

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**OxLDL induziert über die Regulation der p27<sup>Kip1</sup> Expression  
die Proliferation in HUVEC: Rolle von RhoA**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Katrín Gegenheimer  
aus Karlsruhe

Würzburg, September 2008

**Referent:** Prof. Dr. med. J. Galle  
**Koreferent:** Prof. Dr. med. C. Wanner  
**Mündlicher Prüfer:** Prof. Dr. med. U. Walter  
**Dekan:** Prof. Dr. med. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 4. Februar 2009

**Die Promovendin ist Ärztin**

*Meiner Familie*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	ATHEROSKLEROSE	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie von Atherosklerose	1
1.1.2	Pathomechanismus	1
1.1.3	Oxidativer Streß	4
1.2	PLASMALIPOPROTEINE UND AATHEROSKLEROSE	6
1.2.1	Lipoproteine	6
1.2.2	LDL	6
1.2.3	Oxidierter low-density Lipoproteine (oxLDL)	7
1.2.4	Proatherogene Eigenschaften von oxLDL	7
1.3	ZELLZYKLUS-REGULATION	9
1.3.1	Der Zellzyklus	9
1.3.2	p27 <sup>Kip1</sup>	10
1.3.3	RhoA und Rho-Kinase: Signaltransduktionswege und intrazelluläre Effekte	12
<b>2.</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>14</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>15</b>
3.1	ZELLKULTURMATERIAL	15
3.2	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	15
3.3	GERÄTE UND MATERIALIEN	16
3.4	PLASMIDE	17
3.5	ANTIKÖRPER	18
<b>4.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>19</b>
4.1	HERSTELLUNG VON OXIDIERTEM LDL	19
4.1.1	Gewinnung von nativem LDL	19
4.1.2	Oxidation von LDL	20

4.2	ZELLKULTUR VON HUMANEN NABELSCHNURVENEN ENDOTHELZELLEN (HUVEC)	20
4.2.1	Kultivieren von HUVEC	20
4.2.2	Passagieren von Zellen	20
4.3	KONSTRUKTION DES RHOA-N19 VEKTORS	21
4.4	TRANSFEKTION	22
4.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen in einer Maxipräparation	22
4.4.2	Tranfektion von Plasmid-DNA	23
4.5	NICHT RADIOAKTIVER MTT PROLIFERATIONSASSAY	24
4.5.1	Theoretische Grundlagen	24
4.5.2	Durchführung	24
4.6	PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY ET AL. 1951	25
4.7	WESTERN-BLOT	25
4.7.1	Aufbereitung der Proben	25
4.7.2	Durchführung	26
4.8	NACHWEIS VON p27 <sup>KIP1</sup> EXPRESSION IN HUVEC	27
4.9	IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DER RHOA-AKTIVITÄT	27
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>
5.1	WIRKUNG VON oxLDL AUF DIE RHOA-AKTIVITÄT IN HUVEC	29
5.2	KONSTRUKTION DES RHOA N19-VEKTORS	31
5.3	NACHWEIS DER ÜBEREXPRESSION VON RHOA N19	31
5.4	AUSWIRKUNGEN DER RHOA HEMMUNG AUF DIE oxLDL INDUZIERTE p27 <sup>KIP1</sup> EXPRESSION	32
5.5	AUSWIRKUNGEN DER RHOA HEMMUNG AUF DIE oxLDL INDUZIERTE PROLIFERATION VON HUVEC	34
5.6	AUSWIRKUNGEN DER RHO KINASE HEMMUNG AUF DIE oxLDL INDUZIERTE PROLIFERATION VON HUVEC	36
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>38</b>
6.1	oxLDL INDUZIERT RHOA-AKTIVITÄT	38
6.2	RHOA HEMMUNG VERHINDERT EINE oxLDL INDUZIERTE p27 <sup>KIP1</sup> SUPPRESSION	40

6.3	RHOA HEMMUNG VERHINDERT DIE oxLDL INDUZIERT PROLIFERATION VON HUVEC	42
6.4	RHO-KINASE HEMMUNG INHIBIERT NICHT VOLLSTÄNDIG DIE oxLDL INDUZIERT PROLIFERATION IN HUVEC	44
6.5	THERAPEUTISCHE ANSÄTZE	45
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>51</b>
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	51
8.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	53
<b>9.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>54</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Atherosklerose

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie von Atherosklerose

Die Welt-Gesundheits-Organisation WHO definiert den Begriff Atherosklerose als „variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus herdförmiger Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Calciumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia (WHO 1958)

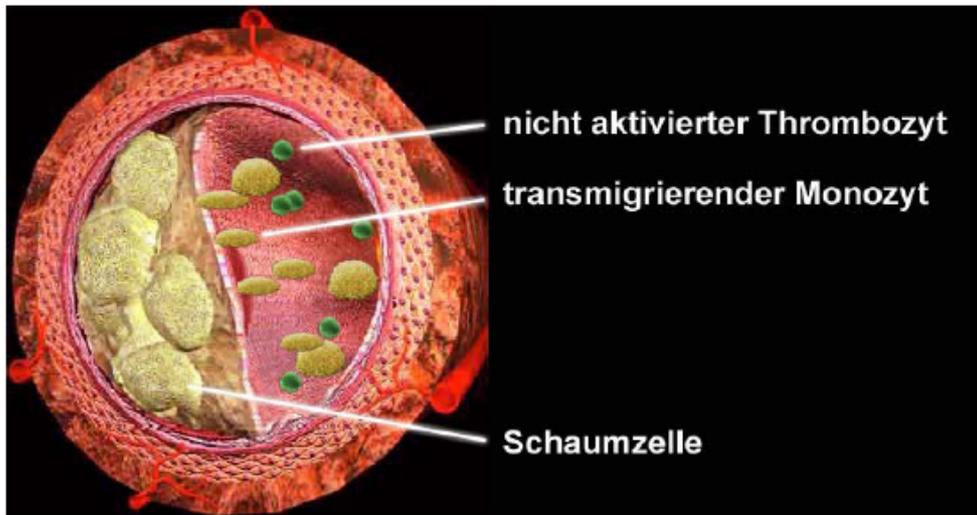
Die Folgen der Atherosklerose wie Koronare Herzkrankheit, akuter Herzinfarkt, Schlaganfall und periphere arterielle Verschlusskrankheit sind verantwortlich für 50% der Todesfälle in Europa, USA und Japan (Ross 1993). Allein in Deutschland verstarben 2004 laut dem statistischen Bundesamt 146.000 Menschen an den Folgen einer KHK, somit stellt sie die Haupttodesursache dar.

Die Kenntnis über die Atherogenese hat sich in den letzten Jahrzehnten grundlegend gewandelt. Während man früher annahm, dass der atherosklerotische Prozeß hauptsächlich in der Ablagerung von Lipiden in der Gefäßwand besteht, weiss man heute, vor allem aufgrund von Forschungsdaten der vaskulären Biologie, dass dieser Vorgang wesentlich komplexer ist. Atherosklerose muß als aktiver Prozeß betrachtet werden und ist grundlegend durch eine inflammatorische Reaktion in der Gefäßwand charakterisiert (Libby 2002).

### 1.1.2 Pathomechanismus

Die frühe Phase der Atherogenese, makroskopisch noch nicht identifizierbar, ist gekennzeichnet durch die sogenannte endotheliale Dysfunktion. Nach vorherrschender Meinung beginnt dieser Prozeß aufgrund einer gesteigerten Permeabilität des Endothels für Lipoproteine, die zu einer Lipidakkumulation in der Intima führt. In der Folge wird das Gefäßendothel aktiviert und exprimiert vermehrt spezifische Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche, im Wesentlichen ausgelöst durch oxidativ modifizierte LDL-Partikel, die eine stark proinflammatorische Wirkung entwickeln (Nakashima, Raines et

al. 1998). Im Blut zirkulierende Monozyten und T-Lymphozyten heften sich an diese Adhäsionsmoleküle und wandern unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren und Chemokinen in den subendothelialen Raum ein. Dort kommt es zur Differenzierung in Makrophagen und durch Lipidakkumulation über sogenannte Scavenger Rezeptoren entstehen Schaumzellen, die charakteristischen Zellen der atherosklerotischen Plaque.



**Abb.1:** Transmigrierende Monozyten haben als Makrophagen modifizierte Lipoproteine aufgenommen und sich zu Schaumzellen entwickelt [stark modifiziert nach der Homepage „The Internet Stroke Center (<http://www.strokecenter.org>)].

Im Rahmen dieses Differenzierungsprozesses setzen die lipidbeladenen Makrophagen und die T-Lymphozyten vermehrt Wachstumsfaktoren wie Platelet-derived-growth-factor (PDGF), Interleukin-1 (IL-1), Tumor-nekrosis-factor-alpha (TNF $\alpha$ ) und andere Mediatoren frei. Diese inflammatorische „Umgebung“ aktiviert die glatten Muskelzellen zur Immigration in die intimale Läsion sowie zur Proliferation, wodurch sogenannte „fatty streaks“ entstehen, die ersten makroskopisch sichtbaren atherosklerotischen Gefäßveränderungen. Die Progression dieser Frühläsionen ist hauptsächlich auf die anhaltenden inflammatorischen Stimuli zurückzuführen. Die eingewanderten glatten Muskelzellen wechseln von einem kontraktilen in einen sezernierenden Phänotyp und sind über die Bildung extrazellulärer Matrix hauptverantwortlich für die dort stattfindenden fibrotischen Veränderungen bzw. die Entstehung einer fibrösen Plaque (fibrous plaque). Deren Merkmal ist ein gesteigerter

zellulärer Umsatz bei gleichzeitigem Vorkommen von Proliferation und Zelltod vaskulärer Zellen (Kockx, De Meyer et al. 1998; Dzau, Braun-Dullaeus et al. 2002). Zusätzlich unterhalten die glatten Muskelzellen durch Freisetzung von Mediatoren die bestehende Entzündungsreaktion.

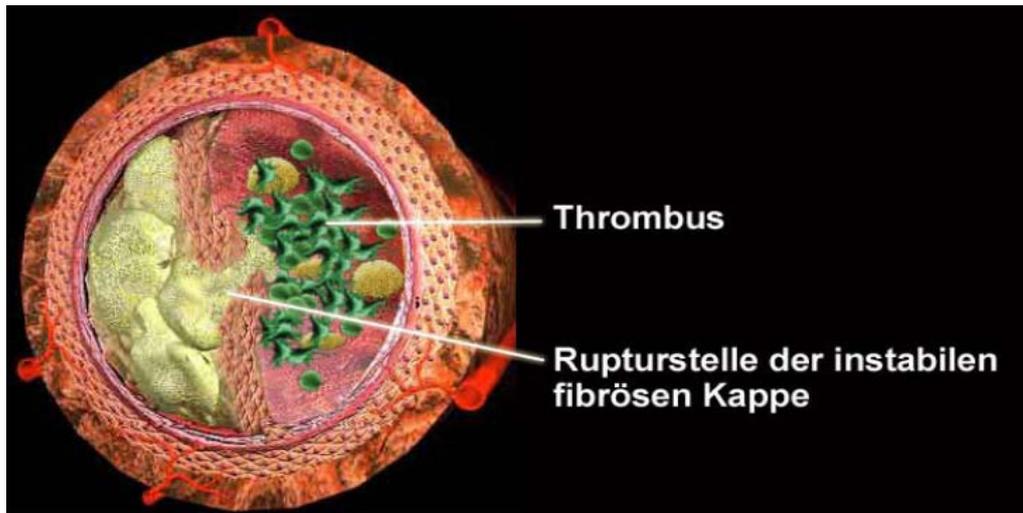
Das fortgeschrittene Stadium zeichnet sich durch die Ausbildung einer stabilen atherosklerotischen Plaque, auch als Atherom bezeichnet, aus. Weitere Lipidaufnahme, Akkumulation und Apoptose von Schaumzellen und T-Lymphozyten führen zur Bildung eines nekrotischen Kerns in der wachsenden Läsion. Dieser wird von einer fibrösen Lage begrenzt, die aus proliferierenden Muskelzellen, kollagenfaserreichem Bindegewebe und extrazellulärer Matrix besteht (Ross 1993). Am Ende dieser Prozesse steht die klinisch relevante Stenose oder die akute Plaqueruptur mit nachfolgender Thrombosierung und akutem Gefäßverschuß. Drei unterschiedliche Mechanismen können zu einer Ruptur oder Thrombusbildung führen.

Aufgrund eines oberflächlichen Endotheldefekts werden subendotheliales Kollagen und von- Willebrand-Faktor freigelegt, welche Thrombozytenadhäsion und -aktivierung begünstigen.

Des Weiteren können Gefäßneubildungen der atherosklerotischen Plaque Mikroblutungen verursachen. Das dadurch gebildete Thrombin stimuliert einerseits die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen andererseits die Aktivierung von Thrombozyten. Dies führt zu einer raschen Progression der bestehenden Läsion.

Der dritte und wohl auch häufigste Mechanismus einer Plaqueruptur geht einher mit dem Einreißen der fibrösen Kappe. Durch proinflammatorische Mediatoren wie Interferon- $\alpha$  oder Matrix-degradierende Enzyme, die von Schaumzellen und T-Lymphozyten sezerniert werden können, kommt es zum Abbau der extrazellulären Matrix und somit zur Plaqueinstabilität und Möglichkeit der Plaqueruptur. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade führt zur okkludierenden oder nicht okkludierenden Thrombusbildung. Maßgeblich beteiligt an der Aktivierung ist der Tissue factor (TF), der von Makrophagen und Schaumzellen exprimiert wird. Diese Form der Plaqueruptur verursacht etwa 75% der akuten Herzinfarkte (Libby 2002).

Zahlreiche Mechanismen können den Prozeß der Atherosklerose einleiten. Einer der wichtigsten Initiatoren ist oxidativer Streß, der in den letzten Jahren zunehmend in das wissenschaftliche Interesse gerückt ist und im Anschluß näher aufgezeigt wird.



**Abb.2:** Verminderte Matrixsynthese der Muskelzellen und proteolytische Aktivität der Makrophagen können zu einer Ruptur der Kappe führen. An der Rupturstelle bildet sich ein Thrombus [stark modifiziert nach der Homepage „The Internet Stroke Center (<http://www.strokecenter.org>)].

### 1.1.3 Oxidativer Streß

Im ausbalancierten Zellstoffwechsel befinden sich Radikalbildung und Radikalentgiftung im Gleichgewicht. Oxidativer Streß bezeichnet das zeitweilige „Überwiegen“ von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), durch deren zunehmende Generierung oder durch verringerte antioxidative Kapazität. Zu der Gruppe der ROS zählen Superoxidanionen ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxylradikale (OH). Im physiologischen Stoffwechsel fungieren sie als second messenger, stellen chemotaktische Faktoren bei entzündlichen Prozessen dar und sind Teil des unspezifischen Abwehrsystems des Körpers gegen Bakterien.

Superoxidanionen, werden im Endothel und in glatten Muskelzellen hauptsächlich durch die NADH/NADPH-Oxidase gebildet, es existieren jedoch auch eine Reihe anderer Enzymsysteme, die ROS generieren können. Dies sind u.a. Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, Xanthin-Oxidasen, NO-Synthasen, Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen (Mohazzab, Kaminski et al. 1997). Außerdem gibt es zahlreiche

Stimuli, insbesondere Katecholamine, Angiotensin II, Thrombin, PDGF, TNF $\alpha$ , CRP oder modifizierte LDL, die zu einer gesteigerten ROS Bildung führen können (Griendling and FitzGerald 2003). Erhöhte Konzentrationen an Sauerstoffradikalen üben einen schädigenden Einfluß auf die Zellen aus und induzieren wiederum eine Steigerung der Endotheldysfunktion.

Superoxid verringert die Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) durch Reaktion zum zytotoxischen Peroxynitrit (Pryor and Squadrito 1995) und führt nicht nur zu einer abgeschwächten Endothel - abhängigen Vasodilatation, sondern verhindert auch, daß dieses seine anti-atherosklerotische Wirkung entfalten kann. Weiterhin verursacht O<sub>2</sub><sup>-</sup> eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, die zur Anlagerung von Monozyten als auch von T-Lymphozyten führen. ROS können durch Oxidationsprozesse zur chemischen Veränderung von Biomolekülen wie z.B. der Peroxidation von Membranproteinen oder der oxidativen Schädigung von Kohlenhydraten und Nukleinsäuren führen (Sies 1991). Diese hierbei entstehenden Zellschäden können so weitreichend sein, daß es zum Zelluntergang kommen kann. Neben einer gesteigerten Oxidation der Lipoproteine im subendothelialen Raum sind die Sauerstoffradikale in der Lage Proteasen, Nukleasen und Proteinkinasen zu aktivieren und dadurch in zelluläre Signalwege einzugreifen (Halliwell 1993). Oxidativer Streß beeinflusst darüber hinaus den Zellzyklus. Unter unterschiedlichen Bedingungen können gegensätzliche Effekte, einerseits Zellwachstum wie Proliferation oder Hypertrophie und andererseits Zelltod im Sinne von Apoptose oder Nekrose beobachtet werden (Shackelford, Kaufmann et al. 2000).

Diese unterschiedlichen Reaktionswege zeigen, daß eine erhöhte ROS Produktion unter pathophysiologischen Bedingungen, wesentlich an der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt sein kann (Madamanchi, Vendrov et al. 2005).

## 1.2 Plasmalipoproteine und Atherosklerose

### 1.2.1 Lipoproteine

Heute ist eine Vielzahl endogener und exogener Risikofaktoren für Atherosklerose bekannt. Neben den unbeeinflussbaren Risikofaktoren wie familiäre Disposition, Lebensalter und männliches Geschlecht wird die Entstehung der Atherosklerose von beeinflussbaren Risikofaktoren mitbestimmt. Die wichtigsten sind Hyperlipoproteinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus. Zahlreiche klinische, epidemiologische und experimentelle Studien belegen, dass vor allem ein erhöhter Plasma LDL (low density lipoprotein) Spiegel einen entscheidenden Risikofaktor für die Atherogenese darstellt (Steinberg, Parthasarathy et al. 1989).

Lipoproteine werden nach ihrer Dichte in Chylomikronen, very-low-density-lipoprotein (VLDL), low-density-lipoprotein (LDL), intermediate-density-lipoprotein (IDL) und high-density-lipoprotein (HDL) eingeteilt.

Die Funktion dieser Stoffgruppe besteht im Transport von Triglyceriden und Cholesterin durch das Plasmakompartiment zu ihren verschiedenen Bestimmungsorten. Sie sind strukturell kugelförmige Lipid-Protein-Komplexe mit einem lipophilen Kern aus Triglyceriden und Cholesterinestern und einer hydrophilen Schale aus Phospholipiden und freiem Cholesterin. Als weitere Komponente der Lipoproteinoberfläche enthalten sie spezielle Proteine sogenannte Apoproteine, die maßgeblich die funktionelle Eigenschaft der Lipoproteine bestimmen.

### 1.2.2 LDL

Ein Teil des VLDL-Pools wird über die Zwischenstufe der Bildung von IDL in Lipoproteine geringer Dichte umgewandelt. Die 22 nm großen und circa drei Millionen Dalton schweren LDL bestehen zu 45 % aus Cholesterin und enthalten von allen Plasmalipoproteinen die größte Menge an Cholesterin sowie Cholesterinestern. Physiologische Funktion der LDL ist die Versorgung von Zellen mit Cholesterin z.B. zur Synthese von Zellmembranen oder zellspezifischen Produkten wie Steroiden oder Gallensäuren. In die Hülle der LDL-Partikel ist ein einzelnes Proteinmolekül, Apo B-100, eingelagert, daß die Bindung an spezifische Rezeptoren zur rezeptorvermittelten Endozytose vermittelt.

Etwa 70% des Gesamtcholesterins im Serum sind auf LDL verteilt. Nachdem lange Zeit vor allem erhöhte Cholesterinwerte eine zentrale Rolle bei der Ursachenforschung der Atherosklerose beigemessen wurde, rückte in den letzten Jahren die LDL-Oxidations-Hypothese zunehmend in den Mittelpunkt (Steinberg, Parthasarathy et al. 1989). Das durch Oxidation modifizierte LDL wurde vermehrt in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen und wird heute als Schlüsselmolekül im Pathomechanismus der Atherosklerose angesehen (Yla-Herttuala, Palinski et al. 1989).

### 1.2.3 Oxidierter low-density Lipoproteine (oxLDL)

Da das Plasma über effektive antioxidative Schutzmechanismen verfügt, findet die Oxidation hauptsächlich im subendothelialen Raum statt. Die Umwandlung von LDL zu oxidiertem LDL kann durch unterschiedliche Enzyme wie Myeloperoxidase (Daugherty, Dunn et al. 1994), Lipoxygenasen (Belkner, Stender et al. 1997) und Cyclooxygenasen bewirkt werden, ebenso durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) insbesondere Superoxidanionen, reaktive Stickstoffverbindungen (RNS) wie Peroxynitrit (Darley-Usmar, Hogg et al. 1992) und Metallionen wie Kupfer und Eisen. Bei der Oxidation kommt es zum Verlust von Lysinresten im Apolipoprotein- B100 (Steinbrecher 1987). Außerdem entstehen durch Lipidperoxidation Carbonylgruppen, die mit den Aminogruppen der Lysinreste zu Schiff'schen Base reagieren (Zhang, Yang et al. 1993). Diese Konjugate erhöhen die negative Gesamtladung von oxLDL und somit deren zelluläre Aufnahme über Scavenger Rezeptoren von Monozyten und Makrophagen.

Diese modifizierten LDL liegen in vivo in unterschiedlichen Oxidationsgraden vor und sind an einer Reihe von Mechanismen beteiligt, die in der Atherogenese eine entscheidende Rolle spielen.

### 1.2.4 Proatherogene Eigenschaften von oxLDL

Oxidiertes LDL wirkt chemotaktisch und aktivierend auf Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten (Rajavashisth, Andalibi et al. 1990). Es verstärkt ihre Adhäsion an Endothelzellen, durch eine vermehrte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 und VCAM-1. Dadurch wandern Monozyten verstärkt in die Gefäßwand ein. Außerdem fördert oxLDL die Differenzierung von

Monozyten in Makrophagen und die Expression von Scavenger-Rezeptoren. Über diese Rezeptoren kann oxLDL aufgenommen werden, intrazellulär akkumulieren und dadurch intrazellulär die Umwandlung dieser Zellen in Schaumzellen bewirken (Witztum 1991). Zudem stimuliert oxidativ modifiziertes LDL die Freisetzung von Chemokinen wie Monozyte- Colony Stimulating Factor (M-CSF) und Monozyte Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) und fördert die Proliferation glatter Muskelzellen, was zu einer Intimaverdickung („intimal thickening“) führt und zu einer Einengung des Gefäßlumens beiträgt (Auge, Fitoussi et al. 1996). Sie beeinflussen die endothelabhängige Vasodilatation über Stickstoffmonoxid (NO), durch Hemmung der NO-Synthese, als auch durch direkte Inaktivierung von NO selbst (Galle and Bassenge 1991; Fogliatto, Musanti et al. 1995).

Einen mittlerweile bekannten Signaltransduktionsweg für die Wirkung von oxLDL stellen  $O_2^-$ -Radikale dar. Sauerstoffradikalbildung mittels Inkubation mit oxLDL konnte in verschiedenen Zellsystemen, unter anderem in Endothelzellen nachgewiesen werden. Nicht nur oxLDL selbst, sondern auch die bei der Oxidation entstehenden Nebenprodukte, insbesondere Lysophosphatidylcholin (LPC) (Yokoyama, Hirata et al. 1990), führen zu einer  $O_2^-$ -Freisetzung im Wesentlichen über die NAD(P)H-Oxidase. Dieser oxidative Streß beeinflusst unter anderem auch den Zellzyklus verschiedener Zellsysteme.

So konnte in kultivierten Endothelzellen bei niedrigen oxLDL Konzentrationen Proliferation nachgewiesen werden. In höheren Konzentrationen bewirkte oxLDL Apoptose und Nekrose. Dieser duale Effekt ist demnach abhängig von der oxLDL Konzentration und dessen Expositionszeit (Galle, Heinloth et al. 2001). Dabei sind die genauen Signaltransduktionswege bei diesen Vorgängen noch nicht aufgeklärt. Eine wichtige Rolle scheint der im Zellzyklus wichtige Zyklinkinaseinhibitor p27<sup>kip1</sup> zu spielen. OxLDL ist in der Lage den Zellzyklus über eine Expressionsverminderung oder –Erhöhung von p27 zu regulieren (Seibold, Schurle et al. 2004). Diese Zellzyklusmechanismen sollen im folgenden näher dargestellt werden.

## 1.3 Zellzyklus-Regulation

### 1.3.1 Der Zellzyklus

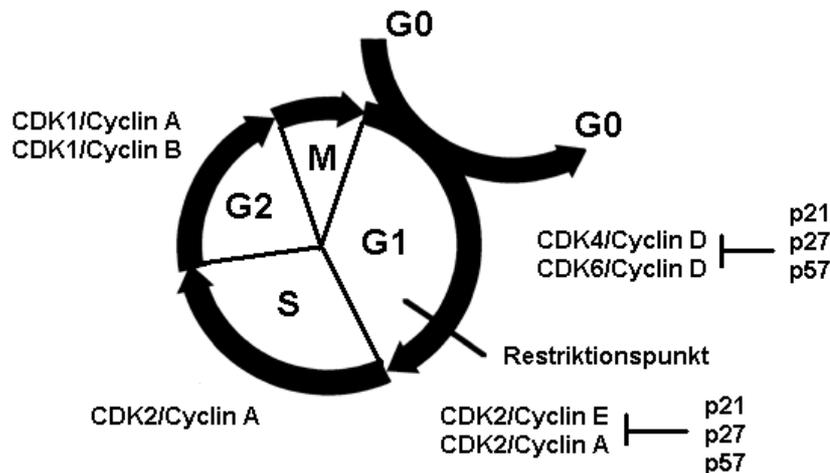
Zellwachstum entsteht durch Progression der Zelle durch den Zellzyklus, der sich aus vier definierten, voneinander abgrenzbaren Phasen zusammensetzt: G1-, S-, G2-, und M-Phase. Die geordnete und korrekte Transition von einer Phase in die nächste wird von der Zelle über mehrere Kontrollpunkte sogenannte „checkpoints“ kontrolliert (Elledge 1996).

Ruhende (G0) Zellen treten in die erste „gap“-Phase (G1) ein, in der die Zellzyklusproteinsynthese und –aktivierung beginnt. In der späten G1-Phase erreichen die Zellen den sogenannten Restriktionspunkt (R), nachdem sie nicht mehr auf exogene Stimuli z.B. Wachstumsfaktoren reagieren, sondern den Zellzyklus unter dem Einfluß von spezifischen Zellzyklusproteinen vollenden. Die Replikation der DNA erfolgt in der nachfolgenden Synthese- oder S-Phase. Nach erfolgreicher DNA-Synthese und weiterer Progression durch die G2-Phase, gelangt die Zelle in die Mitose (M-Phase), in der es am Ende zur Zellteilung kommt.

Diese Zellzyklusphasen werden koordiniert durch Expression und/oder Aktivierung spezifischer Kinasen, den „cyclin-dependent“Kinasen (CDK), welche Holoenzyme mit ihren regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen bilden (Morgan 1995). Die intrazellulären Konzentrationen vieler Cycline unterliegen im Verlauf des Zellzyklus dramatischen Schwankungen, außerdem zeichnen sie sich durch eine sehr kurze Halbwertszeit (<30-60 min) aus und tragen dadurch wesentlich zur phasenspezifischen Aktivierung und Deaktivierung der CDKs bei (Pardee 1989). D-Cycline werden in der G1-Phase exprimiert, Cyclin E am G1-S Übergang, Cyclin A während der Synthese-Phase und am Übergang der G2-Phase und Cyclin B in der Mitose.

Proliferation ist demnach gekennzeichnet durch Transition der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase, während Hypertrophie durch einen G1-Arrest charakterisiert ist. Bei einer hypertrophierenden Zelle findet man eine gesteigerte Protein-, und RNA-Produktion, jedoch keine DNA-Replikation. Apoptose (programmierter Zelltod) wird hauptsächlich in der G1-Phase eingeleitet. Ein gleichzeitiges Vorkommen dieser Zellzyklusmechanismen ist charakteristisch für atherosklerotische Plaques.

An der Regulation der CDK-Aktivität sind multiple Mechanismen beteiligt, wobei die CDK-Inhibitoren eine entscheidende Rolle spielen. Diese werden in zwei Familien unterteilt: die Ink4-Familie sowie die CIP/Kip-Familie.



**Abb.3:** Überblick über die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Ruhende (G0) Zellen treten in die G1-Phase ein, in der sie auf die DNA-Synthese vorbereitet werden. Nachdem sie den Restriktionspunkt in der späten G1-Phase erreicht haben, treten sie unvermeidlich in die S-Phase ein, in der die DNA Replikation stattfindet. Nach weiterer Progression durch die G2-Phase, schließt sich die Mitose (M-Phase) an, in der es am Ende zur Zellteilung kommt. Die den Zellzyklus regulierende Proteine sind den einzelnen Phasen zugeordnet. CDK: cyklin-abhängige Kinasen, CDK-Inhibitoren: p21, p27, p57

### 1.3.2 $p27^{Kip1}$

Das 27-kDa Protein  $p27^{Kip1}$  gehört neben  $p21^{Cip1}$  und  $p57^{Kip2}$  der Cip/Kip-Familie an, deren Mitglieder ein breites Spektrum von Cyclin/CDK-Komplexen binden und dadurch inhibieren können.  $p27^{Kip1}$  reguliert den Vorgang der G1-Progression sowie den Eintritt der Zelle in die S-Phase und bindet bzw. inhibiert hauptsächlich den CyclinE/CDK2-Komplex. Somit ist  $p27^{Kip1}$  ein wichtiger Regulator für Zellwachstum, Proliferation und Zelltod.

Die p27<sup>Kip1</sup>-Konzentration ist maximal in G0-Zellen, fällt ab sobald die Zelle in den Zellzyklus eintritt und ist am niedrigsten während der Synthese-Phase. Eine Überexpression von p27<sup>Kip1</sup> in Zellen hat ihre Arretierung in der G1-Phase zur Folge (Toyoshima and Hunter 1994).

Die intrazelluläre Menge an p27<sup>Kip1</sup> kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. p27<sup>Kip1</sup> wird durch eine breite Palette antiproliferativer Signale in verschiedenen Zelltypen induziert (Hengst and Reed 1998). So akkumuliert p27<sup>Kip1</sup> z.B. in Zellen, die nach Entzug von Wachstumsfaktoren, durch Kontaktinhibition oder nach dem Entzug der Substratverankerung den Zellzyklus verlassen. Ebenso wird die Expression durch posttranskriptionelle Mechanismen, insbesondere Veränderungen der Proteintranslation und des Proteinabbaus über den ubiquitinabhängigen proteolytischen Signalweg reguliert.

Nicht nur Proliferation sondern auch Apoptose wird von p27<sup>Kip1</sup> beeinflusst. So konnte gezeigt werden, daß p27<sup>Kip1</sup> eine gewisse antiapoptotische Wirkung besitzt. Vor allem unter Streßbedingungen, beispielsweise fehlenden Wachstumsfaktoren, kam es bei Mesangialzellen und Fibroblasten mit fehlendem oder reduziertem p27<sup>Kip1</sup> zu einer gesteigerten Apoptoserate (Hiromura, Pippin et al. 1999). Die Abwesenheit von p27<sup>Kip1</sup> assoziierte man mit einer gesteigerten Aktivität von CyclinA/CDK2 und identifizierte CDK2 als apoptoseinduzierenden Faktor.

Die Interaktion von p27<sup>Kip1</sup> mit Cyclin/CDK-Komplexen ist weit aus komplizierter als man früher angenommen hatte. p27<sup>Kip1</sup> kann sowohl ein Inhibitor als auch ein Substrat des CyclinE/CDK2-Komplexes sein. Während der G0-Phase inhibiert p27<sup>Kip1</sup> diesen Komplex. Kommt es zu einer Aktivierung von CyclinD/CDK4 durch Wachstumsfaktoren, bindet p27<sup>Kip1</sup> vorzugsweise an diese Komplexe. Daraus resultiert die Aktivierung von CyclinE/CDK2, mit anschließender Phosphorylierung von p27<sup>Kip1</sup>, was wiederum dessen Abbau verstärkt (Sheaff, Groudine et al. 1997) und die G1-Progression begünstigt.

Als weiteren Regulator der p27<sup>Kip1</sup> Expression wurde RhoA identifiziert (Seasholtz, Zhang et al. 2001). RhoA-Aktivierung führt zu Expressionsverminderung von p27<sup>Kip1</sup> und begünstigt dadurch den Eintritt der Zelle in die S-Phase und somit auch die Zellproliferation. Da RhoA eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation,

insbesondere die Zellproliferation betreffend, spielt, wird anschließend der RhoA-Signalweg näher aufgezeigt.

### 1.3.3 RhoA und Rho-Kinase: Signaltransduktionswege und intrazelluläre Effekte

RhoA gehört der Familie der Rho-GTPasen an, die eine Untergruppe der Ras Superfamilie von kleinen GTP-bindenden Proteinen bildet (Takai, Sasaki et al. 2001). Bisher sind 19 verschiedene Proteine der Rho-Familie beschrieben worden, die aufgrund ihrer Primärsequenzhomologie in 5 Gruppen unterteilt werden können: Rho-Gruppe (RhoA, B, C), Rac-Gruppe (Rac1,1b, 2, 3, RhoG), Cdc42-Gruppe (Cdc42Hs, Rif, TLC, Wrch-1, Chp), RhoD-Gruppe (RhoD, TC10), Rnd-Gruppe (Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/RhoE/MemB, Rho8/RhoH/TTF) (Bishop and Hall 2000; Ellis and Mellor 2000; Vignal, De Toledo et al. 2000). Die bekanntesten und am besten charakterisierten Familienmitglieder sind Rac, Cdc42 und RhoA.

Als zentrale Schaltmoleküle beeinflussen Rho-Proteine ein breites Spektrum wichtiger Zell- und Gewebefunktionen, wie beispielsweise die Regulation und Organisation des Aktinzytoskeletts, welches von großer Bedeutung für Zellmotilität, Phagozytose, Zytokinese und den intrazellulären Transport ist. Außerdem sind sie beteiligt an der Regulation von Gentranskription, Zelladhäsion und Zellzyklusprogression (Kjoller and Hall 1999).

Rho-Proteine sind Guanin-Nukleotid bindende Proteine, die zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem GDP-gebundenem, inaktivem Zustand wechseln (Takai, Sasaki et al. 2001). Aktivität führt zu einer Konformationsänderung der GTPasen, die die Bindung an spezifische Zielproteine, sogenannte Effektoren erlaubt. Der Austausch von GDP zu GTP wird von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) katalysiert. Auf der anderen Seite führen sogenannte GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) durch erhöhte Aktivität der intrinsischen GTPase zur Inhibition der Rho-Proteine (Geyer and Wittinghofer 1997). Die unterschiedliche Expression dieser Regulatoren in einzelnen Zelltypen, und die Beobachtung, daß die kleinen Proteine selbst wiederum reguliert werden, verdeutlicht die enge und äußerst komplexe Steuerung der Rho-GTPasen.

RhoA kann von Phospholipiden, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Thrombin, PDGF und Endothelin-1 aktiviert werden. Die Aktivierung von RhoA zeichnet sich durch eine Translokation vom Zytosol in die Plasmamembran aus.

Um die 30 möglichen Effektorproteine, die mit Rho-GTPasen interagieren, sind bisher identifiziert worden, es ist jedoch noch unklar welche für diverse zelluläre Funktionen verantwortlich sind (Bishop and Hall 2000).

Mitte der Neunziger Jahre wurde ein RhoA nachgeschaltetes Effektorprotein, die Rho-kinase, auch als ROCK2 bezeichnet, identifiziert (Ishizaki, Maekawa et al. 1996). ROCK1 ist eine Isoform von ROCK2, wobei beide Formen eine große Homologie zueinander aufweisen und es bisher keine Hinweise für unterschiedliche Funktionen gibt. Rho-Kinase ist eine Serin/Threonin-Kinase und spielt eine bedeutende Rolle bei der Kontraktion glatter Muskelzellen und Endothelzellen. Die Aktin-Myosin-Kreuzbrückenbindung wird durch die Phosphorylierung von Myosinleichtketten (MLC)-proteinen verstärkt und beschleunigt (Kureishi, Kobayashi et al. 1997). Rho-kinase reguliert diesen Vorgang in dualer Weise. Zum einen kann sie MLC direkt phosphorylieren, und zum anderen hemmt Rho-Kinase die Myosin-Leichten-Ketten-Phosphatase (MLCP) und bewirkt damit eine Dissoziation der Phosphatase vom Myosin (Velasco, Armstrong et al. 2002). Veränderungen der Rho-Kinase-Expression oder Aktivität können Ursache abnormer glatter Muskelzellkontraktionen sein und pathophysiologisch bei der Entstehung des Bluthochdrucks involviert sein (Mukai, Shimokawa et al. 2001). Weiterhin führt die induzierte Quervernetzung des Myosins mit F-Aktin durch Bündelung von F-Aktin zur Bildung sogenannter Streßfasern sowie fokaler Adhäsion. Die aktivierte Rho-Kinase stabilisiert diese Streßfasern indem sie LIM-Kinase (LIMK) durch Phosphorylierung aktiviert, die ihrerseits das aktindepolymerisierende Protein Cofilin inaktiviert (Maekawa, Ishizaki et al. 1999). Diese Streßfaserbildung fördert sowohl die Zellmigration als auch intrazelluläre Transportvorgänge beispielsweise von Transkriptionsfaktoren. Gesteigerte Transportvorgänge können somit auch Ursache einer verstärkten Proliferation sein. Daneben ist ROCK an der Entstehung endothelialer Dysfunktion beteiligt, durch verminderte Expression der NO-Synthase, als auch durch Hemmung der NO-Bildung (Laufs and Liao 1998).

Um in diese Signalkaskade einzugreifen und sie dadurch auch zu ergründen, können verschiedene Inhibitoren eingesetzt werden. Ein wichtiger Vertreter ist der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 (Uehata, Ishizaki et al. 1997). Er bindet in der ATP-Bindungstasche der Rho-Kinase und hemmt das Enzym kompetitiv.

## 2. Problemstellung

Atherosklerose ist gekennzeichnet durch einen gesteigerten Zellumsatz bei gleichzeitigem Vorkommen von Zellproliferation und Apoptose. Oxidativ verändertes LDL spielt durch Beeinflussung der Zellzyklusregulation in der Atherogenese eine entscheidende Rolle. Voruntersuchungen zeigten einerseits, daß oxLDL in niedrigen Konzentrationen eine Proliferation von Endothelzellen bewirken kann. Andererseits wurde in Vorarbeiten RhoA als wichtiger Regulator der Zellproliferation, vermittelt über eine p27<sup>Kip1</sup> Suppression identifiziert (Seasholtz, Zhang et al. 2001).

Offen war nun die Frage ob oxLDL den Zellzyklus über den RhoA/RhoKinase Signalweg und über den CDK-Inhibitor p27<sup>Kip1</sup> beeinflusst. Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass oxLDL über eine Aktivierung von RhoA die Expression von p27<sup>Kip1</sup> reguliert und dadurch die Zellproliferation stimuliert. Mit folgenden Versuchen wurde die Hypothese überprüft:

- a. Wirkung von oxLDL auf die RhoA Aktivität in HUVEC. Durch eine immunhistochemische Untersuchung mittels spezifischen RhoA-Antikörpern wurde die Aktivierung von RhoA in HUVEC nach oxLDL Stimulation mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops dargestellt.
- b. Auswirkung der RhoA Hemmung auf die OxLDL induzierte p27<sup>Kip1</sup> Expression. Dazu wurden Zellen mit einer dominant-negativen RhoA N19 Mutante transfiziert und anschließend mit oxLDL inkubiert. Die daraus resultierende Beeinflussung der p27<sup>Kip1</sup> Expression wurde mittels Westernblotanalysen dargestellt.
- c. Auswirkung der RhoA Hemmung auf die oxLDL induzierte Proliferation. Dazu wurden HUVEC mit der dominant-negativen RhoA N19 Mutante transfiziert, und anschließend die Zellproliferation nach oxLDL Stimulation mittels nicht radioaktiven MTT-Proliferationsassays analysiert.
- d. Auswirkung der RhoKinase Hemmung auf die OxLDL induzierte Proliferation. Dazu wurden HUVEC in Gegenwart des Rho-Kinase Inhibitors Y27632 mit oxLDL inkubiert und anschließend die Zellproliferation mittels nicht radioaktiven MTT Proliferationsassays untersucht.

### 3. Material

#### 3.1 Zellkulturmaterial

Amphotericin B	Sigma, München, Deutschland
Bovine brain extract	Clonetics, Walkersville, USA
Endothelial basal medium (EBM)	Clonetics, Walkersville, USA
Epidermal growth factor (EGF)	Life Technology, Gaithersburg, MD, USA
Fötales Rinderserum (FBS)	Life Technology, Gaithersburg, MD, USA
Gentamycin	Sigma, München, Deutschland
HUVEC	Clonetics, Walkersville, USA
Hydrocortison	Sigma, München, Deutschland
Phosphatpuffer (PBS)	Sigma, München, Deutschland
Trypanblau	Sigma, München, Deutschland
Trypsin	Sigma, München, Deutschland
5cm Schalen	Sigma, München, Deutschland
96-Well-Mikrotiterplatten	Becton Dickinson Labware, New York, USA
6-Well-Platten	Becton Dickinson Labware, New York, USA
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Newton, USA

#### 3.2 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Amoniumpersulfat	Sigma, München, Deutschland
Aprotinin	Sigma, München, Deutschland
Chlorphenicol	Böhringer, Mannheim, Deutschland
ECL	Amersham, Braunschweig, Deutschland
EDTA	Sigma, München, Deutschland
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Enzym BamHI	Fermentas, Burlington, Canada
Enzym EcoRI	Fermentas, Burlington, Canada

---

Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Gene Porter II	Gene Therapy Systems, San Diego, USA
Glycin	Sigma, München, Deutschland
HEPES	Sigma, München, Deutschland
Isopropanol	Sigma, München, Deutschland
Kalium-Bromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCL	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lauryl sulfat sodium salt (SDS)	Sigma, München, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma, München, Deutschland
Methanol	J.B.Baker, Holland
Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
MTT-assay	RocheDiagnostics,Mannheim, Deutschland
NaCl	Sigma, München, Deutschland
NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid 0,2%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Proteaseinhibitor (Complete mini)	RocheDiagnostics, Mannheim,Deutschland
Proteinassay Kit	Sigma, München, Deutschland
Proteinstandards	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas, Burlington, Canada
SOC-Medium	Biomol, Hamburg, Deutschland
Sucrose	Sigma, München, Deutschland
TEMED	Sigma, München, Deutschland
Tris-HCL	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma, München, Deutschland
Trockenmilchpulver	BioRad, München, Deutschland
Tween 20	Sigma, München, Deutschland
XL1-Blue Competent Cells System Y27632	Stratagene, Heidelberg, Deutschland Calbiochem, San Diego, USA

### 3.3 Geräte und Materialien

Blotting-Apparatur	BioRad, München, Deutschland
--------------------	------------------------------

Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Combitips (steril)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Dialyse-Schläuche	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elisa-Reader MRX <sup>®</sup>	Dynex Technology, USA
Falkon-Röhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Filterpapier	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gelkammer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Küvetten	Sarstedt, Newton, USA
Mikroskope	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Minizentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multistepper	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Photometer (Perkin Elmer)	Bodenseewerk, Langen, Deutschland
PVDF-Membranen	Amersham, Braunschweig, Deutschland
Röntgenfilme	Fujifilm, Tokyo, Japan
Schüttler electronic MTS2	IKA, Staufen, Deutschland
Spitzenbodenröhrchen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Sterilbank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Sterilfilter (20 und 45µm)	Millipore, Molsheim, Frankreich
Stripetten	Corning, New York, USA
Thermocycler 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tips (RNase und DNase frei)	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifuge	Beckmann, Californien, USA
Warmluftschüttler Certomat <sup>®</sup>	Braun Biotech, Melsungen, Deutschland
Zellschaber	TPP, Schweiz
Zentrifuge Rotina 46R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Beckmann, Californien, USA

### 3.4 Plasmide

pcDNA3.0 (+)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pCEV29 RhoA N19	zur Verfügung gestellt von A. Palmethofer, pathologisches Institut Universität Würzburg

### 3.5 Antikörper

mouse anti-p27 <sup>kip1</sup>	PharMingen, San Diego, USA
mouse anti- $\beta$ -aktin	Sigma, München, Deutschland
anti-Maus gekoppelte Peroxidase	Dako, Hamburg, Deutschland
mouse anti-RhoA	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-mouse cy3-konjugiert	Dianova, Hamburg, Deutschland

## 4. Methoden

### 4.1 Herstellung von oxidiertem LDL

#### 4.1.1 Gewinnung von nativem LDL

LDL wurde zusammen mit HDL aus einem Frischplasma-Pool von mehreren Blutspendern isoliert. Dem frischen Plasma setzte man dazu umgehend EDTA (0.2 M), NaCl (0.3 M), Aprotinin, Natriumazid (0.2 %), Gentamycin (16mg/l) und Chloramphenicol (80 mg/l) zu. Mittels EDTA sollte die Autooxidation, durch Aprotinin die Proteolyse und durch Antibiotika das Bakterienwachstum verhindert werden.

Die Auftrennung der Lipoproteine erfolgte durch dichteabhängige Ultrazentrifugation in mehreren Schritten. Zu Beginn, wurde das Plasma mit Hilfe von Kalium-Bromid auf eine Zieldichte von 1,063 g/ml eingestellt und anschließend mit 200000 x g bei einer Temperatur von 4°C für 8h zentrifugiert (Beckmann, Vti 50 Rotor). Dieser Schritt führte zur Trennung der LDL- und HDL-Fraktion. Der leichtere LDL-Anteil, mit einer spezifischen Dichte von 1,055 g/ml lagerte sich zusammen mit VLDL, Chylomikronen und Triglyceriden in einer Bande über der Pufferschicht ab. Das wesentlich schwerere HDL, mit einer spezifischen Dichte von 1,19 g/ml, sammelte sich mit den Plasmaproteinen unterhalb der Pufferschicht. Auf diese Weise konnte die oberste Bande mit dem LDL-Anteil entnommen und von dem HDL Anteil abgetrennt werden. In einem zweiten Zentrifugationsvorgang bei 20000 x g und 4°C für 3h und einer erneuten Dichteinstellung von 1,063 g/ml wurde LDL von VLDL, Chylomikronen und Triglyceriden separiert. Im dazu verwendeten Quick-Seal-Röhrchen zeigten sich nach der Zentrifugation 3 Banden. Die Deckschicht bildete VLDL (Dichte ca. 1,004 g/ml), Chylomikronen und Triglyceride (Dichte ca. 0,9 g/ml), in der mittleren Bande befand sich die LDL-Fraktion und am Boden sammelte sich noch enthaltenes HDL.

Nachfolgend wurde dem so gewonnenen LDL die zuvor zugesetzten Salze mittels Dialyse entzogen. Die LDL-Lösung wurde dazu gegen PBS mit 0.2mM EDTA bei 4°C 24h dialysiert. Die Zugabe von EDTA verhinderte eine eventuelle Oxidation. Zuletzt wurde das native LDL mit einem Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S filtriert.

#### 4.1.2 Oxidation von LDL

Vor der eigentlichen Oxidation wurde das gewonnene LDL insgesamt 3 Tage mit mehrmaligem Pufferwechsel gegen PBS bei 4 °C dialysiert, um das vorhandene EDTA zu entfernen. Als Oxidationsmittel diente Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>). Dabei wurde das LDL, in einer Konzentration von 1 mg/ml, gegen PBS mit CuSO<sub>4</sub> (5µM) bei 23°C und Dunkelheit ca. 20 h dialysiert. Gestoppt wurde die Oxidation durch eine erneute 48 stündige Dialyse, mit einmaligem Pufferwechsel, gegen PBS mit EDTA (100µM) bei 4°C. Da oxidiertes LDL mit steigendem Oxidationsgrad eine zunehmend negative Ladung aufweist, wurde der Oxidationsgrad mittels Gelelektrophorese gegen natives LDL bestimmt. Das von uns verwendete oxLDL zeigte in der Elektrophorese eine 2,0 bis 3,0-fach größere Mobilität als natives LDL.

Nach den Dialyseverfahren wurde das oxLDL mit einem Sterilfilter FB 30/0,2 CA-S unter der Sterilwerkbank filtriert. Zuletzt wurde die Proteinkonzentration nach Lowry et al. ermittelt. Das oxLDL konnte anschließend bis zu 3 Wochen in Dunkelheit bei 4°C gelagert werden.

## 4.2 **Zellkultur von humanen Nabelschnurvenen Endothelzellen (HUVEC)**

#### 4.2.1 Kultivieren von HUVEC

HUVEC wurden in der 1. Passage von Clonetics (Walkersville, MD, USA) erworben, und auf unbeschichteten 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen, im Brutschrank bei 37° C und 5.0 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Als Standardmedium wurde Endothelial Cell Basal Medium (EBM) nach Zugabe von 10% fötalem Kälberserum(FCS), Hydrocortison (1µg/ml), bovine brain extract (12µg/ml), Gentamicin (50µg/ml), Amphotericin B (50ng/ml) und h-EGF (10ng/ml) benutzt.

#### 4.2.2 Passagieren von Zellen

Die zu passagierenden Zellen wurden vom Standardmedium befreit und mit PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt, 1 % Trypsin mit einem 0,04% EDTA-Anteil zugegeben, und nach einer Einwirkzeit von 60 sec wurden unter mikroskopischer Kontrolle die Zellen abgeklopft. Die Zellsuspension wurde zur Inaktivierung des

Trypsins in EBM + 2% FCS aufgenommen. Nach Zentrifugation der Zellen wurden sie in Standardmedium resuspendiert und auf die neuen Kulturoberflächen umgesetzt.

Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte spätestens alle 48h. Für alle Versuche wurden Zellen zwischen fünfter und achter Passage verwendet.

### 4.3 Konstruktion des RhoA-N19 Vektors

Die Sequenz für die dominant negative Form RhoA N19 wurde aus dem Originalvektor pCEV29 RhoA N19 enzymatisch ausgeschnitten (Coso, Chiariello et al. 1995). Hierzu wurde 1µg Plasmid-DNA mit jeweils 1U der Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI und dem vom Hersteller vorgesehen Puffer über 2h bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Das Gesamtvolumen von 10µl wurde durch Zugabe von Aqua dest. eingestellt. Anschließend erfolgte nach Zugabe von 10µl „Loading Puffer“ die Auftrennung der DNA entsprechend ihres Molekulargewichtes in einem 1%igem Agarosegel. Die Größenbestimmung der DNA erfolgte nach dem Gellauf und Färben des Gels mit Ethidiumbromid mit Hilfe von DNA-Markern bestehend aus DNA-Fragmenten bekannter Größe. Die entsprechende Band wurde ausgeschnitten und über das Gel Extraction Kit der Firma Qiagen in 47µl TE-Puffer eluiert.

In einem weiteren Verdau wurde der Zielvektor pcDNA3.0 mittels der Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI geschnitten. Anschließend in analoger Weise zum vorherigem Verdau wurde das Inkubat in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Wiederum wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und über das Gel Extraction Kit der Firma Qiagen in 47µl TE-Puffer eluiert.

Im Anschluß daran erfolgte die Ligation der dominant negativen RhoA N19 codierenden Sequenz als Insert in den Zielvektor (pcDNA3). Dazu wurde das Rapid Ligations Kit der Firma Fermentas verwendet. In einem Verhältnis von 1:3 wurde der pcDNA3 (Vektor) mit dem RhoA N19 (Insert) vermischt und zusammen mit 5µl Rapid Ligation Puffer und 1µl T4 DNA Ligase bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Danach konnte das entstandene Plasmid in vorbehandelte E. coli XL 1-Blue (Stratagene) transformiert werden.

Der Ligationsansatz wurde entsprechend der Anleitung der Firma Stratagene zu den zu transfizierenden Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Wasserbad bei 42°C für 45 s einem Hitzeimpuls ausgesetzt und danach

sofort wieder auf Eis gekühlt. Nach 2 min wurden 250 µl auf 37°C erwärmtes SOC-Medium zugegeben, und die Zellsuspension wurde für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler bei 250 rpm inkubiert. Danach wurden 150 µl der Zellsuspension auf einer Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde der Miniprep Kit der Firma Qiagen verwendet. Von über Nacht gewachsenen Bakterienkulturen wurden E. coli Zellen zentrifugiert (2 min, 17900 x g, Tischzentrifuge) und in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Danach wurden zur Auflösung der Zellmembran 250 µl Puffer P2 zugefügt und das entstehende Lysat gemischt. Nach Zugabe von 350 µl Puffer N3 wurde die Lyse gestoppt und die Plasmid-DNA renaturiert. Das Lysat wurde 10 min mit 17,900 x g zentrifugiert und der plasmidhaltige Überstand auf ein Qiaprep-Säulchen aufgetragen, zentrifugiert und mit 0,5 ml Puffer PB gewaschen. Nachdem durch nochmaliges Zentrifugieren des trockenen Säulchens verbliebene Pufferreste entfernt wurden, wurde mit 50 µl Puffer EB die DNA eluiert.

Nach der durchgeführten Minipräparation von 6 gepickten Kolonien wurde die präparierte Plasmid-DNA einer Restriktionshydrolyse mit BamH I wie zuvor beschrieben unterzogen. Die DNA Fragmente wurden im Agarosegel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, um eine erfolgreiche Klonierung der Sequenz in den Zielvektor zu überprüfen. Die Plasmid-DNA einer Kolonie, die die entsprechende Größe zeigt, wurde an die Firma MWG Biotech AG zur Sequenzierung geschickt, um die inaktivierende Mutation des Proteins zu überprüfen. Die Kolonie, die diese gewünschte Mutation zeigte, wurde wie nachfolgend beschrieben in großem Umfang aufgereinigt.

## 4.4 Transfektion

### 4.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen in einer Maxipräparation

Plasmid-DNA wurde aus Bakterienkulturen mittels des EndoFree Plasmid Maxi Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Das Bakterienpellet wurde dabei mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen, die Proteine gefällt und anschließend die Plasmid-DNA über eine Säule gereinigt und konzentriert.

Eine über Nacht (ÜN) auf dem Warmluftschüttler bei 37°C in 250 ml LB-Medium<sup>amp</sup> gewachsenen Bakterienkultur wurde für 15 min bei 6000 rpm (Rotina 46R, Hettich,

Tuttlingen) und 4°C sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte in einem 30 ml-Zentrifugenröhrchen durch Zugabe von 10 ml des P2-Puffers und einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml gekühltem P3-Puffer neutralisiert, das Lysat in den QIAfilter Cartridge überführt und für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die präzipitierten Proteine wie chromosomale DNA, Proteine und Salzkomplexe wurden durch Filtration abgetrennt. Mittels Zugabe von 2,5 ml Puffer ER und einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Endotoxine entfernt. Anschließend wurde das klare Lysat über eine zuvor mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Anionenaustauschsäule (Qiagen-tip 500) gegeben. Die an die Säule gebundene DNA, wurde zweimal mit je 30 ml Puffer QT gewaschen und mit 15 ml QN in ein endotoxinfreies 50 ml Röhrchen eluiert.

Die gereinigte DNA wurde mit 10,5 ml Isopropanol gefällt und für 30 min bei 13000 rpm (Beckmann, Vti 50 Rotor) und 4°C sedimentiert. Das Sediment wurde mit 5ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei 13000 rpm (Beckmann, Vti 50 Rotor) und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde 5-10 min luftgetrocknet und in endotoxinfreien TE-Puffer aufgenommen. Mittels photometrischer Bestimmung wurde die Konzentration der DNA-Lösung ermittelt. Die Menge der ultravioletten Strahlung, die von der DNA-Lösung absorbiert wird, ist ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Die Absorption wird bei 260 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine optische Dichte (1 OD) einer Konzentration von 50 µg/ml. Außerdem kann mit dieser Methode auch die Reinheit der DNA überprüft werden. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm zu 280 nm weist bei reinen DNA-Lösungen einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 auf.

Die Verwendung von Endo-free Puffern gewährleistete die Entfernung bakterieller Toxine, die die Transfektion eukaryotischer Zellen erschweren könnten.

#### 4.4.2 Tranfektion von Plasmid-DNA

HUVEC wurden in 5 cm Schalen ( $3 \times 10^5$  Zellen/Schale; in 4 ml Standardmedium/Well) oder in 96-Well-Platten ( $1 \times 10^4$  Zellen/Well; in 200µl Standardmedium/Well) ausgesät und 16-20 h kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80% wurden sie mittels GenePorter™<sup>2</sup> Transfection Reagenz (GTS, San Diego, CA, USA) transfiziert.

Für die Transfektion von  $3 \times 10^5$  Zellen/Schale wurde 1,25µg DNA mit 31,25µl DNA Diluent maximal 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gleichzeitig in einem anderen Cap 6,25µl GenePorter 2 mit 25µl Basismedium. Für die Transfektion einer 96-Well-Platte wurden 0,1µg DNA/Well, sowie entsprechende Mengen der anderen Substanzen verwendet. Nach der abgelaufenen Inkubationszeit wurden beide Ansätze zusammengegeben und erneut für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz einer 5cm Schale in 2ml Basismedium/Schale und bei einer 96-Well-Platte in 100µl Basismedium/Well auf die Zellen pipettiert.

Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank wurden den Zellen 10µl Transfection Booster No.3/ml Wachstumsmedium (10% FCS) zupipettiert, entspricht bei 5cm Schalen einem Volumen von 2 ml Wachstumsmedium + 20µl Booster 3/Well und bei 96-Well-Platten einem Volumen von 100µl Wachstumsmedium + 1µl Booster3/Well.

#### **4.5 Nicht radioaktiver MTT Proliferationsassay**

##### 4.5.1 Theoretische Grundlagen

Der MTT-Proliferationsassay ist ein quantitativer kolorimetrischer Test, der das Überleben aber besonders auch die Proliferation von Zellen in der in-vitro-Kultur anhand mitochondrialer Stoffwechselaktivität nachweist. Die Grundlage für diese Methode ist die Umwandlung von MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) mittels mitochondrialer Dehydrogenasen, in den wasserunlöslichen Farbstoff Formazan. Da proliferierende Zellen eine höhere Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen aufweisen, kann somit indirekt die Zellproliferation nachgewiesen werden. Die Farbstoffkonzentration wird mittels Extinktionsmessung bestimmt.

##### 4.5.2 Durchführung

Auf insgesamt vier 96-Well-Mikrotiterplatten wurden  $1 \times 10^4$  Zellen/Well in jeweils 100µl Wachstumsmedium (10% FCS) ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden 2 Platten mit einem Volumen von 100µl/Well wie in 4.3.3 beschrieben transfiziert, davon wurde eine Platte mit dem Leervektor pcDNA3, die andere Platte mit der dominant-negativen h-RhoA N19 pcDNA3-Mutante transfiziert. Die 2 übrigen Platten erhielten nur einen Mediumwechsel.

Nach 20 h wurde das Medium für 4 h durch Basismedium ersetzt. Innerhalb dieser 4 h wurde 1 Platte, die lediglich einen Mediumwechsel bekommen hatte, mit dem Hemmstoff Y27632 (10 $\mu$ M) in 100 $\mu$ l EBM (1%FCS)/Well vorinkubiert. Danach wurde das „Hungermedium“ abgesaugt und es folgte die Inkubation aller 4 Platten mit oxidiertem LDL in den Konzentrationen: 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 und 200 $\mu$ g/ml in 100 $\mu$ l EBM (1%FCS), jeweils eine Konzentration pro Reihe. Zusätzlich wurde der vorinkubierten Platte erneut Y27632 in gleicher Konzentration zupipettiert. Im Anschluß an eine 24-stündige Inkubation im Brutschrank (37°C) wurde jeweils 10 $\mu$ l/Well MTT labeling Reagent zugegeben und nach 4h 100 $\mu$ l/Well Zellyse-Puffer (Solubilization solution) hinzupipettiert. Im letzten Schritt, nach 24h, wurden die Platten im Messgerät (ELISA reader) ausgewertet, indem der Absorbtionskoeffizient für Licht der Wellenlänge 570 nm für jedes einzelne Well bestimmt wurde.

#### **4.6 Proteinbestimmung nach Lowry et al. 1951**

Die zu messenden Proteinproben wurden im Verhältnis 1:51 mit PBS verdünnt. Der BSA-Standard wurde im gleichen Verdünnungsverhältnis PBS und Lysispuffer in NaOH gelöst wie die Proteinproben. Mit dieser Stammkonzentration (400  $\mu$ g/ml) wurde eine Konzentrationsreihe (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 und 0 $\mu$ g/ml) hergestellt.

In alle Reagenzröhrchen wurde anschließend 500  $\mu$ l Lowry-Reagenz gegeben, gemischt und 20 min inkubiert. Danach wurde jeweils 250  $\mu$ l Folin/Ciocalteu's Phenol Reagent hinzupipettiert. Nach 30 minütiger Inkubation wurden die Proben gegen den Leerwert bei 750 nm am Photometer gemessen. Der Proteingehalt wurde über die gemessenen Extinktionen mit Hilfe der Standardkurve errechnet.

#### **4.7 Western-Blot**

##### 4.7.1 Aufbereitung der Proben

Die Zellen wurden 2x mit 3ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 180 $\mu$ l/Well Lysispuffer abgeschabt und in Caps überführt. Mit Insulinspritzen wurde die DNA geschert. Für die Proteinbestimmung nach Lowry wurde pro Probe 20  $\mu$ l des Lysats in 10  $\mu$ l NaOH 0,3 M pipettiert und 5min bei 95°C geschüttelt.

Für den Western-Blot wurde 110µl der Probe mit 55µl 3x SDS (Mercapto) vermischt und für 5 min bei 95° denaturiert.

#### 4.7.2 Durchführung

Die eindimensionale SDS-PAGE trennt Proteine der Größe nach auf. Die Proteine erhalten durch die Bindung an das zugesetzte SDS eine negative Ladung. Diese ist dem Molekulargewicht proportional.

Bei der verwendeten Methode nach Lämmli (1970) wurden die Proben zunächst im Sammelgel konzentriert und anschließend im Trenngel mit 10% Polyacrylamid aufgetrennt. Um die gleiche Proteinbeladungen (in µg) und Volumina (in µl) der Taschen zu erreichen, wurde die Konzentration orientierend an dem geringsten Proteingehalt bestimmt, mit Lysispuffer auf ein Gesamtvolumen von max. 35-40 µl / Tasche aufgefüllt und auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 40 mA pro Gel und einer Spannung von 200-300 Volt über 2-3 h in den mit Laufpuffer gefüllten Gelkammern. Als Molekulargewichtsmarker wurde See Blue plus 2 (von 4 bis 250kDa) verwendet. Das Proteinmuster des Gels wurde mit Hilfe einer Transblot® Elektroforetic Transfer Cell nach Angaben des Herstellers auf eine PVDF-Membran übertragen. Das Gel wurde in Nachbarschaft zu einer PVDF-Membran gebracht, beide Seiten mit Filterpapier bedeckt und schließlich eine Spannung angelegt. Das Blotting erfolgte im Transferpuffer für 90 min bei einer Stromstärke von 2 A.

Danach wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht bei 4°C mit Blockierungslösung (TBST: Trispuffer mit 3% fettfreiem Trockenmilchpulver) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (mouse anti-p27<sup>kip1</sup>) in TBST mit 3% Milchpulver, in einer Verdünnung von 1:500, für eine Stunde. Nach dreimaligem Waschen mit Blockierungslösung wurde die Membran 45 min in einer 2000fachen Verdünnung mit einem Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper (goat anti-mouse) inkubiert. Im Anschluß wurden die Membranen viermal mit TBST gewaschen.

Zur Detektion der gebundenen Zweitantikörper wurde das ECL® Plus Western Blotting Detection System eingesetzt. Durch das gekoppelte Enzym wurde eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Die Membran wurde mit den Färbelösungen überschichtet und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Der Nachweis von Proteinbanden

konnte in der Dunkelkammer durch Exposition eines photographischen Filmes auf der Membran nachgewiesen werden.

#### **4.8 Nachweis von p27<sup>Kip1</sup> Expression in HUVEC**

Die Zellen wurden in 5 cm Schalen ( $3 \times 10^5$  Zellen/Schale in je 4 ml Wachstumsmedium) ausgesät. Bei einer Konfluenz von 80% wurden sie, wie in 4.3.3 beschrieben, mit der dominant-negativen RhoA N19-Mutante oder dem Leervektor pcDNA3 transfiziert. HUVEC wurden mit 1,25 µg DNA/Schale inkubiert.

Nach einer 15 stündigen Hungerphase mit Basismedium (0,1% FCS) wurden die Zellen zwei mal mit PBS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und mit oxLDL in den Konzentrationen 0, 5 und 50 µg/ml für 4, 12 und 24 h inkubiert. Anschließend wurden sie entsprechend den Inkubationszeiten geerntet und die Proteinkonzentration mittels der Lowryreaktion bestimmt. Zum Nachweis der p27<sup>Kip1</sup> Expression wurde ein Westernblot gemäß 4.6.2 durchgeführt.

#### **4.9 Immunhistochemischer Nachweis der RhoA-Aktivität**

Immunhistochemische Nachweisverfahren werden zur Lokalisation von Zellkomponenten verwendet. Die Immunreaktion basiert auf einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion, mit einem oder mehreren, in der Regel durch Enzyme oder Flourchrome markierten, Antikörper.

Die Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Es folgte eine vierstündige Hungerperiode in serumfreiem Medium. Anschließend wurden sie für 1 min, 5 min und 30 min mit 5 µg/ml oxLDL oder nur mit EBM (Kontrolle) inkubiert.

Die Fixierung erfolgte in 4% Paraformaldehyd für 10 min bei 4°C. Danach wurden die Zellen insgesamt fünfmal mit PBS gewaschen und schließlich mit 50 mM Ammoniumchlorid für 10 min inkubiert, um störende endogene Peroxidasen zu hemmen. Nach einem erneuten Waschgang folgte die Permeabilisierung der Membranen mittels 0,1% Triton X-100 in PBS für weitere 10 min. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurden die Proben für 30 min mit 10% goat-serum in 0,1% Triton X-100 in PBS inkubiert.

Der Erstantikörper, monoklonaler mouse anti-RhoA-Antikörper, wurde in einer Verdünnung von 1:200 in 10% goat serum in 0,1 % Triton in PBS für 60 min bei 37°C zugegeben. Nach einer erneuten Waschphase wurden die Zellen mit cy 3-konjugiertem goat anti-mouse-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 in 10% goat serum in 0,1% Triton in PBS für 30 min inkubiert. Zum Schluß wurden die Proben noch dreimal mit PBS und destilliertem Wasser gewaschen, in Mowiol eingebettet und mittels eines Argon/Kryptonlaser-Mikroskops bei einer Wellenlänge von 514 nm untersucht.

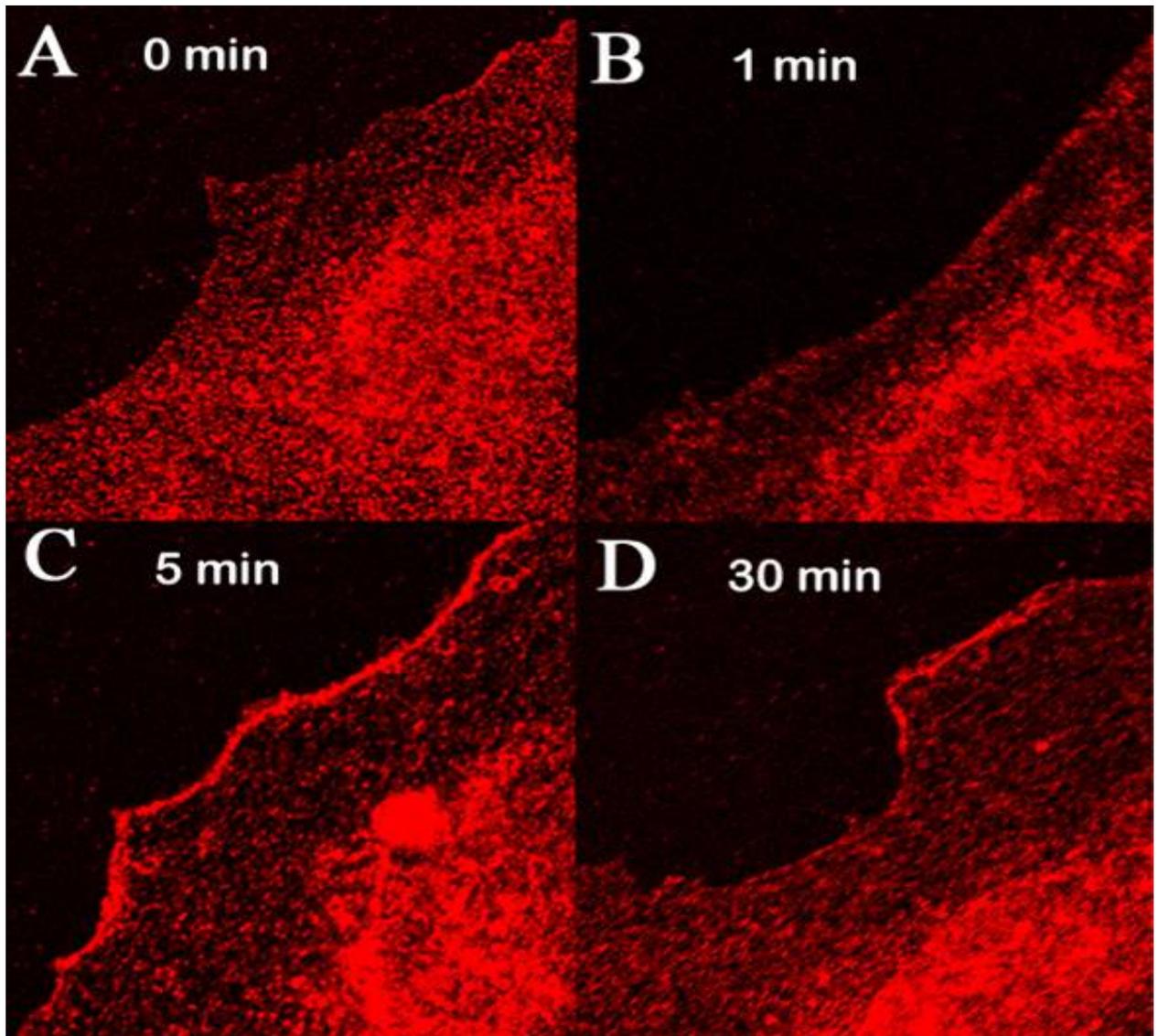
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Wirkung von oxLDL auf die RhoA-Aktivität in HUVEC

Im experimentellen Ablauf wurde zunächst untersucht, ob oxLDL in der Lage ist, RhoA zu aktivieren.

RhoA-Aktivierung zeichnet sich durch eine Translokation von RhoA vom Zytosol in die Plasmamembran aus. Um die Translokation von RhoA durch oxLDL Stimulation darzustellen, wurde eine immunhistochemische Untersuchung mittels spezifischen RhoA-Antikörpern durchgeführt. Dazu wurden HUVEC unterschiedlich lange mit oxLDL (5µg/ml) stimuliert, anschließend fixiert und schließlich die Expression von RhoA mittels konfokalem Lasermikroskop dokumentiert.

Unter Kontrollbedingungen zeigte sich eine homogene Verteilung von RhoA im Zytosol (vgl. Abb.4a). Schon eine Minute nach oxLDL-Stimulation zeichnete sich in den Zellen eine Translokation von RhoA in die Plasmamembran ab (vgl. Abb.4b). Die deutlichste Translokation von RhoA aus dem Zytosol in die Plasmamembran, als Marker für die Aktivierung von RhoA, wurde nach fünf minütiger oxLDL Stimulation nachgewiesen (vgl. Abb.4c). Nach dreißig minütiger oxLDL Stimulation war noch immer eine deutliche Anreicherung von RhoA in der Plasmamembran zu sehen, jedoch weniger stark als nach fünf minütiger Stimulation mit oxLDL (vgl. Abb.4d).



**Abb.4:** OxLDL induziert RhoA-Aktivität in HUVEC. Immunhistochemischer Nachweis der RhoA-Translokation als Zeichen der RhoA-Aktivierung, mittels eines spezifischen RhoA Antikörper unter der Verwendung eines konfokalen Lasermikroskops. HUVEC wurden für 1min (B), 5min (C) und 30 min (D) mit 5 $\mu$ g/ml oxLDL oder nur EBM (A) inkubiert.

## 5.2 Konstruktion des RhoA N19-Vektors

Um die RhoA-Aktivierung *in vitro* hemmen zu können, wurde ein entsprechender Vektor konstruiert. Die dominant-negative RhoA N19 Mutante ist gekennzeichnet durch den Austausch der Aminosäure Asparagin für Threonin in der Position analog Codon 17 von Ras. Diese Mutation verändert das Protein in eine bezüglich seiner GTP-bindenden Aktivität inaktive Variante.

Die Sequenz für die dominant negative Form RhoA N19 wurde aus dem Originalvektor pCEV29 RhoA N19 (Coso, Chiariello et al. 1995) entnommen (von A. Palmethofer zur Verfügung gestellt) und über die Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI in den Expressionsvektor pcDNA3.0 (Invitrogen) kloniert. Nach der Klonierung wurden vier Kolonien isoliert und anschließend bei der Firma MWG sequenziert. Die Kolonie die die gewünschte Mutation 5'-AAGAACTGC-3' (Position 18-20) im Vergleich zur normalen RhoA Sequenz 5'-AAGACATGC-3' (Position 18-20) zeigte wurde nochmals amplifiziert und die entsprechende Plasmid-DNA im großen Umfang mit dem Endofree Maxi Kit der Firma Qiagen aufgereinigt.

## 5.3 Nachweis der Überexpression von RhoA N19

Zur Überprüfung der Transfektion des konstruierten RhoA N19-Vektors wurde der RhoA-Gehalt in Zellen, die entweder mit dem Leervektor pcDNA3 oder mit dem RhoA N19-Vektor transfiziert wurden, mittels Westernblotanalyse überprüft. Es konnte nachgewiesen werden, daß RhoA N19 transfizierte Zellen deutlich mehr RhoA exprimieren als pcDNA3 transfizierte Zellen.

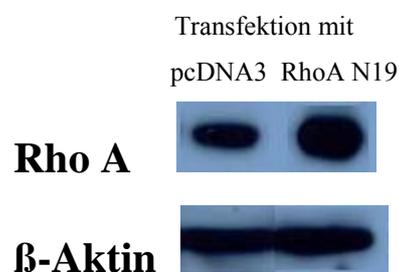


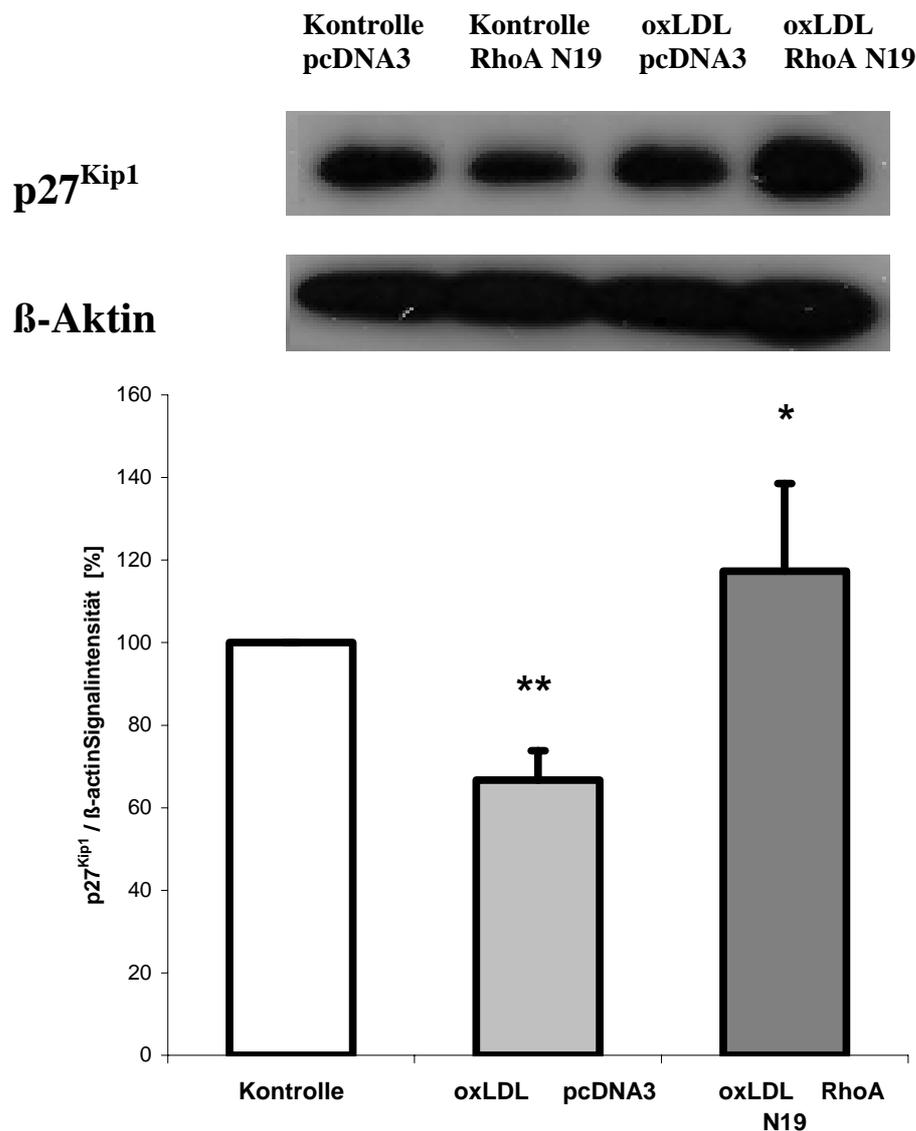
Abb.5: Die Zellen, die mit RhoA N19 transfiziert wurden, zeigten eine Überexpression von RhoA im Vergleich zu Zellen die mit dem Leervektor pcDNA3 transfiziert wurden.

Dieses Resultat ergab sich aus Westernblotanalysen die mit monoklonalen IgG anti-RhoA Antikörper der Maus durchgeführt wurden.  $\beta$ -Aktin diente zur Kontrolle um eine gleichmäßige Proteinbeladung zu verifizieren.

#### **5.4 Auswirkungen der RhoA Hemmung auf die oxLDL induzierte p27<sup>Kip1</sup> Expression**

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits früher in Endothelzellen nachweisen, daß eine vierstündige oxLDL Inkubation zu einer signifikanten p27<sup>Kip1</sup> Suppression führt. Um zu überprüfen, ob RhoA eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion dieser oxLDL-Wirkung spielt, wurde die Auswirkungen einer RhoA Inhibition auf die oxLDL induzierte p27<sup>Kip1</sup> Expression untersucht.

Dazu wurde vor der oxLDL Stimulation die RhoA Aktivierung in HUVEC mittels Transfektion der dominant-negativen RhoA N19 Mutante gehemmt. In Endothelzellen, welche nur mit dem Leervektor pcDNA3 transfiziert waren (Kontrolle), zeigte sich nach einer vierstündigen oxLDL Inkubation wie in den früheren Untersuchungen eine signifikante Expressionsverminderung von p27<sup>Kip1</sup> ( $66 \pm 7\%$ ;  $p \leq 0,001$ , vgl. Abb.5). Im Gegensatz dazu konnte in Zellen, die mit der dominant-negativen RhoA N19 Mutante transfiziert waren nach einer vierstündigen oxLDL Inkubation keine p27<sup>Kip1</sup> Suppression festgestellt werden ( $117 \pm 21\%$ ; vgl. Abb.5) im Vergleich zu RhoA N19 transfizierten Zellen, die lediglich mit Puffer stimuliert wurden (Kontrolle). Somit wurde die oxLDL induzierte p27<sup>Kip1</sup> Suppression in RhoA N19 transfizierten Zellen gegenüber oxLDL stimulierten pcDNA3 transfizierten Zellen signifikant gehemmt und folglich ist die oxLDL induzierte Expressionsverminderung von p27<sup>Kip1</sup> in HUVEC auf die oxLDL vermittelte RhoA Aktivierung angewiesen.



**Abb.6:** Durch vorherige Hemmung der RhoA-Aktivierung erfolgt keine oxLDL induzierte Expressionsverminderung von p27<sup>Kip1</sup> in Endothelzellen. Dieses Resultat ergab sich aus Westernblotanalysen, die mit monoklonalen anti-p27<sup>Kip1</sup> Antikörper der Maus durchgeführt wurden. Die Zellen wurden entweder mit dem Leervektor pcDNA3 oder der dominant-negativen RhoA N19 Mutante transfiziert und anschließend mit oxLDL oder ausschließlich Puffer (Kontrolle) inkubiert. Die weiße Säule stellt Kontrollzellen dar, welche entweder mit dem pcDNA3 oder dominant-negativen RhoA N19 Vektor transfiziert, 4h nur mit Puffer stimuliert und als 100% definiert wurden. Die grauen Säulen, entsprechen HUVEC, die entweder mit dem pcDNA3 oder dominant-negativen RhoA N19 Vektor transfiziert und mit 50 $\mu$ g/ml oxLDL für 4h stimuliert

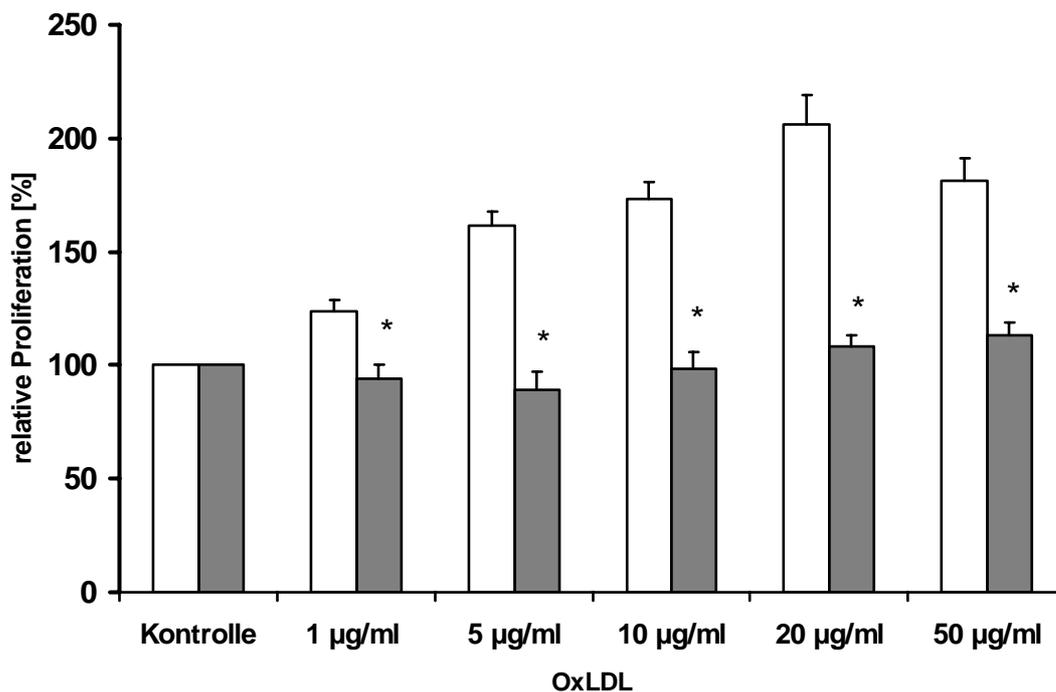
wurden. Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Densitometriemessungen von  $n = 6$  unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM dar.  $\beta$ -Aktin diente zur Kontrolle, um eine gleichmäßige Proteinbeladung zu verifizieren. Durch zweizeitigen gepaarten T-Test erwiesen sich die Ergebnisse als signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  (durch \* dargestellt) und hoch signifikant bei  $p \leq 0,001$  (durch \*\* dargestellt).

### **5.5 Auswirkungen der RhoA Hemmung auf die oxLDL induzierte Proliferation von HUVEC**

Vorbekannt war, daß oxLDL die Expression von  $p27^{Kip1}$  beeinflusst und dadurch eine konzentrationsabhängige Proliferationsantwort in Endothelzellen auslösen kann. Vorbekannt war auch dass eine RhoA Aktivierung die Proliferation von Zellen steigern kann.

Da unter 5.1. gezeigt werden konnte dass oxLDL RhoA aktivieren kann und unter 5.3 gezeigt werden konnte dass die oxLDL induzierte Expressionsverminderung von  $p27^{Kip1}$  in HUVEC auf die oxLDL vermittelte RhoA Aktivierung angewiesen ist, wurde als nächstes untersucht, ob die oxLDL induzierte Zellproliferation tatsächlich auf die oxLDL vermittelte RhoA Aktivierung angewiesen ist, oder ob die oxLDL induzierte Zellproliferation unabhängig vom RhoA Signalweg erfolgt. Dazu wurden HUVEC mit der dominant-negativen RhoA N19 Mutante transfiziert, und anschließend die Zellproliferation nach oxLDL Stimulation, analysiert.

Nicht radioaktive MTT-Proliferationsassays zeigten in diesen Zellen eine nahezu vollständig fehlende Proliferationsantwort auf oxLDL Stimulation, im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit dem Leervektor pcDNA3 transfiziert wurden (vgl Abb.6). Die maximal oxLDL induzierte Proliferationsantwort (bei einer oxLDL Konzentration von  $20 \mu\text{g/ml}$ ) in Kontrollzellen, welche mit dem pcDNA3 Vektor transfiziert wurden, lag bei  $206 \pm 13\%$ , während die maximale Proliferationsantwort in RhoA N19 transfizierten Zellen nur  $113 \pm 6\%$  betrug ( $p \leq 0,05$ ). Ab einer oxLDL Konzentration von  $50 \mu\text{g/ml}$  zeigte sich in den Kontrollzellen eine Abnahme der Proliferationsantwort. Diese Wachstumskurve der pcDNA3 transfizierten Zellen ist der Wachstumskurve von nicht transfizierten HUVEC, aus Vorversuchen, sehr ähnlich.



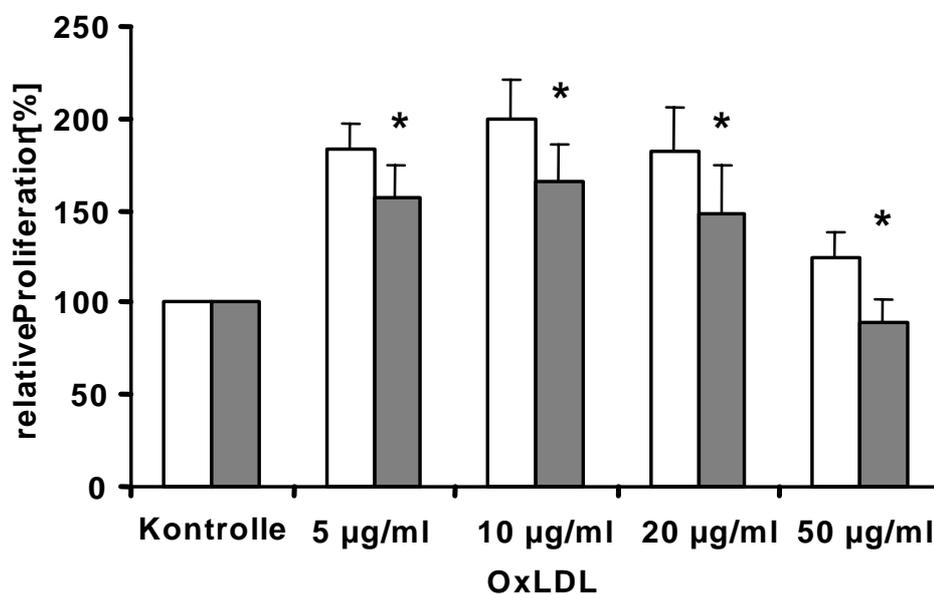
**Abb.7:** Hemmung der RhoA-Aktivierung mittels Transfektion von RhoA N19 verhindert nahezu vollständig die proliferative Wirkung von oxLDL auf HUVEC. Die Proliferation von Endothelzellen durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von oxLDL wurde mittels MTTassays nachgewiesen. Die weißen Säulen entsprechen Kontrollzellen, die mit dem pcDNA3 Vektor transfiziert wurden. Kontrollzellen ohne oxLDL Inkubation (ausschließlich Puffer) wurden als 100% definiert. Die grauen Säulen entsprechen HUVEC, welche mit der dominant-negativen RhoA N19 Mutante transfiziert wurden.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Zwölfbestimmungen von  $n = 4$  unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM dar. Durch zweiseitigen gepaarten T-Test erwiesen sich die Ergebnisse als signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  (durch \* dargestellt).

## 5.6 Auswirkungen der Rho Kinase Hemmung auf die oxLDL induzierte Proliferation von HUVEC

Da Rho-Kinase ein Effektorprotein von RhoA darstellt, wurde in der nächsten Versuchsreihe der Einfluß des Rho-Kinase Inhibitors Y27632 im Hinblick auf die oxLDL vermittelte Zellproliferation überprüft.

Dazu wurden HUVEC in Gegenwart des Rho-Kinase Inhibitors Y27632 mit verschiedenen oxLDL Konzentrationen inkubiert. Nicht radioaktive MTT Proliferationsassays zeigten im Vergleich zu Puffer-behandelten Kontrollzellen eine signifikante Verminderung der Proliferationsrate in Y27632-behandelten Endothelzellen. Die maximale Proliferationsantwort in Kontrollzellen betrug  $200 \pm 12\%$ , während Y27632 behandelte Zellen eine maximale Proliferationsrate von  $166 \pm 19\%$  aufwies ( $p \leq 0,05$ ). OxLDL Konzentrationen von  $5\mu\text{g/ml}$ - $10\mu\text{g/ml}$  zeigten einen Anstieg der Zellproliferation, wobei bei höheren Konzentrationen ( $50\mu\text{g/ml}$ ) eine Abnahme der Proliferationsantwort nachzuweisen war.



**Abb.8:** Rho-Kinase Hemmung reduziert die proliferative Wirkung von oxLDL auf HUVEC. Die Proliferation von Endothelzellen durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von oxLDL wurde mittels MTTassays nachgewiesen. Die weißen Säulen entsprechen Kontrollzellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von oxLDL inkubiert wurden. Kontrollzellen, ohne oxLDL Stimulation (nur Puffer) wurden

als 100% definiert. Die grauen Säulen entsprechen HUVEC, die zusätzlich mit 10 $\mu$ M des Rho-Kinase Inhibitor Y27632 behandelt wurden. Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Zwölfachbestimmungen von n = 6 unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM dar. Durch zweiseitigen gepaarten T-Test erwiesen sich die Ergebnisse als signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  (durch \* dargestellt).

## 6. Diskussion

Atherosklerose ist charakterisiert durch gesteigerten Zellumsatz, bei gleichzeitigem Vorkommen von Proliferation, Apoptose und Nekrose. Vor diesem Hintergrund wurde speziell die proliferationsbeeinflussende Wirkung von oxLDL als Schlüsselmolekül der Atherogenese untersucht. Die Proliferation einer Zelle ist abhängig von Veränderungen der Expression oder Aktivierung von Proteinen, welche den Zellzyklus beeinflussen und regulieren.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde die Einflußnahme von oxLDL auf die Zellzyklusregulation untersucht, mit besonderem Schwerpunkt auf den Zyklinkinaseinhibitor p27<sup>Kip1</sup> und dessen Regulator, die kleine GTPase RhoA. Als Grundlage der Studie dienten frühere Versuche unserer Arbeitsgruppe, die für Endothelzellen nachweisen konnten, daß oxLDL in niedrigen Konzentrationen Proliferation bewirkt (Heinloth, Heermeier et al. 2000). Ebenso bekannt war, daß diese Proliferation über eine Suppression des Zyklinkinaseinhibitor p27<sup>Kip1</sup> zu erklären ist (Seibold, Schurle et al. 2004).

Diese vorliegende Arbeit untersuchte nun die mögliche Beteiligung von RhoA, da RhoA als wichtiger Regulator der p27<sup>Kip1</sup> Expression identifiziert wurde (Seasholtz, Zhang et al. 2001). Untersucht wurde zunächst, in wie weit oxidativ verändertes LDL RhoA-Aktivität in HUVEC induzieren kann. Zur Charakterisierung der spezifischen Effekte durch RhoA wurde die Aktivität mittels einer dominant-negative RhoA N19 Mutante gehemmt. Schließlich sollten die Auswirkungen der RhoA-Hemmung auf die oxLDL induzierte p27<sup>Kip1</sup> Expression, sowie die oxLDL induzierte Proliferation von HUVEC nachgewiesen werden. Des weiteren interessierte, ob Rho-Kinase, ein Effektorprotein von RhoA, ebenso an der oxLDL induzierten Endothelzellproliferation beteiligt ist.

### 6.1 OxLDL induziert RhoA-Aktivität

RhoA-Aktivität ist gekennzeichnet durch eine Translokation der zytosolischen GDP-gebunden Form in die membran-assoziierte GTP-gebundene Form. Erhöhte

Anreicherung von membranassoziierter RhoA ist nach aktuellem Stand der Forschung ein Marker für aktives RhoA (Gong, Fujihara et al. 1997; Seasholtz, Zhang et al. 2001). Durch immunhistochemische Markierung von RhoA konnte einerseits die Translokation, sowie auch der zeitliche Ablauf der oxLDL induzierten RhoA-Stimulation in Endothelzellen, sichtbar gemacht werden. Es zeigte sich eine schnelle und transiente Aktivierung bzw. Translokation von RhoA durch oxLDL Stimulation. Diese Ergebnisse bestätigten frühere Versuche unserer Arbeitsgruppe, die ebenso eine schnelle und transiente Translokation von RhoA durch oxLDL Stimulation in glatten Muskelzellen nachweisen konnten (Galle, Mameghani et al. 2003).

Eine mögliche Erklärung für die Steuerung der Rho-GTPasen durch oxLDL ist zum einen über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), beschrieben bei zahlreichen anderen Substanzen, oder zum anderen die direkte Beeinflussung der regulatorischen Proteine.

Die meisten Rho-GTPasen lokalisieren bevorzugt im Zytosol. Durch die posttranslatorische Modifikation, die zur Prenylierung eines Cysteinrestes am C-Terminus führt, sind sie in der Lage mit Membranen zu interagieren. Dieser Membrankontakt ist wichtig für die Aktivität von RhoA. Der Aktivitätszustand wird außerdem durch drei Gruppen regulatorischer Proteine beeinflusst. Die Überführung in den aktiven Zustand erfolgt durch Nukleotidaustauschfaktoren (GEFs), indem gebundenes GDP gegen GTP ausgetauscht wird. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) katalysieren die Hydrolyse von GTP zu GDP und führen zur Inaktivierung der Rho-GTPase. Zum dritten Regulationsmechanismus zählen Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs), die im Zytosol einen löslichen Komplex mit Rho-Proteinen eingehen und damit eine Aktivierung an der Zellmembran verhindern.

Zahlreiche Substanzen neben oxLDL sind in der Lage RhoA zu aktivieren, besonders Entzündungsmediatoren wie Phospholipide, Zytokine und Wachstumsfaktoren, wobei viele von ihnen über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) wirken. Agonisten, die als effektive Aktivatoren von RhoA identifiziert wurden, sind Thrombin (Seasholtz, Majumdar et al. 1999), Angiotensin II (Funakoshi, Ichiki et al. 2001), Lysophosphatidylsäure (LPA) (Siess, Zangl et al. 1999) und Sphingosin-1-Phosphat (Xu, Hansen-Schwartz et al. 2004). Der Rezeptor dieser Agonisten bindet an heterotrimere G-Proteine der  $G_{12/13}$ -Familie. Als bahnbrechende Arbeit gilt in diesem Zusammenhang der Nachweis der Verbindung zwischen  $G_{\alpha_{13}}$  und RhoA Aktivität. Die

Arbeitsgruppe um Sternweis zeigte, dass  $G\alpha_{13}$  durch Interaktion mit einem spezifischen GEF eine RhoA Stimulation bewirkt (Hart, Jiang et al. 1998). Anschließende Studien haben ebenfalls bewiesen, daß GPCRs in der Lage sind bestimmte GEFs zu beeinflussen und dadurch eine Aktivierung der RhoA Signalkaskade zu induzieren. Inwieweit oxLDL über G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder Interaktion mit GEFs in die Regulation von RhoA eingreift ist noch nicht geklärt.

## 6.2 RhoA Hemmung verhindert eine oxLDL induzierte p27<sup>Kip1</sup> Suppression

Oxidativ verändertes LDL vermag in die Regulation des Zellzyklus einzugreifen. Wichtig in diesem Zusammenhang ist der Zyklinkinaseinhibitor p27<sup>Kip1</sup>. Die p27<sup>Kip1</sup> Konzentration ist maximal in G0-Zellen, fällt ab sobald die Zelle in den Zellzyklus eintritt und ist am niedrigsten in der Synthese-Phase. p27<sup>Kip1</sup> reguliert den Vorgang der G1-Progression sowie den Eintritt der Zelle in die Phase der DNA-Replikation und übernimmt dabei unterschiedliche Funktionen. Neben der Inhibition des CyclinE/CDK2-Komplexes, erleichtert und stabilisiert p27<sup>Kip1</sup> die Formation des Komplexes CyclinD/CDK4 welcher den Übergang von G1-, zur S-Phase triggert. Folglich ist p27<sup>Kip1</sup> ein wichtiger Regulator zellulärer Signale, die verantwortlich für Zellwachstum, Proliferation und Zelltod sind.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß eine vierstündige oxLDL Inkubation zu einer signifikanten p27<sup>Kip1</sup> Suppression um ~50 % führt (Seibold, Schurle et al. 2004). Die Arbeitsgruppe um Seasholtz konnte 2001 die Herabregulation von p27<sup>Kip1</sup> mit einer gesteigerten RhoA Aktivierung erklären, nach Überexpression der aktiven RhoA-Mutante, L63RhoA, in aortalen glatten Muskelzellen der Ratte (Seasholtz, Zhang et al. 2001).

Betrachtet man diese Ergebnisse zusammen, liegt die Hypothese nahe, daß oxLDL über eine RhoA Aktivierung eine Suppression von p27<sup>Kip1</sup> bewirkt. Um diese Hypothese zu untersuchen und die Rolle von RhoA weiter aufzuklären, wurden Versuche durchgeführt, in denen mittels Transfektion der inaktivierten, bzw. dominant-negativen RhoA-Mutante, RhoA N19, die Rho Aktivierung in humanen Endothelzellen gehemmt wird.

Die inhibierende Funktion von RhoA N19 liegt darin, in der Zelle kompetitiv mit dem Wildtyp um die Bindung von GEFs zu konkurrieren, wobei sie auch nach Bindung eines GDP oder sogar GTP keinen Effektor aktivieren kann. Da die Mutante eine höhere

Affinität zu GEFs aufweist als der Wildtyp und sie überexprimiert wird, wird der physiologische Wildtyp der Rho-GTPase weniger oder kaum aktiviert (Feig 1999). Die Ergebnisse zeigten in HUVEC, die mit der dominant-negativen RhoA N19 Mutante transfiziert wurden keine oxLDL induzierte p27<sup>Kip1</sup> Suppression, sondern sogar einen leichten Expressionsanstieg auf  $117 \pm 21\%$  (nicht signifikant), während unter Kontrollbedingungen (Endothelzellen, die mit einem Leervektor transfiziert wurden) wie in den Voruntersuchungen eine signifikante Expressionsverminderung von p27<sup>Kip1</sup> ( $66 \pm 7\%$ ) auftrat (signifikant). Diese Beobachtung deckt sich somit einerseits mit den früheren Versuchen, als auch mit der aufgestellten Hypothese, daß oxLDL eine p27<sup>Kip1</sup> Suppression über den RhoA-Signalweg zu vermitteln scheint.

Vergleichbare Ergebnisse lieferten Arbeiten von Hirai et. al. 1997 oder auch Laufs et. al. 1999, die über eine RhoA-Aktivierung mit dem zytotoxischen Nekrosefaktor 1 ebenso einen abnehmenden p27<sup>Kip1</sup> Proteinlevel in humanen glatten Muskelzellen nachwiesen. Umgekehrt, führte eine selektive RhoA Hemmung durch das C3-Toxin des Bakteriums Clostridium botulinum oder durch eine Statintherapie zu einer gesteigerten p27<sup>Kip1</sup> Expression (Hirai, Nakamura et al. 1997; Laufs, Marra et al. 1999). Das C3-Toxin inaktiviert das RhoA-Protein durch eine ADP-Ribosylierung. Wie sich in unseren Versuchen aber herausstellte, war die C3 Behandlung zu toxisch für humane Endothelzellen, um entsprechende Studien durchzuführen.

Die Beobachtungen unterstützend, berichtete Hu et. al. 1999 darüber, daß RhoA in der Lage ist die Cyclin E/CDK2 Aktivität zu regulieren und dadurch den Abbau von p27<sup>Kip1</sup> in embryonalen Hamsterfibroblasten fördert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß eine Expression von dominant-negativer RhoA-Mutante zur Blockierung der Cyclin E/CDK2 Aktivität führt und damit die p27<sup>Kip1</sup> Suppression verhindert (Hu, Bellone et al. 1999).

Interessant in diesem Zusammenhang ist ein gleichzeitiges Vorkommen von erhöhtem aktiven RhoA und einer p27<sup>Kip1</sup> Suppression in den Gefäßen hypertensiver Ratten (Seasholtz, Zhang et al. 2001). Hieraus kann man postulieren, daß der Rho-Signalweg möglicherweise an unterschiedlichen Prozessen bei der Atheroskleroseentstehung beteiligt ist. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche bestätigen, daß oxLDL die Herabregulation von p27<sup>Kip1</sup> über den RhoA Signalweg beeinflusst und stehen somit in Einklang der bislang bekannten Daten.

### 6.3 RhoA Hemmung verhindert die oxLDL induzierte Proliferation von HUVEC

Bekannt ist, daß oxidativ verändertes LDL Proliferation und Hypertrophie via Regulation von p27<sup>Kip1</sup> Expression beeinflusst (Seibold, Schurle et al. 2004). Wie einleitend beschrieben, führt eine Herabregulation von p27<sup>Kip1</sup> zu einer Aktivierung der Zyklin-abhängigen-Kinase 2 (CDK2 ist essentiell für den Übergang von G1-, in die G2-Phase) und somit zur Zellzyklusprogression mit anschließender Mitose. Währenddessen hat eine Überexpression von p27<sup>Kip1</sup> eine Arretierung in der G1-Phase zur Folge, welche als Ursache der zellulären Hypertrophie angesehen wird.

Seasholtz et. al. konnten nachweisen, daß die p27<sup>Kip1</sup> Suppression (Resultat der RhoA-Aktivierung) verantwortlich für die zelluläre Proliferation in Thrombin-stimulierten aortalen glatten Muskelzellen ist (Seasholtz, Majumdar et al. 1999).

Aus den Vorversuchen dieser Arbeit, die zeigen, daß oxLDL RhoA zu aktivieren vermag und den bereits publizierten Ergebnissen von Seasholtz folgte die Hypothese, daß die oxLDL induzierte Proliferation über die RhoA-Signalkaskade vermittelt wird. Wir konnten nun mittels nicht radioaktiven MTT-Proliferationsassays zeigen, daß eine RhoA-Hemmung nahezu vollständig die proliferative Wirkung von oxLDL auf HUVEC verhindert. Die maximale Proliferationsantwort in RhoA N19 transfizierten Zellen betrug nur  $113 \pm 6\%$ , die Inhibition der RhoA Aktivierung verhindert also die proliferationssteigernde Wirkung von oxLDL. In Kontrollzellen welche mit dem Leervektor pcDNA3 transfiziert wurden lag die Proliferationsantwort hingegen wie in untransfizierten Zellen bei  $206 \pm 13\%$ , was nahe legt, dass die RhoA Aktivierung für die proliferationssteigernde Wirkung von oxLDL erforderlich ist.

Experimentelle Daten zeigten, daß oxidativ verändertes LDL neben der Aktivierung von RhoA auch über seine Induktion der Sauerstoffradikalbildung, Proliferation, Hypertrophie, Apoptose oder Nekrose bewirkt, abhängig von der Konzentration und Expositionszeit der Zellen durch oxLDL (Galle, Schneider et al. 1999; Heinloth, Heermeier et al. 2000; Heinloth, Brune et al. 2002). Unklar ist noch, ob diese oxLDL induzierte O<sub>2</sub><sup>-</sup> Formation direkt Zellzyklusproteine, wie auch p27<sup>Kip1</sup>, regulieren kann oder ebenso über den Rho-Signalweg bzw. andere Signalkaskaden die Zellzyklusregulation beeinflusst.

Im Bezug auf die Wirkung von oxLDL auf die Zellzyklusprogression wurden bisher einige involvierte Signalwege von verschiedenen Forschungsgruppen beschrieben.

OxLDL induziert Makrophagenproliferation durch Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (Martens, Reiner et al. 1998).

Der Sphingomyelin/Ceramide/Sphingosin-1-Phosphat Signalweg ist beteiligt an der oxLDL induzierten Proliferation von glatten Muskelzellen, der Aktivierung von extracellular signal-related kinasen (ERK1/2) und an der DNA-Synthese über die Freisetzung von aktivierter Matrix-Metalloproteinase 2 (Auge, Maupas-Schwalm et al. 2004). Außerdem führt eine Aktivierung des EGFR/PI-3K/Akt Signalweges zur Resistenz der Zelle gegen die toxische Wirkung von oxLDL (Auge, Garcia et al. 2002). Zettler et.al. beschrieben als weitere Signalkaskade den Phospholipase C Signalweg, welcher an der oxLDL induzierten Proliferation von Fibroblasten und glatten Muskelzellen beteiligt zu sein scheint. Ebenso wurde in dieser Arbeit beobachtet, daß im Rahmen der oxLDL stimulierten Proliferation sowohl ein Anstieg von Zellzyklusaktivatoren als auch von Inhibitoren ( $p27^{Kip1}$ ) festzustellen war (Zettler, Prociuk et al. 2003). Dieses zuerst kontrovers erscheinende Ergebnis im Vergleich zu den Resultaten unserer Arbeitsgruppe läßt sich vermutlich anhand der Versuchsdurchführung bezüglich Inkubationsdauer und verwendete Konzentrationen von oxLDL erklären. Eine vierstündige oxLDL Inkubation führt in allen Konzentrationen ( $1\mu\text{g}$ - $50\mu\text{g}$ ) zu einer Zellzyklusprogression durch verminderte  $p27^{Kip1}$  Expression in Endothelzellen, wogegen es nach einer 24 stündigen Inkubation mit höheren Konzentrationen von oxLDL zu einem zeitverzögerten Anstieg der  $p27^{Kip1}$  Expression kommt. Seibold postuliert dies als dualen Effekt von oxLDL bezüglich der  $p27^{Kip1}$  Expression und Zellzyklusprogression in HUVEC: Niedrige Konzentrationen von oxLDL verursachen eine persistierende Herabregulation von  $p27^{Kip1}$  resultierend in Proliferation von HUVEC, während höhere Konzentrationen zu einem zeitverzögerten  $p27^{Kip1}$  Anstieg führen, resultierend in zellulärer Hypertrophie.

Zettler et. al. inkubierten Fibroblasten mit 10 und  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  oxLDL für 24 und 48 Stunden und stellten mittels Westernblotanalysen eine oxLDL induzierte Expressionssteigerung von  $p27^{Kip1}$  fest. Diese Beobachtung deckt sich somit weitgehend mit früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe, die ebenso bei einer 24 stündigen Stimulation von HUVEC mit  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  oxLDL einen signifikanten Expressionsanstieg von  $p27^{Kip1}$  zeigten. Jedoch untersuchten Seibold et. al. wie oben beschrieben auch frühere Zeitpunkte der oxLDL Inkubation, wo eine signifikante  $p27^{Kip1}$  Suppression in humanen Endothelzellen nachzuweisen war.

RhoA interagiert mit zahlreichen Effektorproteinen, besonders zu erwähnen in diesem Zusammenhang ist die nachgeschaltete Rho-Kinase, welcher ebenso eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation zugeschrieben wird. Um zu überprüfen ob oxLDL über diesen RhoA/Rho-Kinase Signalweg Endothelzellproliferation induziert setzten wir den Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 ein.

#### **6.4 Rho-Kinase Hemmung inhibiert nicht vollständig die oxLDL induzierte Proliferation in HUVEC**

Rho-Kinase, auch als ROCK2 bezeichnet, ist ein RhoA nachgeschaltetes Effektorprotein, das eine bedeutende Rolle bei der Kontraktion glatter Muskelzellen und Endothelzellen, der Entstehung endothelialer Dysfunktion, als auch bei der Zytokinese insbesondere der G1-S-Phase Progression spielt. Der Rho/Rho-Kinase Signalweg erregte unlängst große Aufmerksamkeit, vor allem in kardiovaskulären Forschungsgebieten, weil diese Signalkaskade an vielen Zellfunktionen beteiligt ist, die bei der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen von Bedeutung sind. So dient beispielsweise die Rho-Kinase induzierte Streifaserbildung verschiedenen Transkriptionsfaktoren als Transporthilfe. Dies könnte auch im Zusammenhang mit der modulierenden Wirkung von Rho-Kinase auf die Zellproliferation stehen. Gesteigerte Transportvorgänge und Zytoskelettorganisationen können Ursachen für verstärkte Proliferation sein (Wettschureck and Offermanns 2002). Die Mechanismen über die ROCK2 die Zellzyklusprogression beeinflusst, wurden bisher aber noch nicht genauer charakterisiert.

Wir untersuchten den Einfluß des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 im Hinblick auf die oxLDL vermittelte Zellproliferation. Y27632 bindet in der ATP-Bindungstasche von ROCK2 und hemmt das Enzym kompetitiv (Uehata, Ishizaki et al. 1997). Durch die Versuche war festzustellen, daß die Rho-Kinase Hemmung zu einer reduzierten proliferativen Wirkung von oxLDL auf HUVEC führt. Y27632-behandelte Endothelzellen zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen eine signifikante Verminderung der Proliferationsrate. Die maximale Proliferationsantwort in Kontrollzellen betrug  $200 \pm 12\%$ , während Y27632 behandelte Zellen eine maximale Proliferationsrate von  $166 \pm 19\%$  aufwies ( $p \leq 0,05$ ).

Vergleicht man nun die beiden Ergebnisse, erstens, die Auswirkungen der RhoA Hemmung und zweitens die Auswirkungen der Rho-Kinase Hemmung, auf die oxLDL vermittelte Endothelzellproliferation, fällt auf, daß Y27632 die oxLDL induzierte Proliferationsantwort in HUVEC nicht vollständig inhibiert, im Gegensatz zur RhoA-Hemmung via Transfektion von RhoA N19 in HUVEC. Diese Beobachtung könnte durch Studien erklärt werden, die eine zusätzliche Rolle der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) in der RhoA vermittelten p27<sup>Kip1</sup> Suppression und Zellzyklusprogression nachweisen konnten (Seasholtz, Zhang et al. 2001). Die Suppression von p27<sup>Kip1</sup> wird sowohl durch die Expression von der aktiven RhoA-Mutante, L63RhoA, oder aber auch von der membranlokalisierten PI3K bewirkt. Zusätzlich verhindert Wortmannin und LY294009 (spezifische PI3K-Inhibitoren) die L63RhoA induzierte Expressionsverminderung von p27<sup>Kip1</sup>, darauf hinweisend, daß PI3K ein nachgeschalteter Mediator von RhoA Effekten darstellt. Über welche Mechanismen PI3K die Expression von p27<sup>Kip1</sup> reguliert, ist auch Gegenstand anderweitiger Forschungsarbeiten (Pagano, Tam et al. 1995; Medema, Kops et al. 2000).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bieten Roovers und Assoian, die 2003 zeigten, daß Rho-Kinase unabhängige Effektoren von RhoA die Aktivierung des CyclinE/CDK2 Komplexes und somit auch p27<sup>Kip1</sup> regulieren, während Rho-Kinase hauptsächlich die CyclinD/CDK4 Aktivität über eine ERK (extracellular signal-related kinase) abhängige CyclinD Expression beeinflusst (Roovers and Assoian 2003). Aufgrund dieser Resultate könnte man vermuten, daß RhoA die p27<sup>Kip1</sup> Expression beispielsweise über den oben beschriebenen PI3K Signalweg reguliert, wogegen Rho-Kinase über CyclinD Expression Einfluß auf die Zellzyklusprogression nimmt und dadurch die geringer ausgeprägte Inhibition der oxLDL induzierten Proliferationsantwort durch Rho-Kinase Hemmung zu erklären ist.

## 6.5 Therapeutische Ansätze

Der Rho/Rho-Kinase Signalweg vermittelt viele Funktionen in wichtigen Bereichen der Herz-Kreislauf-Physiologie. Dysregulationen des Rho/Rho-Kinase Signalwegs spielen daher eine bedeutende Rolle in der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie KHK, Hypertonie und Atherosklerose. Inhibitoren bieten somit eine Vielzahl klinischer Anwendungsmöglichkeiten. Vor allem Rho-Kinase-Inhibitoren, sind derzeit

Gegenstand zahlreicher Studien, da sie als neue Therapiemöglichkeit zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen verstanden werden.

Zur Therapie der Herz-Kreislaufkrankungen steht eine Vielzahl medikamentöser Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Die Wirkstoffklasse der Statine hat sich in der Vergangenheit besonders hervorgetan. Großstudien unter HMG-CoA-Reduktasehemmern konnten sowohl in der Sekundärprävention (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group 1994; Sacks, Pfeffer et al. 1996; LIPID Study Group 1998), wie auch in der Primärprävention (Shepherd, Cobbe et al. 1995; Downs, Clearfield et al. 1998) in der Langzeittherapie eine deutliche Senkung von kardiovaskulärer und gesamter Mortalität aufzeigen. In neueren Studien wurde der Nutzen einer Statin-Therapie auch bei niedrigen oder normalen Cholesterinwerten belegt (Heart Protection Study Group 2002). Neben ihrer cholesterinsenkenden Eigenschaft, werden Statinen auch weitere, sogenannte pleiotrope Effekte nachgesagt. Diese positive therapeutische Wirkung von Statinen auf Endothelfunktion, Thrombozytenaggregation, sowie Plaquereduktion und Plaquestabilisierung werden auf die Interaktion mit dem Mevalonsäurestoffwechsel zurückgeführt. Durch die Hemmung der Cholesterolsynthese auf der Stufe des 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A wird nicht nur die Bildung des Endprodukts Cholesterin, sondern auch die vieler Intermediate, wie z.B. Farnesyl-, und Geranylgeranylphosphat unterdrückt. Diese Intermediate sind wichtig für post-translatorische Modifikationen von Signalproteinen, wie z.B. RhoA. Somit kann RhoA nicht mehr isoprenyliert werden, und ist in seiner Funktion gehemmt, was ebenso eine reduzierte Rho-Kinase Aktivität nach sich zieht (Takemoto, Sun et al. 2002). So können viele Effekte von Statinen auf die Hemmung des Rho/Rho-Kinase Signalweges zurückgeführt werden.

Die endothelprotektive Wirkung von Statinen wird wahrscheinlich durch eine erhöhte eNOS (endotheliale NO-Synthase) Expression über Hemmung der Rho-Kinase vermittelt (Laufs and Liao 1998). Auch die Plaquestabilisierung durch Statine könnte auf Proliferationshemmung und Senkung der inflammatorischen Zytokine infolge von RhoA/Rho-Kinase Hemmung zurückgehen (Laufs, Marra et al. 1999). Wichtig in diesem Zusammenhang scheint ebenso eine abnehmende Makrophagenakkumulation und Inhibition der MMP (Matrix-Metalloproteinasen) in atherosklerotischen Läsionen zu sein (Aikawa, Rabkin et al. 2001). Diese pleiotropen Effekte von Statinen zeigen, daß Rho-Kinase Inhibitoren eine geeignete Alternative oder eine

Kombinationsmöglichkeit zu Statinen in der Prävention von Atherosklerose darstellen könnten.

Rho-Kinase-Inhibitoren bieten breite pharmakologische Eigenschaften, die viele kardiovaskuläre Medikamente abdecken würden, außer der lipidsenkenden Wirkung von Statinen. In verschiedenen zellbasierenden Analysen und Tiermodellen wurden die positiven Wirkungen der Rho-Kinase-Hemmer auf Vasospasmen (Koronararterien und Cerebralarterien), Schlaganfall, Hypertonie, pulmonale Hypertonie und Atherosklerose nachgewiesen. Es wurde gezeigt, daß Y27632 die Thrombin-induzierte DNA-Synthese in glatten Gefäßmuskelzellen reduziert (Seasholtz, Majumdar et al. 1999) und dadurch in vivo zur Unterdrückung der Neointimabildung nach Gefäßverletzungen führen und damit die Entstehung entzündlicher Prozesse und atherosklerotische Plaques reduzieren könnte (Sawada, Itoh et al. 2000; Mukai, Shimokawa et al. 2001).

Diese Untersuchungen unterstreichend, konnte Mallat et. al. 2003 nachweisen, daß nach einer neun-wöchigen Therapie mit Y27632 eine signifikante 35 %-ige Reduktion der Läsionsgröße von atherosklerotischen Plaques (in Aorten von Mäusen) aufgetreten ist. Als weiteres Beispiel reduziert Fasudil die neointimale Formation nach Stenteinlage durch multiple Mechanismen wie Suppression der Gefäßentzündung und Proliferation, als auch Erhöhung der Apoptoserate (Matsumoto, Uwatoku et al. 2004).

Klinische Studien müssen nun die Wirksamkeit und Sicherheit der Substanzen beim Menschen nachweisen. Eine Phase II Studie von Shimokawa et. al. 2002 zeigte einen antianginösen Effekt und Leistungsverbesserung durch chronische Behandlung mit Fasudil (momentan einziger klinischer Rho-Kinase-Inhibitor) bei Patienten mit stabiler Angina pectoris (Shimokawa, Hiramori et al. 2002). Eine in Japan durchgeführte Phase-III-Studie untersuchte die Effektivität von Fasudil zur Behandlung des akuten cerebralen Infarkts und demonstrierte, daß dieser Rho-Kinase-Hemmer günstige Auswirkungen auf neuronale Schädigungen ohne ernste Nebenwirkungen hat (Shibuya, Hirai et al. 2005). Dennoch fehlen bisher Langzeitstudien die Effekte und Sicherheit von Rho-Kinase-Inhibitoren bestätigen. In der heutigen Zeit, in der die Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen stetig ansteigt, werden Wirkstoffklassen mit innovativem Wirkmechanismus gefordert. Durch die kombinierte Wirkung auf Blutdruck, Proliferation, Blutgerinnung und Fettstoffwechsel stellt diese Wirkstoffklasse ein neuartiges Therapiekonzept für Risikopatienten dar. Patienten mit

zwei, drei oder mehreren Medikamenten könnten besonders von z.B. Fasudil profitieren.

Die Ergebnisse aus der vorgelegten Arbeit untermauern, dass der RhoA/RhoKinase Signalweg ein effektives Target für die medikamentöse Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen sein könnte.

## 7. Zusammenfassung

Zellproliferation stellt einen integralen Bestandteil der Plaquentstehung und somit der Atherosklerose dar. Zahlreiche Studien belegen, daß oxidativ verändertes LDL eine Schlüsselrolle in diesem Pathomechanismus spielt. Neben einer Reihe von proatherogenen Eigenschaften, vermag oxLDL die Zellzyklusregulation insbesondere über den Zyklinkinaseinhibitors  $p27^{kip1}$  zu beeinflussen. Als wichtigen Regulator der Zellproliferation wurde die kleine GTPase RhoA identifiziert.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit die oxLDL induzierte Expressionsminderung des Zyklinkinaseinhibitors  $p27^{kip1}$  sowie Zellproliferation über eine Aktivierung des RhoA/Rho-Kinase Signalwegs untersucht werden. Die Aktivierung von RhoA in HUVEC durch oxLDL sollte mittels immunhistochemischem Nachweisverfahren sichtbar gemacht werden. Weiterhin war interessant welche Rolle RhoA in der Signaltransduktion von oxLDL-Wirkungen spielt. Aus diesem Grund und um die Wirkung von RhoA analysieren zu können verwendeten wir die inaktive RhoA N19-Mutante und untersuchten sowohl die Auswirkung der RhoA-Hemmung auf die oxLDL induzierte Zellproliferation als auch auf die oxLDL induzierte  $p27^{kip1}$  Suppression. Zusätzlich sollten die Auswirkungen der Hemmung des nachgeschalteten Effektorproteins von RhoA nämlich Rho-Kinase mittels Y27632 auf die oxLDL-vermittelte Zellproliferation dargestellt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß oxLDL RhoA zu stimulieren vermag, indem die Translokation von RhoA aus dem Zytosol in die Plasmamembran, als Marker für die Aktivierung von RhoA nach oxLDL Stimulation sichtbar gemacht werden konnte. Die deutlichste Translokation von RhoA wurde nach 5 minütiger oxLDL Inkubation nachgewiesen. Die Hemmung der RhoA Aktivierung durch Transfektion einer dominant negativen RhoA N19 Mutante verdeutlichte, daß sowohl die oxLDL induzierte  $p27^{kip1}$  Suppression in HUVEC als auch die oxLDL induzierte Proliferation auf die oxLDL vermittelte RhoA Aktivierung angewiesen sind. In Endothelzellen, welche nur mit dem Leervektor pcDNA3 transfiziert waren (Kontrolle), bestätigte sich nach einer vierstündigen oxLDL Inkubation wie in den früheren Untersuchungen eine signifikante Expressionsverminderung von  $p27^{kip1}$  um ca. 66%. Im Gegensatz dazu konnte in Zellen, die mit der dominant-negativen RhoA N19 Mutante transfiziert waren keine  $p27^{kip1}$  Suppression festgestellt werden. Ebenso zeigte sich in MTT-Assays bei

Zellen mit der inaktiven RhoA N19 Mutante eine nahezu vollständig fehlende Proliferationsantwort im Vergleich zu Kontrollzellen (113 + 6 % versus 206 + 13 %,  $p \leq 0,05$  ). Im Anschluß daran, wurde in weiteren MTT-Assays die oxLDL induzierte Proliferation unter der Verwendung des Rho-Kinase Inhibitors Y27632 untersucht und eine signifikant reduzierte Proliferationsrate von 166 + 19 % im Vergleich zu Kontrollzellen 200 + 12 % nachgewiesen ( $p \leq 0,05$ ). Dieses Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, daß neben dem nachgeschaltetem Effektorprotein Rho-Kinase, die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) in der RhoA vermittelten p27<sup>Kip1</sup> Suppression und Zellzyklusprogression eine zusätzliche Rolle zu spielen scheint.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sowohl die oxLDL induzierte Expressionsverminderung von p27<sup>Kip1</sup> in HUVEC und somit die Zellprogression als auch die oxLDL induzierte Endothelproliferation auf die oxLDL vermittelte RhoA Aktivierung angewiesen ist. Diese Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit untermauern, daß der RhoA/Rho-Kinase Signalweg ein neuer therapeutischer bzw. medikamentöser Ansatz bei kardiovaskulären Erkrankungen sein könnte.

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

AEBSF	Aminoäthyl-benzolsulfofluorid
Apo B-100	Apolipoprotein B-100
ATP	Adenosintriphosphat
CDK	Cyclin-dependent-kinase
CRP	C-reaktives Protein
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonucleic acid
EBM	Endothelial cell basal medium
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylene-Diamin-Tetra-Essigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular signal-related-kinase
FCS	Fetal calf serum
GAP	GTPase activating proteins
GDI	Guanine nucleotide dissociation inhibitors
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanidine exchange factors
GPCR	G-protein coupled receptor
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	High density lipoprotein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IDL	Intermediate density lipoprotein
IL-1	Interleukin 1
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein

---

LPA	Lysophosphatidylsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin
MCP-1	Monozyte-chemoattractant-protein 1
M-CSF	Monozyte-colony-stimulating-factor
MLC	Myosinleichtketten
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazid-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
OH	Hydroxyl-Radikal
oxLDL	oxidiertes low density lipoprotein
PBS	Phosphat buffered saline
PDGF	Platelet-derived-growth-factor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reactive oxygen species
TF	Tissue factor
TNF $\alpha$	Tumor-necrosis factor alpha
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	Very low density lipoprotein

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

### **Abb.1:**

Schematische Darstellung der Atherogenese: Initiation

### **Abb.2:**

Schematische Darstellung der Atherogenese: Ruptur der fibrösen Kappe

### **Abb.3:**

Überblick über die verschiedenen Zellzyklusphasen

### **Abb.4:**

OxLDL induzierte Translokation von aktiviertem RhoA in humanen Nabelvenen Endothelzellen (Immunhistochemie)

### **Abb.5:**

Nachweis der Überexpression von RhoA N19

### **Abb.6:**

Nachweis einer fehlenden oxLDL induzierten Expressionverminderung von p27<sup>Kip1</sup> durch RhoA-Hemmung in humanen Nabelvenen Endothelzellen (Westernblot)

### **Abb.7:**

Nachweis einer fehlenden oxLDL induzierten Proliferation durch RhoA-Hemmung in humanen Nabelvenen Endothelzellen (MTT-Assay)

### **Abb.8:**

Nachweis der reduzierten oxLDL induzierten Proliferation durch Rho-Kinase-Hemmung in humanen Nabelschnurvenen Endothelzellen (MTT-Assay)

## 9. Literatur

- Aikawa, M., E. Rabkin, S. Sugiyama, S. J. Voglic, Y. Fukumoto, Y. Furukawa, M. Shiomi, F. J. Schoen and P. Libby** (2001). "An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro." Circulation 103(2): 276-83.
- Auge, N., G. Fitoussi, J. L. Bascands, M. T. Pieraggi, D. Junquero, P. Valet, J. P. Girolami, R. Salvayre and A. Negre-Salvayre** (1996). "Mildly oxidized LDL evokes a sustained Ca(2+)-dependent retraction of vascular smooth muscle cells." Circ Res 79(4): 871-80.
- Auge, N., V. Garcia, F. Maupas-Schwalm, T. Levade, R. Salvayre and A. Negre-Salvayre** (2002). "Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways." Arterioscler Thromb Vasc Biol 22(12): 1990-5.
- Auge, N., F. Maupas-Schwalm, M. Elbaz, J. C. Thiers, A. Waysbort, S. Itoharu, H. W. Krell, R. Salvayre and A. Negre-Salvayre** (2004). "Role for matrix metalloproteinase-2 in oxidized low-density lipoprotein-induced activation of the sphingomyelin/ceramide pathway and smooth muscle cell proliferation." Circulation 110(5): 571-8.
- Belkner, J., H. Stender and H. Kuhn** (1997). "15-Lipoxygenase preferentially oxygenates a subfraction of human low density lipoprotein." Adv Exp Med Biol 407: 465-9.
- Bishop, A. L. and A. Hall** (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." Biochem J 348 Pt 2: 241-55.
- Coso, O. A., M. Chiariello, J. C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki and J. S. Gutkind** (1995). "The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway." Cell 81(7): 1137-46.
- Darley-Usmar, V. M., N. Hogg, V. J. O'Leary, M. T. Wilson and S. Moncada** (1992). "The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein." Free Radic Res Commun 17(1): 9-20.
- Daugherty, A., J. L. Dunn, D. L. Rateri and J. W. Heinecke** (1994). "Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions." J Clin Invest 94(1): 437-44.
- Downs, J. R., M. Clearfield, S. Weis, E. Whitney, D. R. Shapiro, P. A. Beere, A. Langendorfer, E. A. Stein, W. Kruyer and A. M. Gotto, Jr.** (1998). "Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study." Jama 279(20): 1615-22.

- Dzau, V. J., R. C. Braun-Dullaeus and D. G. Sedding** (2002). "Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies." Nat Med 8(11): 1249-56.
- Elledge, S. J.** (1996). "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis." Science 274(5293): 1664-72.
- Ellis, S. and H. Mellor** (2000). "The novel Rho-family GTPase *rif* regulates coordinated actin-based membrane rearrangements." Curr Biol 10(21): 1387-90.
- Feig, L. A.** (1999). "Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases." Nat Cell Biol 1(2): E25-7.
- Fogliatto, G., R. Musanti, A. Pirillo and G. Ghiselli** (1995). "Oxidized lipoproteins induce long-lasting inhibition of nitric oxide synthase from a murine endothelioma cell line (bEnd.4)." J Cardiovasc Risk 2(2): 123-30.
- Funakoshi, Y., T. Ichiki, H. Shimokawa, K. Egashira, K. Takeda, K. Kaibuchi, M. Takeya, T. Yoshimura and A. Takeshita** (2001). "Rho-kinase mediates angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells." Hypertension 38(1): 100-4.
- Galle, J. and E. Bassenge** (1991). "Effects of native and oxidized low-density lipoproteins on endothelium-dependent and endothelium-independent vasomotion." Basic Res Cardiol 86 Suppl 2: 127-42.
- Galle, J., A. Heinloth, C. Wanner and K. Heermeier** (2001). "Dual effect of oxidized LDL on cell cycle in human endothelial cells through oxidative stress." Kidney Int Suppl 78: S120-3.
- Galle, J., A. Mameghani, S. S. Bolz, S. Gambaryan, M. Gorg, T. Quaschnig, U. Raff, H. Barth, S. Seibold, C. Wanner and U. Pohl** (2003). "Oxidized LDL and its compound lysophosphatidylcholine potentiate AngII-induced vasoconstriction by stimulation of RhoA." J Am Soc Nephrol 14(6): 1471-9.
- Galle, J., R. Schneider, A. Heinloth, C. Wanner, P. R. Galle, E. Conzelmann, S. Dimmeler and K. Heermeier** (1999). "Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress." Kidney Int 55(4): 1450-61.
- Geyer, M. and A. Wittinghofer** (1997). "GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins." Curr Opin Struct Biol 7(6): 786-92.
- Gong, M. C., H. Fujihara, A. V. Somlyo and A. P. Somlyo** (1997). "Translocation of rhoA associated with Ca<sup>2+</sup> sensitization of smooth muscle." J Biol Chem 272(16): 10704-9.
- Griendling, K. K. and G. A. FitzGerald** (2003). "Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS." Circulation 108(16): 1912-6.
- Halliwell, B.** (1993). "The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system." Haemostasis 23 Suppl 1: 118-26.

- Hart, M. J., X. Jiang, T. Kozasa, W. Roscoe, W. D. Singer, A. G. Gilman, P. C. Sternweis and G. Bollag** (1998). "Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13." Science 280(5372): 2112-4.
- Heart Protection Study Group** (2002). "MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial." Lancet 360(9326): 7-22.
- Heinloth, A., B. Brune, B. Fischer and J. Galle** (2002). "Nitric oxide prevents oxidised LDL-induced p53 accumulation, cytochrome c translocation, and apoptosis in macrophages via guanylate cyclase stimulation." Atherosclerosis 162(1): 93-101.
- Heinloth, A., K. Heermeier, U. Raff, C. Wanner and J. Galle** (2000). "Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells." J Am Soc Nephrol 11(10): 1819-25.
- Hengst, L. and S. I. Reed** (1998). "Inhibitors of the Cip/Kip family." Curr Top Microbiol Immunol 227: 25-41.
- Hirai, A., S. Nakamura, Y. Noguchi, T. Yasuda, M. Kitagawa, I. Tatsuno, T. Oeda, K. Tahara, T. Terano, S. Narumiya, L. D. Kohn and Y. Saito** (1997). "Geranylgeranylated rho small GTPase(s) are essential for the degradation of p27Kip1 and facilitate the progression from G1 to S phase in growth-stimulated rat FRTL-5 cells." J Biol Chem 272(1): 13-6.
- Hirumura, K., J. W. Pippin, M. L. Fero, J. M. Roberts and S. J. Shankland** (1999). "Modulation of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1)." J Clin Invest 103(5): 597-604.
- Hu, W., C. J. Bellone and J. J. Baldassare** (1999). "RhoA stimulates p27(Kip) degradation through its regulation of cyclin E/CDK2 activity." J Biol Chem 274(6): 3396-401.
- Ishizaki, T., M. Maekawa, K. Fujisawa, K. Okawa, A. Iwamatsu, A. Fujita, N. Watanabe, Y. Saito, A. Kakizuka, N. Morii and S. Narumiya** (1996). "The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase." Embo J 15(8): 1885-93.
- Kjoller, L. and A. Hall** (1999). "Signaling to Rho GTPases." Exp Cell Res 253(1): 166-79.
- Kockx, M. M., G. R. De Meyer, J. Muhring, W. Jacob, H. Bult and A. G. Herman** (1998). "Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques." Circulation 97(23): 2307-15.
- Kureishi, Y., S. Kobayashi, M. Amano, K. Kimura, H. Kanaide, T. Nakano, K. Kaibuchi and M. Ito** (1997). "Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation." J Biol Chem 272(19): 12257-60.
- Laufs, U. and J. K. Liao** (1998). "Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase." J Biol Chem 273(37): 24266-71.

- Laufs, U., D. Marra, K. Node and J. K. Liao** (1999). "3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1)." J Biol Chem 274(31): 21926-31.
- Libby, P.** (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature 420(6917): 868-74.
- LIPID Study Group** (1998). "Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group." N Engl J Med 339(19): 1349-57.
- Madamanchi, N. R., A. Vendrov and M. S. Runge** (2005). "Oxidative stress and vascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol 25(1): 29-38.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, S. Boku, N. Watanabe, A. Fujita, A. Iwamatsu, T. Obinata, K. Ohashi, K. Mizuno and S. Narumiya** (1999). "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." Science 285(5429): 895-8.
- Martens, J. S., N. E. Reiner, P. Herrera-Velit and U. P. Steinbrecher** (1998). "Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein." J Biol Chem 273(9): 4915-20.
- Matsumoto, Y., T. Uwatoku, K. Oi, K. Abe, T. Hattori, K. Morishige, Y. Eto, Y. Fukumoto, K. Nakamura, Y. Shibata, T. Matsuda, A. Takeshita and H. Shimokawa** (2004). "Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses neointimal formation after stent implantation in porcine coronary arteries: involvement of multiple mechanisms." Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(1): 181-6.
- Medema, R. H., G. J. Kops, J. L. Bos and B. M. Burgering** (2000). "AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1." Nature 404(6779): 782-7.
- Mohazzab, H. K., P. M. Kaminski and M. S. Wolin** (1997). "Lactate and PO<sub>2</sub> modulate superoxide anion production in bovine cardiac myocytes: potential role of NADH oxidase." Circulation 96(2): 614-20.
- Morgan, D. O.** (1995). "Principles of CDK regulation." Nature 374(6518): 131-4.
- Mukai, Y., H. Shimokawa, T. Matoba, T. Kandabashi, S. Satoh, J. Hiroki, K. Kaibuchi and A. Takeshita** (2001). "Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension." Faseb J 15(6): 1062-4.
- Nakashima, Y., E. W. Raines, A. S. Plump, J. L. Breslow and R. Ross** (1998). "Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse." Arterioscler Thromb Vasc Biol 18(5): 842-51.
- Pagano, M., S. W. Tam, A. M. Theodoras, P. Beer-Romero, G. Del Sal, V. Chau, P. R. Yew, G. F. Draetta and M. Rolfe** (1995). "Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27." Science 269(5224): 682-5.

- Pardee, A. B.** (1989). "G1 events and regulation of cell proliferation." Science 246(4930): 603-8.
- Pryor, W. A. and G. L. Squadrito** (1995). "The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide." Am J Physiol 268(5 Pt 1): L699-722.
- Rajavashisth, T. B., A. Andalibi, M. C. Territo, J. A. Berliner, M. Navab, A. M. Fogelman and A. J. Lusis** (1990). "Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins." Nature 344(6263): 254-7.
- Roovers, K. and R. K. Assoian** (2003). "Effects of rho kinase and actin stress fibers on sustained extracellular signal-regulated kinase activity and activation of G(1) phase cyclin-dependent kinases." Mol Cell Biol 23(12): 4283-94.
- Ross, R.** (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." Nature 362(6423): 801-9.
- Sacks, F. M., M. A. Pfeffer, L. A. Moye, J. L. Rouleau, J. D. Rutherford, T. G. Cole, L. Brown, J. W. Warnica, J. M. Arnold, C. C. Wun, B. R. Davis and E. Braunwald** (1996). "The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators." N Engl J Med 335(14): 1001-9.
- Sawada, N., H. Itoh, K. Ueyama, J. Yamashita, K. Doi, T. H. Chun, M. Inoue, K. Masatsugu, T. Saito, Y. Fukunaga, S. Sakaguchi, H. Arai, N. Ohno, M. Komeda and K. Nakao** (2000). "Inhibition of rho-associated kinase results in suppression of neointimal formation of balloon-injured arteries." Circulation 101(17): 2030-3.
- Scandinavian Simvastatin Survival Study Group** (1994). "Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)." Lancet 344(8934): 1383-9.
- Seasholtz, T. M., M. Majumdar, D. D. Kaplan and J. H. Brown** (1999). "Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration." Circ Res 84(10): 1186-93.
- Seasholtz, T. M., T. Zhang, M. R. Morissette, A. L. Howes, A. H. Yang and J. H. Brown** (2001). "Increased expression and activity of RhoA are associated with increased DNA synthesis and reduced p27(Kip1) expression in the vasculature of hypertensive rats." Circ Res 89(6): 488-95.
- Seibold, S., D. Schurle, A. Heinloth, G. Wolf, M. Wagner and J. Galle** (2004). "Oxidized LDL induces proliferation and hypertrophy in human umbilical vein endothelial cells via regulation of p27Kip1 expression: role of RhoA." J Am Soc Nephrol 15(12): 3026-34.
- Shackelford, R. E., W. K. Kaufmann and R. S. Paules** (2000). "Oxidative stress and cell cycle checkpoint function." Free Radic Biol Med 28(9): 1387-404.
- Sheaff, R. J., M. Groudine, M. Gordon, J. M. Roberts and B. E. Clurman** (1997). "Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1." Genes Dev 11(11): 1464-78.

- Shepherd, J., S. M. Cobbe, I. Ford, C. G. Isles, A. R. Lorimer, P. W. MacFarlane, J. H. McKillop and C. J. Packard** (1995). "Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group." N Engl J Med 333(20): 1301-7.
- Shibuya, M., S. Hirai, M. Seto, S. Satoh and E. Ohtomo** (2005). "Effects of fasudil in acute ischemic stroke: results of a prospective placebo-controlled double-blind trial." J Neurol Sci 238(1-2): 31-9.
- Shimokawa, H., K. Hiramori, H. Iinuma, S. Hosoda, H. Kishida, H. Osada, T. Katagiri, K. Yamauchi, Y. Yui, T. Minamino, M. Nakashima and K. Kato** (2002). "Anti-anginal effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina: a multicenter study." J Cardiovasc Pharmacol 40(5): 751-61.
- Sies, H.** (1991). "Role of reactive oxygen species in biological processes." Klin Wochenschr 69(21-23): 965-8.
- Siess, W., K. J. Zangl, M. Essler, M. Bauer, R. Brandl, C. Corrinth, R. Bittman, G. Tigyi and M. Aepfelbacher** (1999). "Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions." Proc Natl Acad Sci U S A 96(12): 6931-6.
- Steinberg, D., S. Parthasarathy, T. E. Carew, J. C. Khoo and J. L. Witztum** (1989). "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." N Engl J Med 320(14): 915-24.
- Steinbrecher, U. P.** (1987). "Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products." J Biol Chem 262(8): 3603-8.
- Takai, Y., T. Sasaki and T. Matozaki** (2001). "Small GTP-binding proteins." Physiol Rev 81(1): 153-208.
- Takemoto, M., J. Sun, J. Hiroki, H. Shimokawa and J. K. Liao** (2002). "Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase." Circulation 106(1): 57-62.
- Toyoshima, H. and T. Hunter** (1994). "p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21." Cell 78(1): 67-74.
- Uehata, M., T. Ishizaki, H. Satoh, T. Ono, T. Kawahara, T. Morishita, H. Tamakawa, K. Yamagami, J. Inui, M. Maekawa and S. Narumiya** (1997). "Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension." Nature 389(6654): 990-4.
- Velasco, G., C. Armstrong, N. Morrice, S. Frame and P. Cohen** (2002). "Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin." FEBS Lett 527(1-3): 101-4.
- Vignal, E., M. De Toledo, F. Comunale, A. Ladopoulou, C. Gauthier-Rouviere, A. Blangy and P. Fort** (2000). "Characterization of TCL, a new GTPase of the rho family related to TC10 and Ccdc42." J Biol Chem 275(46): 36457-64.

- Wettschureck, N. and S. Offermanns** (2002). "Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology." J Mol Med 80(10): 629-38.
- WHO** (1958). "CLASSIFICATION of atherosclerotic lesions; report of a study group." World Health Organ Tech Rep Ser 57(143): 1-20.
- Witztum, J. L.** (1991). "The role of oxidized LDL in atherosclerosis." Adv Exp Med Biol 285: 353-65.
- Xu, C. B., J. Hansen-Schwartz and L. Edvinsson** (2004). "Sphingosine signaling and atherogenesis." Acta Pharmacol Sin 25(7): 849-54.
- Yla-Herttuala, S., W. Palinski, M. E. Rosenfeld, S. Parthasarathy, T. E. Carew, S. Butler, J. L. Witztum and D. Steinberg** (1989). "Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man." J Clin Invest 84(4): 1086-95.
- Yokoyama, M., K. Hirata, R. Miyake, H. Akita, Y. Ishikawa and H. Fukuzaki** (1990). "Lysophosphatidylcholine: essential role in the inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by oxidized low density lipoprotein." Biochem Biophys Res Commun 168(1): 301-8.
- Zettler, M. E., M. A. Prociuk, J. A. Austria, H. Massaeli, G. Zhong and G. N. Pierce** (2003). "OxLDL stimulates cell proliferation through a general induction of cell cycle proteins." Am J Physiol Heart Circ Physiol 284(2): H644-53.
- Zhang, H., Y. Yang and U. P. Steinbrecher** (1993). "Structural requirements for the binding of modified proteins to the scavenger receptor of macrophages." J Biol Chem 268(8): 5535-42.

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jan Galle für die Bereitstellung des Themas und der Mittel für diese Arbeit herzlich bedanken.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Stefan Seibold gilt mein besonderer Dank, ohne dessen Anleitung, Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Auswertungen der Ergebnisse, die Erstellung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ebenso danke ich ihm für die konstruktive Korrektur meiner Arbeit.

Auch danke ich allen Mitarbeitern des nephrologischen Labors für die unermüdliche Hilfsbereitschaft bei den alltäglichen Problemen in der Laborarbeit. Insbesondere danke ich Elke Baumeister für die Einarbeitung in die Zellkulturtechniken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich stets in allen Lebenslagen unterstützt haben.

Last but not least danke ich meinem Freund Wadih für den großen Rückhalt, den er mir bietet.

## **Curriculum vitae**

### **Persönliche Daten**

Geburtsdatum: 07.04.1977  
Geburtsort: Pforzheim  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Konfession: evangelisch

### **Schulbildung**

1983 – 1993 Grundsschule und Realschule in Straubenhardt  
1993 – 1996 Gymnasium in Pforzheim  
1996 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### **Berufsausbildung**

04/1997 – 04/2000 Ausbildung zur Physiotherapeutin, staatlich anerkannte  
Schule für Physiotherapie, Karlsbad-Langensteinbach,  
Abschlussnote: 2,0  
04/2000 – 10/2006 Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-  
Universität Würzburg  
03/2002 Ärztliche Vorprüfung, Note: 3,0  
03/2003 Erstes Staatsexamen, Note: 2,0  
03/2005 Zweites Staatsexamen, Note: 1,66  
10/2006 Drittes Staatsexamen, Note: 1,0  
Gesamtnote: sehr gut  
Seit 03/2007 Assistenzärztin im Fachgebiet Neurologie, im Städtischen  
Klinikum Karlsruhe