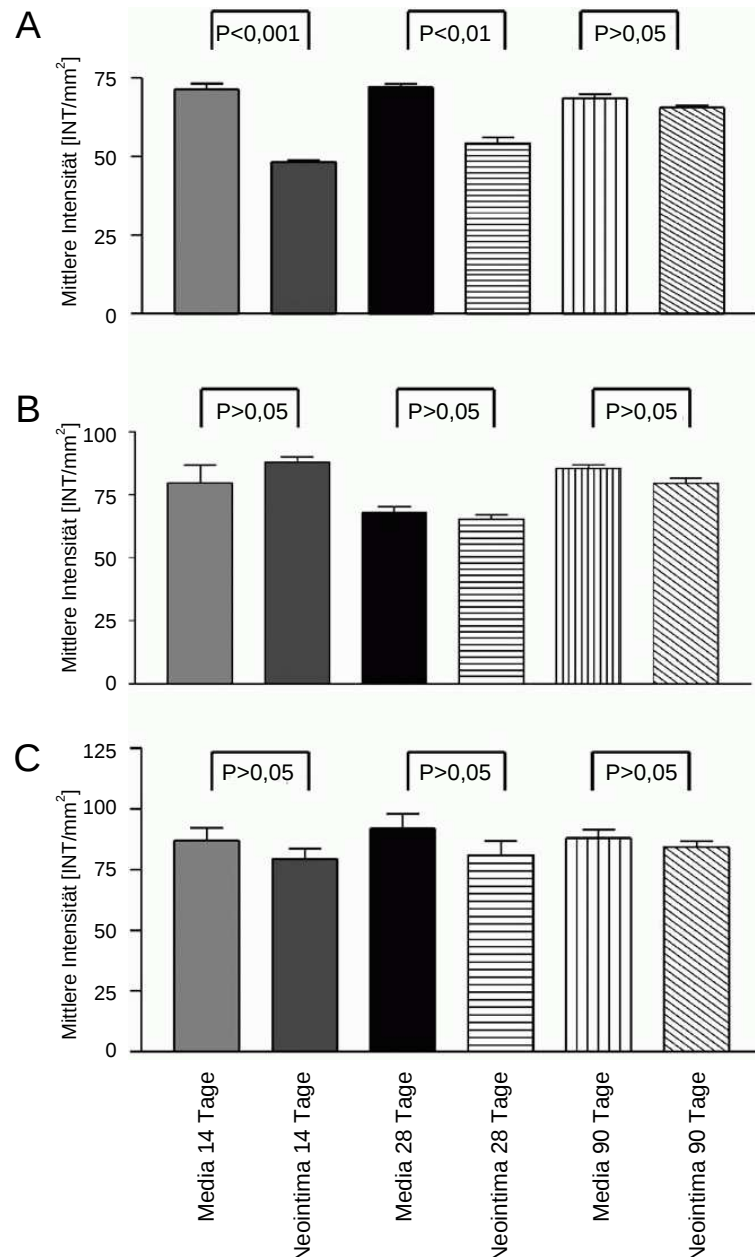


Abbildung 16: Quantifizierung der Protein-Expression in Neointima und Media in immunhistochemischen Schnitten

- (A) N-Cadherin-Expression [Pixel-Intensität/ mm^2]
- (B) SMA-Expression [Pixel-Intensität/ mm^2]
- (C) β -Catenin-Expression [Pixel-Intensität/ mm^2]

4 Diskussion

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen Folgendes:

1. Während der Zellmigration, sowohl in vivo als auch in vitro, ist die N-Cadherin-Expression in SMCs vermindert. Dagegen bleibt die Expression von β -Catenin, seinem intrazellulären Bindungspartner, unverändert.
2. Wird N-Cadherin blockiert oder in seiner Expression vermindert, führt dies in vitro zu einer Aktivierung der SMC-Migration. Dies ist mit einer Reduktion der RhoA-Aktivität assoziiert.

4.1 Bedeutung von N-Cadherin für die Migration und Proliferation von SMCs

Es konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der Entstehung von Restenosen die Expression des Adhäsionsproteins N-Cadherin signifikant abnimmt und sich gleichzeitig das Migrationspotential der proliferierenden Zellen verstärkt. Im Gegensatz dazu blieb die Expression von β -Catenin unverändert.

Signifikante Veränderungen des Expressionslevels von Cadherinen sind als Mechanismus in der Kanzerogenese bereits gut untersucht. Die Transformation von epithelialen zu mesenchymalen Zellen, beispielsweise im Rahmen der Entstehung von Magenkarzinomen, geht hierbei einher mit einer deutlich verminderten Cadherin-Expression. Neben anderen Faktoren spielt diese Verschiebung eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Tumordinvasion und -metastasierung [50].

Die Beobachtung einer Modulation des Phänotyps der glatten Muskelzellen nach einer Gefäßintervention lässt sich in diesem Zusammenhang durchaus mit der Zelltransformation in der Tumorentstehung vergleichen. In beiden Fällen liegt eine Herabregulierung von Cadherinen zugrunde, die zu einem verstärkten Migrationspotential führt. Während in der Kanzerogenese vornehmlich E-Cadherin von Bedeutung ist, scheint für das Migrationsverhalten glatter Gefäßmuskelzellen N-Cadherin die entscheidende Rolle zu spielen. Eine differentielle Regulation von E-Cadherin konnte in der Entstehung der Restenose nicht nachgewiesen werden, obwohl in früheren Studien eine vermehrte Expression von E-Cadherin in arteriosklerotischen Läsionen beschrieben wurde [63].

Die spezielle Bedeutung von N-Cadherin wurde bereits im Zusammenhang mit der frühen embryonalen Entwicklung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass auch bei der regelrechten Ausbildung des Neuralrohrs bei Hühnerembryos Zellwanderungsprozesse stattfinden, die der Steuerung durch das Expressionslevel von N-Cadherin unterliegen. Eine verminderte Expression von N-Cadherin führte zu einer verstärkten Auswanderung von Zellen aus dem Neuralrohr [64]. In ähnlicher Weise verhalten sich glatte Gefäßmuskelzellen, deren Migrationspotential durch die Transfektion mit N-Cadherin stark vermindert wird. Bezüglich der inhibitorischen Wirkung einer Überexpression von N-Cadherin auf die Migration von Zellen kamen Nakagawa et al. [64] zu vergleichbaren Ergebnissen wie diese Doktorarbeit. Durch Einführen eines adenoviralen Expressionsvektors wurde eine Überexpression von N-Cadherin erreicht, die die Emigration neuraler Zellen verhinderte.

Die Funktion von N-Cadherin bei der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen wurde bereits von Uglow et al. [51] näher betrachtet. Diese Arbeitsgruppe untersuchte glatte Muskelzellen aus humanen Venen (V. saphena) nach Stimulation der Proliferation mit FKS und PDGF in vitro. Im Ergebnis zeigte sich eine verminderte Expression von N-Cadherin in proliferierenden Zellen, während sich für β -Catenin keine differentielle Regulation nachweisen ließ. In einer weiteren Studie zeigten Slater et al. [65] an einem Rattenmodell die differentielle Expression von R-Cadherin und β -Catenin im Rahmen der Zellproliferation. Es konnte eine Reduktion des Cadherin-Levels nach Gefäßverletzung, sowie ein vermehrtes Auftreten von β -Catenin festgestellt werden.

Eine andere Arbeitsgruppe kam hingegen zu gegensätzlichen Resultaten. Jones et al. [52] analysierten die Expression von N-Cadherin an einem Rattenmodell. In den Karotiden von Ratten wurde eine und drei Wochen nach Gefäßverletzung, entgegen den Ergebnissen von Uglow et al., eine vermehrte N-Cadherin-Expression in der Neointima nachgewiesen. In diesem Kontext wurde allerdings bereits von anderen Autoren kritisch untersucht, welche Auswirkungen die Wahl des Restenosemodells auf die Ergebnisse hat [66]. Demnach reagieren nicht alle Gefäße verschiedener Spezies gleich auf die Gefäßintervention. Da die Neointima der Ratte hauptsächlich aus proliferierenden Muskelzellen besteht und kaum extrazelluläre Matrix aufweist, scheint eher das Schweinemodell den Verhältnissen beim Menschen nahe zu kommen.

Die in der vorgelegten Arbeit dargestellten Ergebnisse sind mit denen von Uglow et al. gut kompatibel, stehen aber offensichtlich im Widerspruch zu denen von Jones et al. Dieser Widerspruch könnte aber möglicherweise durch die Unterschiede in der N-Cadherin-Regulation bei verschiedenen Spezies bedingt sein. Insgesamt zeigen die zitierten Studien, dass N-Cadherin eine wichtige Rolle im Rahmen der Zellmigration spielt.

4.2 Induktion von Zellmigration durch Veränderung der N-Cadherin-Expression

Die verschiedenen Vorgänge im Rahmen der Zellmigration unterliegen komplexen Mechanismen. Zu den wichtigsten Veränderungen gehören die Umstrukturierung von Zell-Zell-Kontakten, sowie eine Umorganisation von Kontakten zwischen den Zellen und der sie umgebenden extrazellulären Matrix. Ebenso von Bedeutung ist die differentielle Ausrichtung des Aktin-Zytoskeletts [46], [48], [47].

In früheren Studien ist bereits ausführlich die Funktion von N-Cadherin als Adhäsionsprotein untersucht worden. Es ist bekannt, dass N-Cadherine homophile und heterophile Verbindungen eingehen, die bezüglich ihrer Festigkeit und Spezifität schwanken können. Diese Studie konnte zeigen, dass bei glatten Muskelzellen, deren N-Cadherin-Expression durch Transfektion verstärkt wurde, das Migrationspotential signifikant abnimmt. Demnach wird die Zellmigration maßgeblich von einer veränderten N-Cadherin-Expression und einer damit einhergehenden verstärkten Bindungsaffinität beeinflusst. Für andere Zellverbände wurden bereits ähnliche Mechanismen beschrieben. Delannoy et al. [67] konnten bei humanen Osteoblasten einen Einfluss der N-Cadherin-Expression auf die Differenzierung und Adhäsion der Zellen nachweisen.

Das migratorische Potential von SMCs scheint somit von der Veränderung der N-Cadherin-Expression reguliert zu werden. Dieses Phänomen wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der Boydenkammer untersucht. Da im Rahmen der Zellmigration in der Boydenkammer jedoch speziell die Zell-Zell-Kontakte aufgehoben sind, muss postuliert werden, dass zusätzliche Signalwege für die Cadherin-vermittelte Zellmigration bestehen.

Hierzu untersuchten Niessen und Gumbiner [68] mittels eines Flussmodells das Verhalten von Zellen unterschiedlicher Cadherinspezifität. Zellen, die unterschiedliche Subtypen von Cadherinen exprimieren, separieren sich entsprechend im Aggregations-Assay. Jedoch zeigte sich, dass die Grundlage dieses Ordnungsprozesses nicht allein die Zugehörigkeit zu einer bestimmten homologen Sequenz der extrazellulären Domäne darstellt. Die Spezifität der Adhäsion zwischen den Zellen ist demnach nicht ausschließlich durch das Ausmaß ihrer extrazellulären Bindungsspezifität festgelegt, sondern scheint noch auf weiteren Signalwegen zu beruhen, die neben extrazellulären auch intrazelluläre Signale mit einbeziehen. Ein ähnlicher Regulationsmechanismus wurde bereits für die Gruppe der Integrine beschrieben [69].

4.3 Assoziation von N-Cadherin-Expression und Modulation des Zytoskeletts

Die Signalkaskade, die beim Prozess der Zellmigration abläuft, wird maßgeblich von einer wichtigen Gruppe von Signaltransduktionsmolekülen, den Rho-GTPasen, vermit-

telt [49]. In dieser Studie konnte in ruhenden, quieszenten SMCs eine deutlich höhere RhoA-Aktivität nachgewiesen werden als in proliferierenden, migratorischen Zellen. Die Aktivität von RhoA in quieszenten Zellen konnte sowohl durch Herabregulierung von N-Cadherin, als auch durch eine N-Cadherin-Blockade mit einem inhibitorischen Antikörper vermindert werden. Im Umkehrschluss konnte die RhoA-Aktivität durch eine Überexpression von N-Cadherin induziert werden.

Anhand dieser Versuchsergebnisse zeigt sich, dass in glatten Gefäßmuskelzellen eine vermehrte N-Cadherin-Expression den RhoA-Signalweg aktiviert und zu einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts führt. Diese strukturellen Veränderungen konnten mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. In früheren Studien wurde der Einfluss von N-Cadherin auf die RhoA-Aktivierung bereits an anderen Zelltypen untersucht. Charasse et al. [55] analysierten hierzu die RhoA-Aktivität in Skelettmuskelzellen im Rahmen des Differenzierungsprozesses. Die N-Cadherin-vermittelte Adhäsion führte zu einer Aktivierung skelettmuskelspezifischer Promoter (p21, p27) und zu einer verstärkten RhoA-Aktivierung. Eine Studie von Wickstrom et al. [70] konnte bei der Untersuchung von Endothelzellen zeigen, dass Endostatin über ein vermindertes Aktivitätslevel von RhoA eine Hemmung der Migration durch Abbau von Aktinfasern und lokalisierten Adhäsionen zur Folge hat. Der genaue Ablauf der N-Cadherin-vermittelten Signaltransduktion über RhoA muss allerdings in zukünftigen Studien noch detailliert untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen wie der Atherosklerose, aber auch in der Entstehung von Restenosen nach PTCA-Behandlung als Sonderfall der akzellerierten Atherosklerose spielen glatte Gefäßmuskelzellen eine bedeutende Rolle. Ihre Fähigkeit zu Proliferation und Migration, sowie die Variabilität ihres Phänotypus bestimmen hierbei entscheidend das pathophysiologische Geschehen.

Diese Doktorarbeit untersucht die Regulationsmechanismen im Rahmen der Zellmigration auf der Ebene der Adhäsionsproteine. Insbesondere ist hier der Zusammenhang zwischen der N-Cadherin-Expression und dem Migrationspotential und Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen von Interesse.

In den in-vitro-Studien wurden zwei verschiedene SMC-Phänotypen in der Zellkultur induziert, um dann mittels modifizierter Boydenkammer deren unterschiedliches Potential zur Migration und Invasion zu analysieren, sowie mittels Western-Blot Informationen bezüglich der N-Cadherin-Expression zu erhalten. Hierbei dienten die beiden Phänotypen als Modell für die quieszenten (konfluenten) Muskelzellen in einer gesunden Arterienwand einerseits und die proliferierenden und zur Migration fähigen SMCs, beispielsweise nach Eingriffen wie der PTCA, andererseits. Es zeigte sich in migratorischen SMCs eine deutlich geringere N-Cadherin-Expression, als in denen des quieszenten Typs. Umgekehrt führte eine Blockade von N-Cadherin zu einem gesteigerten Migrationspotential glatter Muskelzellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine verminderte N-Cadherin-Expression nicht nur die Migration von SMCs beeinflusst, sondern auch eine Modulation der RhoA-Aktivität zur Folge hat und somit Einfluss auf das Zytoskelett und die Zellmorphologie nimmt.

Im in-vivo-Teil der Arbeit wurde die N-Cadherin-Expression im porcinen Restenosemodell untersucht. Hierzu wurde im Tierversuch eine restenotische Läsion der Gefäßwand erzeugt, um anschließend die resultierenden zellulären Veränderungen in den SMCs immunhistologisch analysieren zu können. Dabei konnten die Ergebnisse aus den Zellkulturversuchen bestätigt werden. Es fand sich eine signifikant verringerte N-Cadherin-Expression in den Zellen der frisch entstandenen Neointima, während die des intrazellulären Bindungspartners β -Catenin gleich blieb.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Adhäsionsprotein N-Cadherin eine wichtige Funktion in der komplexen Regulation der Zellmigration und -morphologie spielt. Die Untersuchung kann dazu dienen, die pathophysiologischen Vorgänge im

5. ZUSAMMENFASSUNG

Rahmen der Atherosklerose und Restenoseentstehung besser zu verstehen und so Fortschritte in Therapie und Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen zu erreichen.

Literaturverzeichnis

- [1] P. Libby. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 91(11):2844–2850, Jun 1995.
- [2] R. Ross. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362(6423):801–809, Apr 1993.
- [3] J. Chamley-Campbell, GR. Campbell, and R. Ross. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev*, 59(1):1–61, Jan 1979.
- [4] O. Kocher, O. Skalli, D. Cerutti, F. Gabbiani, and G. Gabbiani. Cytoskeletal features of rat aortic cells during development: an electron microscopic, immunohistochemical, and biochemical study. *Circ Res.*, 56:829–838, 1985.
- [5] GK. Owens. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*, 75(3):487–517, Jul 1995.
- [6] R. Blindt, F. Vogt, D. Lamby, U. Zeiffer, N. Krott, K. Hilger-Eversheim, P. Hanrath, J. vom Dahl, and AK. Bosserhoff. Characterization of differential gene expression in quiescent and invasive human arterial smooth muscle cells. *J Vasc Res*, 39(4):340–352, Jul-Aug 2002.
- [7] J. Thyberg, K. Blomgren, U. Hedin, and M. Dryjski. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res*, 281(3):421–433, Sep 1995.
- [8] E. Bruckenberg. Herzbericht 2004 mit Transplantationschirurgie 17. Bericht. Sektorenübergreifende Gesundheitsberichterstattung zur Kardiologie und Herzchirurgie in Deutschland mit vergleichenden Daten aus Österreich und der Schweiz .
- [9] C. Hanet, W. Wijns, X. Michel, and E. Schroeder. Influence of balloon size and stenosis morphology on immediate and delayed elastic recoil after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*, 18(2):506–511, Aug 1991.
- [10] R. Erbel, M. Haude, HW. Höpp, D. Franzen, HJ. Rupprecht, B. Heublein, K. Fischer, P. de Jaegere, P. Serruys, W. Rutsch, and P. Probst. Coronary-artery stenting compared with balloon angioplasty for restenosis after initial balloon angioplasty. Restenosis Stent Study Group. *N Engl J Med*, 339(23):1672–1678, Dec 1998.
- [11] A. Fischer, H. Wieneke, H. Brauer, and R. Erbel. [Metallic biomaterials for coronary stents]. *Z Kardiol*, 90(4):251–262, Apr 2001.

- [12] AW. Clowes and SM. Schwartz. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res*, 56(1):139–145, Jan 1985.
- [13] RS. Schwartz, JG. Murphy, WD. Edwards, AR. Camrud, RE. Vliestra, and DR. Holmes. Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation*, 82(6):2190–2200, Dec 1990.
- [14] GA. Ferns and TY. Avades. The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models. *Int J Exp Pathol*, 81(2):63–88, Apr 2000.
- [15] A. Fernández-Ortiz, JJ. Badimon, E. Falk, V. Fuster, B. Meyer, A. Mailhac, D. Weng, PK. Shah, and L. Badimon. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol*, 23(7):1562–1569, Jun 1994.
- [16] RS. Schwartz, KC. Huber, JG. Murphy, WD. Edwards, AR. Camrud, RE. Vlietstra, and DR. Holmes. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol*, 19(2):267–274, Feb 1992.
- [17] N. Kipshidze, G. Dangas, M. Tsapenko, J. Moses, MB. Leon, M. Kutryk, and P. Serruys. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol*, 44(4):733–9, Aug 2004.
- [18] A. Jawien, DF. Bowen-Pope, V. Lindner, SM. Schwartz, and AW. Clowes. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest*, 89(2):507–511, Feb 1992.
- [19] J. Fingerle, R. Johnson, AW. Clowes, MW. Majesky, and MA. Reidy. Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(21):8412–8416, Nov 1989.
- [20] ZS. Galis, GK. Sukhova, MW. Lark, and P. Libby. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 94(6):2493–2503, Dec 1994.
- [21] ZS. Galis and JJ. Khatri. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*, 90(3):251–262, Feb 2002.
- [22] JG. Pickering, LH. Chow, S. Li, KA. Rogers, EF. Rocnik, R. Zhong, and BM. Chan. alpha5beta1 integrin expression and luminal edge fibronectin matrix assembly by smooth muscle cells after arterial injury. *Am J Pathol*, 156(2):453–465, Feb 2000.
- [23] GA. Stouffer, Z. Hu, M. Sajid, H. Li, G. Jin, MT. Nakada, SR. Hanson, and MS. Runge. Beta3 integrins are upregulated after vascular injury and modulate thrombospondin- and thrombin-induced proliferation of cultured smooth muscle cells. *Circulation*, 97(9):907–915, Mar 1998.
- [24] PW. Serruys, MJ. Kutryk, and AT. Ong. Coronary-artery stents. *N Engl J Med*, 354(5):483–495, Feb 2006.

- [25] R. Mehran, GS. Mintz, JJ. Popma, AD. Pichard, LF. Satler, KM. Kent, J. Griffin, and MB. Leon. Mechanisms and results of balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis. *Am J Cardiol*, 78(6):618–622, Sep 1996.
- [26] EPISTENT. Randomised placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein-IIb/IIIa blockade. the epistent investigators. evaluation of platelet IIb/IIIa inhibitor for stenting. *Lancet*, 352(9122):87–92, Jul 1998.
- [27] EPILOG. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. the epilog investigators. *N Engl J Med*, 336(24):1689–1696, Jun 1997.
- [28] R. Blindt, AK. Bosserhoff, U. Zeiffer, N. Krott, P. Hanrath, and J. vom Dahl. Abciximab inhibits the migration and invasion potential of human coronary artery smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, 32(12):2195–2206, Dec 2000.
- [29] T. Hinohara, MR. Selmon, GC. Robertson, L. Braden, and JS. Simpson. Directional atherectomy. New approaches for treatment of obstructive coronary and peripheral vascular disease. *Circulation*, 81(3 Suppl):79–91, Mar 1990.
- [30] U. Dietz, HJ. Rupprecht, MA. de Belder, W. Wijns, MA. Quarles van Ufford, HG. Klues, and J. vom Dahl. Angiographic analysis of the angioplasty versus rotational atherectomy for the treatment of diffuse in-stent restenosis trial (ARTIST). *Am J Cardiol*, 90(8):843–847, Oct 2002.
- [31] PW. Radke, P. Hanrath, and J. vom Dahl. [Treatment of stent restenosis using rotational atherectomy: mechanisms and results]. *Z Kardiol*, 90(3):161–169, Mar 2001.
- [32] R. Mehran, G. Dangas, GS. Mintz, R. Waksman, A. Abizaid, LF. Satler, AD. Pichard, KM. Kent, AJ. Lansky, GW. Stone, and MB. Leon. Treatment of in-stent restenosis with excimer laser coronary angioplasty versus rotational atherectomy: comparative mechanisms and results. *Circulation*, 101(21):2484–2489, May 2000.
- [33] L. Mauri, R. Bonan, BH. Weiner, V. Legrand, JP. Bassand, JJ. Popma, P. Niemyski, R. Prpic, KK. Ho, MS. Chauhan, DE. Cutlip, OF. Bertrand, and RE. Kuntz. Cutting balloon angioplasty for the prevention of restenosis: results of the Cutting Balloon Global Randomized Trial. *Am J Cardiol*, 90(10):1079–1083, Nov 2002.
- [34] M. Ferrell, V. Fuster, HK. Gold, and JH. Chesebro. A dilemma for the 1990s. Choosing appropriate experimental animal model for the prevention of restenosis. *Circulation*, 85(4):1630–1631, Apr 1992.
- [35] SP. Karas, MB. Gravanis, EC. Santoian, KA. Robinson, KA. Anderberg, and SB. King. Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: an animal model of restenosis. *J Am Coll Cardiol*, 20(2):467–474, Aug 1992.
- [36] E. Dejana, G. Bazzoni, and MG. Lampugnani. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res*, 252(1):13–19, Oct 1999.
- [37] TJ. Mitchison and LP. Cramer. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, 84(3):371–379, Feb 1996.

- [38] DA. Lauffenburger and AF. Horwitz. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84(3):359–369, Feb 1996.
- [39] CD. Nobes and A. Hall. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*, 144(6):1235–1244, Mar 1999.
- [40] DI. Axel, R. Riessen, A. Athanasiadis, H. Runge, G. Köveker, and KR. Karsch. Growth factor expression of human arterial smooth muscle cells and endothelial cells in a transfilter coculture system. *J Mol Cell Cardiol*, 29(11):2967–2978, Nov 1997.
- [41] KE. Bornfeldt, EW. Raines, T. Nakano, LM. Graves, EG. Krebs, and R. Ross. Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest*, 93(3):1266–1274, Mar 1994.
- [42] J. Thyberg. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during formation of neointimal thickenings following vascular injury. *Histol Histopathol*, 13(3):871–891, Jul 1998.
- [43] GR. Grotendorst, HE. Seppä, HK. Kleinman, and GR. Martin. Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(6):3669–3672, Jun 1981.
- [44] R. Ross and JA. Glomset. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med*, 295(7):369–377, Aug 1976.
- [45] JH. Chamley-Campbell and GR. Campbell. What controls smooth muscle phenotype? *Atherosclerosis*, 40(3-4):347–357, Nov-Dec 1981.
- [46] M. Takeichi. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 7(5):619–627, Oct 1995.
- [47] BM. Gumbiner. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol*, 148(3):399–404, Feb 2000.
- [48] CL. Adams and WJ. Nelson. Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 10(5):572–577, Oct 1998.
- [49] M. Fukata and K. Kaibuchi. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(12):887–897, Dec 2001.
- [50] E. Rosivatz, I. Becker, K. Specht, E. Fricke, B. Luber, R. Busch, H. Höfler, and KF. Becker. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol*, 161(5):1881–1891, Nov 2002.
- [51] EB. Uglow, S. Slater, GB. Sala-Newby, CM. Aguilera-Garcia, GD. Angelini, AC. Newby, and SJ. George. Dismantling of cadherin-mediated cell-cell contacts modulates smooth muscle cell proliferation. *Circ Res*, 92(12):1314–1321, Jun 2003.
- [52] M. Jones, PJ. Sabatini, FS. Lee, MP. Bendeck, and BL. Langille. N-cadherin upregulation and function in response of smooth muscle cells to arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(12):1972–1977, Dec 2002.

- [53] A. Hall. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, 10:31–54, 1994.
- [54] TM. Seasholtz, M. Majumdar, DD. Kaplan, and JH. Brown. Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res*, 84(10):1186–1193, May 1999.
- [55] S. Charrasse, M. Meriane, F. Comunale, A. Blangy, and C. Gauthier-Rouvière. N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. *J Cell Biol*, 158(5):953–965, Sep 2002.
- [56] R. Blindt, N. Krott, P. Hanrath, J. vom Dahl, G. van Eys, and AK. Bosserhoff. Expression patterns of integrins on quiescent and invasive smooth muscle cells and impact on cell locomotion. *J Mol Cell Cardiol*, 34(12):1633–1644, Dec 2002.
- [57] SI. Sukharev, VA. Klenchin, SM. Serov, LV. Chernomordik, and Chizmadzhev YuA. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J*, 63(5):1320–1327, Nov 1992.
- [58] A. Hamm, N. Krott, I. Breibach, R. Blindt, and AK. Bosserhoff. Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng*, 8(2):235–245, Apr 2002.
- [59] T. Takino, M. Nakada, H. Miyamori, J. Yamashita, KM. Yamada, and H. Sato. CrkI adapter protein modulates cell migration and invasion in glioblastoma. *Cancer Res*, 63(9):2335–2337, May 2003.
- [60] J. Asai. *Antibodies in Cell Biology*, volume 37. Academic Press, San Diego (CA), 1993.
- [61] L. Sachs. Angewandte statistik- anwendung statistischer methoden. *Springer*, 1997.
- [62] GM. Bokoch, BP. Bohl, and TH. Chuang. Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins. *J Biol Chem*, 269(50):31674–31679, Dec 1994.
- [63] YV. Bobryshev, RS. Lord, T. Watanabe, and T. Ikezawa. The cell adhesion molecule E-cadherin is widely expressed in human atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res*, 40(1):191–205, Oct 1998.
- [64] S. Nakagawa and M. Takeichi. Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development*, 125(15):2963–2971, Aug 1998.
- [65] SC. Slater, E. Koutsouki, CL. Jackson, RC. Bush, GD. Angelini, AC. Newby, and SJ. George. R-cadherin:beta-catenin complex and its association with vascular smooth muscle cell proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(7):1204–1210, Jul 2004.
- [66] DW. Muller, SG. Ellis, and EJ. Topol. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol*, 19(2):418–432, Feb 1992.
- [67] P. Delannoy, J. Lemonnier, E. Haÿ, D. Modrowski, and PJ. Marie. Protein kinase C-dependent upregulation of N-cadherin expression by phorbol ester in human calvaria osteoblasts. *Exp Cell Res*, 269(1):154–161, Sep 2001.

- [68] CM. Niessen and BM. Gumbiner. Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *J Cell Biol*, 156(2):389–399, Jan 2002.
- [69] SM. Schoenwaelder and K. Burridge. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol*, 11(2):274–286, Apr 1999.
- [70] SA. Wickström, K. Alitalo, and J. Keski-Oja. Endostatin associates with lipid rafts and induces reorganization of the actin cytoskeleton via down-regulation of RhoA activity. *J Biol Chem*, 278(39):37895–37901, Sep 2003.

Abbildungsverzeichnis

1	Aufbau der Arterienwand	8
2	Zonula adherens	17
3	Zyklus der RhoA-Aktivierung	18
4	Aufbau der Boyden-Kammer	25
5	Migrationspotential quieszenter und migratorischer SMCs in der Boyden- kammer	34
6	Differenzielle Protein-Expression im Westernblot	34
7	Migrationspotential und N-Cadherin-Expression migratorischer SMCs nach Transfektion mit niedriger Dosis	36
8	Migrationspotential und N-Cadherin-Expression migratorischer SMCs nach Transfektion mit hoher Dosis	37
9	Migrationspotentiale quieszenter und migratorischer SMCs nach Behand- lung mit inhibitorischem Antikörper	38
10	Differenzielle RhoA-Expression nach Antikörperbehandlung	40
11	Differenzielle RhoA-Expression nach Transfektion	41
12	<i>stress-fiber</i> -Formation in der Immunfluoreszenz	43
13	N-Cadherin-Expression in immunhistochemischen Schnitten	45
14	SMA-Expression in immunhistochemischen Schnitten	46
15	β -Catenin-Expression in immunhistochemischen Schnitten	47
16	Quantifizierung der Protein-Expression in immunhistochemischen Schnitten	48

Abkürzungsverzeichnis

AHA	American Heart Association
AP	Alkalische Phosphatase
ASS	Azetylsalicylsäure
BCA	bicinchoninic acid
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BSA	Bovines Serum Albumin
CNR	cadherin-related neuronal receptor
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ECM	endothelzell-konditioniertes Medium
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
EU	Europäische Union
EZM	extrazelluläre Matrix
FKS	fetales Kälber-Serum
GAP	GTPase-activating proteins
GDF	GDI dissociation factors
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitors
GDP	guanin diphosphate
GEF	guanidine exchange factors
GTP	guanin triphosphate

HEPES	Hydroxyethylpiperazine- N'-2-ethane sulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells, menschliche endotheliale Nabelschnurven- enzellen
IGF	Insuline-like Growth Factor
KHK	koronare Herzkrankheit
MMP	matrix metalloproteinase
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NO	Nitric Oxide, Stickstoff Monoxid
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PMSF	Phenylmethysulphonylfluoride
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
SDS	sodium dodecyl sulfate
SMA	smooth muscle actin
SMC	smooth muscle cell
TGF- β	Transforming Growth Factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
t-PA	tissue-type plasminogen activator, Gewebsplasminogenaktivator
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
u-PA	Urokinaseplasminogenaktivator
vWF	von Willebrand Faktor

Danksagung

Ich danke ganz besonders PD Dr. med. Rüdiger Blindt für die Bereitstellung des interessanten Themas und die umfassende Betreuung auch über die Grenzen von Aachen hinaus.

Für die Arbeit als Doktorvater danke ich Herrn Prof. Dr. Hanrath, sowie seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. Kelm ganz herzlich. Ebenso sei Herrn Prof. Dr. Weber als Gutachter sehr gedankt.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an Nicole Krott für die Hilfe bei der technischen Durchführung und die gute Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ganz herzlich möchte ich mich auch für die Bereitstellung von Materialien und Laborräumen, sowie der technischen Unterstützung bei Corinna Henkel und ihrer Arbeitsgruppe vom Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie bedanken.

Ein besonderer Dank gilt außerdem meinen Eltern, auf deren Unterstützung ich mich immer verlassen kann.

Daniel Stein hat mir nicht nur mit fachlichem und technischem Rat stets zur Seite gestanden, sondern vor allem durch seine Beharrlichkeit und große Geduld zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Julia Stein, geb. Dammers
Bäumchesweg 41A
41239 Mönchengladbach
Geb. am 06.02. 1980 in Duisburg

Schulbildung

08/1986–07/1990 Grundschule in Mönchengladbach-Güdderath
08/1990–05/1999 Gymnasium Am Geroweier in Mönchengladbach
05/1999 Abitur

Studium

10/1999–03/2005 Studium der Humanmedizin an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen (RWTH)
04/2005–03/2006 Praktisches Jahr

- Innere Medizin, Luisenhospital Aachen
- Chirurgie, Hôpital Civil, Strasbourg (Frankreich)
- Anästhesie, Luisenhospital Aachen

05/2006 Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung

Beruf

seit 11/2006 Assistenzärztin der Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie am Klinikum Krefeld