

Universitätsklinikum Ulm  
Abteilung Innere Medizin II  
unter der Leitung von  
Prof. Dr. Vinzenz Hombach

**Die Wirkung von C-Peptid auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen des  
Menschen und der Ratte**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt  
von  
Christina Babiak  
geboren in Neu-Ulm

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. K.-M. Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. N. Marx

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schelzig

Tag der Promotion: 24.04.2009

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>   | <b>I</b>  |
| <b>1 Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Atherosklerose   | 1         |
| 1.2 SMCs   | 5         |
| 1.3 Diabetes mellitus und Insulinresistenz   | 8         |
| 1.4 C-Peptid   | 11        |
| 1.5 Wirkung des C-Peptids auf verschiedene Schritte der Atherogenese   | 14        |
| 1.6 Fragestellungen  | 16        |
| <b>2 Material und Methodik</b>   | <b>17</b> |
| 2.1 Material   | 17        |
| 2.2 Methodik   | 21        |
| 2.3 Auswertung   | 28        |
| <b>3 Ergebnisse</b>  | <b>29</b> |
| 3.1 Effekt des C-Peptids auf die Proliferation SMCs der Ratte  | 29        |
| 3.2 Effekt verschiedener Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion auf die durch C-Peptid induzierte Proliferation von SMCs der Ratte                 | 31        |
| 3.3 Effekt des C-Peptids auf die Proliferation humaner SMCs  | 36        |
| 3.4 Effekt verschiedener Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion auf die durch humanes C-Peptid stimulierte Proliferation von humanen aortalen SMCs | 38        |
| 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse   | 42        |
| <b>4 Diskussion</b>  | <b>44</b> |
| 4.1 Induktion der Proliferation von SMCs durch C-Peptid  | 44        |
| 4.2 Intrazelluläre Signalwege  | 48        |
| 4.3 Vergleich der Effekte auf die Proliferation durch C-Peptid in Zellen des Menschen und der Ratte  | 53        |
| 4.4 Schlussfolgerungen   | 55        |
| <b>5 Zusammenfassung</b>   | <b>57</b> |
| <b>6 Literaturverzeichnis</b>  | <b>59</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |   |
|-------------------|---|
| [ <sup>3</sup> H] | Tritium   |
| µg                | Mikrogramm  |
| µl                | Mikroliter  |
| µmol              | Mikromol  |
| AGE               | Advanced glycation end product  |
| AKT               | Proteinkinase B   |
| ATP               | Adenosintriphosphat   |
| Ca                | Kalzium   |
| CD                | Cluster of differentiation  |
| CO <sub>2</sub>   | Kohlendioxid  |
| C-Peptid          | Connecting peptide  |
| DMEM              | Dulbecco's Modified Eagle<br>Medium                                   |
| DNS               | Desoxyribonukleinsäure  |
| Dpm               | Disintegrations per minute  |
| EGF               | Epidermal growth factor   |
| ERK               | Extracellular-signal regulated<br>kinase                              |
| FCS               | Fetal calf serum  |
| FGF               | Fibroblast growth factor  |
| HDL               | High density lipoprotein  |
| IGF               | Insulin-like growth factor  |
| IL                | Interleukin   |
| JNK               | c-Jun N-terminale Kinase  |
| L                 | Liter   |
| LDL               | Low density lipoprotein   |
| LY 294,002        | 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-<br>1(4H)-benzopyran-4-one<br>Hydrochlorid |
| MAP-Kinase        | Mitogen-activated protein-<br>Kinase                                  |
| MAPKK             | MAP-Kinase-Kinase   |

|             |  |
|-------------|--|
| ml          | Milliliter   |
| N           | Normal   |
| Na-K-ATPase | Natrium-Kalium-ATPase  |
| ng          | Nanogramm  |
| nmol        | Nanomol  |
| NO          | Stickstoffmonoxid  |
| PBS         | Phosphate buffered saline  |
| PD 98,059   | 2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-<br>4H-1-benzopyran-4-one                            |
| PDGF        | Platelet derived growth factor   |
| PI3-Kinase  | Phosphoinositol-3-Kinase   |
| PKC         | Proteinkinase C  |
| PLC         | Phospholipase C  |
| PP2         | 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-<br>(t-butyl)pyrazolo[3,4-<br>d]pyrimidine          |
| PSG         | Penicillin, Streptomycin und<br>Glutamin   |
| PTX         | Pertussistoxin   |
| rpm         | Rounds per minute  |
| SB 203580   | 4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-<br>methylsulfinylphenyl)-5-(4-<br>pyridyl)-1H-imidazole |
| SMC         | Smooth muscle cell   |
| S-Phase     | Synthese-Phase   |
| TGF         | Transforming growth factor   |
| TH          | T-Helferzelle  |
| TNF         | Tumor-Nekrose-Faktor   |
| VSMC        | Vascular smooth muscle cell  |

# **1 Einleitung**

## **1.1 Atherosklerose**

Unter Atherosklerose versteht man eine variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia. [56]

Atherosklerose wird heute als entzündlich-fibroproliferative Anpassungsreaktion der Intima der arteriellen Gefäßwand auf eine Wandschädigung verstanden. [58]

Sie geht einher mit einem fibrotisch verhärtenden Umbau der Arterienwand, der zu einer Verdickung, Verhärtung und zu einem Elastizitätsverlust der Gefäßwand sowie zu Gefäßstenosen führt.

In gewissem Umfang ist die Entwicklung einer solchen Gefäßwandsklerose als Teilphänomen des normalen Alterungsprozesses zu sehen. Die gesteigerten Formen stellen den eigentlichen pathologischen Prozeß dar. [56]

Zunächst ist die Atherosklerose nur eine lokal pathologische Veränderung der Gefäßwand. Klinisch relevant wird sie durch Unterbrechung der Blutversorgung, wenn die atherosklerotische Plaque das Gefäßlumen einengt, oder akut eine Komplikation durch Plaqueruptur mit einem entstehenden Thrombus auftritt.

Weitere klinisch relevante Pathomechanismen sind die gestörte Regulation der Gefäßweite und die Auflockerung der Gefäßwand mit Aneurysmabildung. [11]

Somit stellt die Atherosklerose das pathologische Korrelat für die koronare Herzkrankheit, zerebrale Ischämien sowie die periphere arterielle Verschlusskrankheit dar. [43]

Im Verlauf unterscheidet man folgende Ausprägungen:

Den zentrifugalen senilen Typ und den multifokalen juvenilen Typ bei primären und sekundären Störungen des Lipoproteinstoffwechsels. Ein Beginn in der Peripherie mit rascher diffuser Ausdehnung ist typisch für die diabetische Makroangiopathie. [56]

Die Atherosklerose manifestiert sich hauptsächlich in großen und mittleren Arterien vom elastischen und muskulären Typ und tritt bevorzugt an Gefäßabgängen, Gefäßaufzweigungen oder konvexen Gefäßinnenwand bogenförmig verlaufender Arterien auf. [58]

Aus zahlreichen epidemiologischen Studien weiß man, dass es verschiedene endogene und exogene Risikofaktoren gibt, die einzeln das Risiko der Atheroskleroseentstehung begründen und in Kombination das Risiko weiter erhöhen.

Dies sind unter anderem: Alter, Geschlecht, Adiposität, das Zigarettenrauchen, die arterielle Hypertonie, eine Dyslipoproteinämie und der Diabetes mellitus.

Dabei sind die wichtigsten endogenen Risikofaktoren eine Dyslipoproteinämie im Sinne einer LDL-Erhöhung und HDL-Erniedrigung, die arterielle Hypertonie und der Diabetes mellitus, der sowohl in epidemiologischen Studien als auch in Tiermodellen als wichtiger Einflussfaktor auf die Atherogenese beschrieben werden konnte. [58] [43] [56]

Als Atherogenese bezeichnet man den stetig progredienten Prozess der Atheroskleroseentstehung, an dessen Ende die atherosklerotische Plaque steht. Es treten dabei spezifische zelluläre und molekulare Reaktionen in der Intima betroffener Gefäße auf. [58] [11]

An der Atherogenese sind im Wesentlichen drei Prozesse beteiligt: Die Akkumulation von Lipoproteinen in der Gefäßwand intra- und extrazellulär; die Proliferation von Entzündungszellen sowie glatten Muskelzellen; und die Bildung extrazellulärer Matrix durch glatte Muskelzellen.

Die resultierende Gefäßwandveränderung verläuft in Stadien: Vereinfacht kann man atherosklerotische Läsionen im Verlauf beschreiben als fatty streak, intermediate lesion, fibrous plaque mit fibröser Kappe und nekrotischem Kern und advanced complicated lesion mit Kalzifizierung, Ulzeration und Einblutung. [60]

Der formalen Pathogenese wird die response to injury - Hypothese zugrunde gelegt.

Man nimmt an, dass am Anfang der Krankheitsentwicklung die endotheliale Dysfunktion steht. Hierbei muss es sich nicht um eine Verletzung des Endothels handeln, für die Ausbildung einer Läsion genügt die funktionelle Schädigung des Endothels. [60] [58]

Physikalische Kräfte, die auf das Endothel wirken, wie Blutfluss, Turbulenzen und shear stress, beeinflussen die Morphologie und Funktion der Endothelzellen.

Diese werden in Form und Ausrichtung verändert und stellen sich polygonal unorientiert dar, was eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle, im Besonderen LDL bedingt. [16] [43] Sie reichern sich proportional zu ihrer Konzentration im Blut an.

Kompensatorisch bilden Endothelzellen Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren für Monozyten und Lymphozyten, die in die Gefäßwand einwandern,

sowie proinflammatorische Zytokine für die Umwandlung der Monozyten in Makrophagen. [60]

Thrombozyten werden ebenfalls an vorgeschädigtes Endothel, an Kollagenfasern und Makrophagen gebunden. Sie sezernieren neben Thrombin Zytokine und Wachstumsfaktoren, die die Migration und Proliferation von Monozyten und glatten Gefäßmuskelzellen (SMCs) stimulieren.

Zudem bildet das Endothel prokoagulatorische Eigenschaften aus und die Produktion von NO ist eingeschränkt. [58]

Lipide werden von eingewanderten Makrophagen als Versuch einer Reparatur aufgenommen, die Makrophagen werden so zu Schaumzellen. [58]

Da natives LDL nicht ausreichend von Makrophagen prozessiert wird, vermutet man, dass es modifiziert wird. [18]

Diese Modifikation beinhaltet Oxidation, Lipolyse, Proteolyse, Aggregation, Glykierung sowie Assoziation mit Proteoglykanen oder Bildung von Immunkomplexen. Die wichtigste Modifikation ist dabei die Oxidation durch freie Radikale. [43]

Gleichzeitig wirkt LDL schädigend auf die Gefäßwand, wenn es durch Oxidation oder andere Mechanismen modifiziert wird. [11]

Dies bewirkt die weitere Aktivierung von Makrophagen und Endothelzellen.

Durch die anhaltende Entzündung werden also weiter Lipide gebunden, was in einem Circulus vitiosus aus LDL-Modifikation und Entzündungsreaktion mündet.

Wird die auslösende Noxe durch die Entzündungsreaktion nicht entfernt, wird aus der reparativen Immunantwort ein fortschreitender zerstörerischer Prozess. [58]

Die früheste erkennbare Läsion ist der sogenannte fatty streak mit makroskopisch erhabenen, streifenförmigen Herden.

Es handelt sich dabei um eine rein entzündliche Läsion, bestehend aus extrazellulären Lipiden und als entzündlichen Komponenten Makrophagen beziehungsweise Schaumzellen und T-Lymphozyten. [58]

Fatty streaks bilden sich häufig an Lokalisationen mit bereits vorhandenen intimalen SMCs. [74] [60]

Man vermutet, dass durch die fortbestehende Entzündungsreaktion im Verlauf weitere SMCs akkumulieren und Bindegewebe bilden, wodurch die Läsion an Größe zunimmt.

Durch weitere Einwanderung von Entzündungszellen, durch weitere Zellproliferation, Produktion von extrazellulärer Matrix und Akkumulation von extrazellulären Lipiden wird

der Krankheitsprozess fortgesetzt, es entsteht eine intermediäre Läsion und schließlich die fibröse Plaque. [43] [58]

Diese stellt bereits eine irreversible Gefäßwandverdickung dar. [56]

Kristallisieren die Lipide in den Schaumzellen aus, gehen die Makrophagen zugrunde, nekrotisches Material und extrazelluläre Lipide häufen sich in der Läsion an.

Durch weitere Aktivierung akkumulieren zunehmend mehr SMCs und bilden zur reparativen Gefäßwandbefestigung Fasermaterial, das regressiv verkalkt.

Ausfällung von Cholesterinkristallen und Kalksalzen ist nun möglich, es entsteht eine zellarme Läsion mit Verkalkung und/oder mit Kollagenvermehrung. [56]

Durch weiteres Fortschreiten der Atherogenese und komplizierende Prozesse wie Kalzifizierung, Ulzeration und Einblutung entsteht die complicated lesion.

Matrixmetalloproteinasen können die fibröse Deckplatte der Plaque aufweichen, so dass sie bei besonderer mechanischer Beanspruchung aufbricht und eine Fissur bildet.

Es blutet in die Läsion ein und es bildet sich ein parietaler Thrombus, gegebenenfalls auch ein okklusiver Thrombus. [43] [58]

## 1.2 SMCs

Die atherosklerotische Plaque setzt sich zusammen aus zellulären und nicht zellulären Bestandteilen.

Dabei handelt es sich im Wesentlichen um intra- und extrazellulären Lipide sowie Extrazellulärmatrix und um wenige zelluläre Bestandteile, insbesondere Makrophagen, T-Lymphozyten und glatte Gefäßmuskelzellen. [11] [43] [54]

SMCs der gesunden Tunica media sind vom kontraktiven Phänotyp, konzentrisch angeordnet und enthalten Myofilamente und sind somit verantwortlich für den Tonus der Gefäßwand.

Dagegen sind SMCs in atherosklerotischen Läsionen vom synthetischen Typ und enthalten im Wesentlichen rauhes endoplasmatisches Retikulum sowie Golgi-Komplexe und sind somit beteiligt an der Synthese der bindegewebigen Matrix der Läsion, bestehend aus Kollagenen, Elastin und Proteoglykanen. [6] [75]

Die intimale Akkumulation von glatten Gefäßmuskelzellen und die Bildung extrazellulärer Matrix sind das kennzeichnende Merkmal für Ausbildung der fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion. [59]

Das Ausmaß der Anreicherung der SMCs, bestimmt die Größe, Stabilität und Eigenschaften der atherosklerotischen Läsion. [59] [54]

Dabei wird die Akkumulation der SMCs einerseits bedingt durch Migration aus der Gefäßmedia, andererseits durch Proliferation intimaler oder medialer SMCs. [10] [54] Dies sind Merkmale, die in gesunden ausgereiften Zellen nicht vorhanden sind. [12]

Es gibt Hinweise, dass Proliferation und Migration vornehmlich nach Modifizierung der SMCs zum synthetischen Typ stattfinden und nicht im kontraktiven Typ. [7] [8] [17] [52] [27] [26]

Glatte Muskelzellen reagieren in der Atherogenese also mit Hypertrophie, Proliferation und Synthese fibrotischen Materials.

Diese Reaktionen der Gefäßwand treten für sich auch in anderen Prozessen auf und sind nicht spezifisch für die Atherogenese. Besonders die Proliferation glatter Muskelzellen ist eine gewöhnliche Reaktion der Gefäßwand auf diverse Arten der Störung der Integrität. Dennoch ist sie wesentlich für die Atherogenese. [11]

Die in der Gefäßintima bestehende Entzündungsreaktion induziert die Synthese und Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Makrophagen, Lymphozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen, die die Akkumulation von glatten Muskelzellen induzieren. [11]

In der atherosklerotischen Läsion lässt sich dies durch die Sensibilität auf chemotaktische sowie mitogene Reize begründen, unter diesen hauptsächlich der Platelet derived growth factor (PDGF). [59]

Zahlreiche weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren regulieren die Akkumulation von SMCs, darunter konnten IL-1, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  nachgewiesen werden.

PDGF stimuliert nicht nur die Akkumulation von SMCs, sondern auch die Inkorporation von LDL, die Synthese von extrazellulärer Matrix und die Vasokonstriktion. [55]

Man nimmt an, dass die Synthese der Wachstumsfaktoren und Zytokine und die Rezeptorexpression für PDGF der SMCs in atherosklerotischen Läsionen hochreguliert wird. [54]

Kultivierte SMCs verlieren ihre Kontraktilität und transformieren zum synthetischen Typ.

Im Zuge dessen werden Genprodukte wie Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren synthetisiert. [54]

Die Migration und Proliferation von SMCs kann in vitro durch zahlreiche Wachstumsfaktoren stimuliert werden, darunter PDGF oder auch FGF, EGF, IGF-1, TGF- $\beta$ . [61] [62] [64]

Es konnte gezeigt werden, dass hyperlipämisches und diabetisches Serum in vitro die Proliferation von SMCs stimuliert. Selbst lysierte SMCs scheinen eine proliferative Wirkung zu haben. [40] [68]

Diese Mechanismen sind auch während der Atherogenese nachzuweisen. [12]

Atherosklerotische Läsionen entwickeln sich über mehrere Jahrzehnte in einem komplexen Prozess. Angiographische Studien konnten zeigen, dass atherosklerotische Plaques über Jahre unverändert bestehen können. [5] [54]

Es konnte zudem festgestellt werden, dass SMCs aus atherosklerotischen Läsionen schneller proliferieren als gesunde SMCs aus normaler Gefäßwand. [51] Gründe dafür könnten eine erhöhte Empfindlichkeit für Wachstumsfaktoren oder eine erhöhte autokrine Stimulation oder auch eine Heterogenität in der Population der SMCs sein. [12]

Analysen der Proliferation von SMCs in atherosklerotischen Läsionen haben gezeigt, dass die geschätzte Replikationsrate der SMCs im Allgemeinen unter 1% liegt, dass heisst sich

wenige Zellen in Mitose befinden. [19] Ausnahmen legen die Vermutung nahe, dass die Atherogenese hoch variabel ist und möglicherweise episodisch auftritt oder die Migration gegenüber der Proliferation überwiegt. [54]

### 1.3 Diabetes mellitus und Insulinresistenz

Der Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die auf einem absoluten oder relativen Insulinmangel beruht. Von der Erkrankung betroffen sind der Stoffwechsel der Kohlenhydrate, der Proteine, der Fette, der Wasser- und Elektrolythaushalt.

Dies führt zu strukturellen Veränderungen in vielen Geweben und Organsystemen des Körpers, im Besonderen im Gefäßsystem. [2]

Zu den vaskulären Langzeitkomplikationen zählt man die diabetische Mikroangiopathie mit Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie durch Glykosylierung der kapillären Basalmembran bei chronischer Hyperglykämie sowie die unspezifische Makroangiopathie als Manifestation einer verfrühten und ausgeprägten Form der Atherosklerose. [53]

Es werden hauptsächlich zwei Formen des Diabetes mellitus unterschieden:

Der Typ 1 mit einem absoluten Insulinmangel, der auf einer autoimmunen oder nicht-autoimmunen Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas beruht und der Typ 2 als heterogene Gruppe von Defekten in der Insulinsekretion und der Insulinfunktion mit einem resultierenden relativen Insulinmangel. [3]

Pathophysiologisch zeichnet sich der Typ 2 Diabetes durch eine  $\beta$ -Zell-Dysfunktion, eine gesteigerte endogene Glukosesynthese und eine Insulinresistenz in der Peripherie im Sinne einer Endorganresistenz aufgrund genetischer oder erworbener Ursachen aus. [45]

Das metabolische Syndrom beschreibt die Konstellation von zusammenhängenden endogenen Risikofaktoren, die kardiovaskuläre Erkrankungen auf dem Boden einer Atherosklerose und die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes begünstigen.

Dies sind im Einzelnen Adipositas, Dyslipidämie, die arterielle Hypertonie und der gestörte Glukosestoffwechsel. [21]

Gemeinsames Merkmal des Typ 2 Diabetes und des metabolischen Syndroms ist die Insulinresistenz der Zielorgane Leber, des Muskelgewebes und des Fettgewebes.

Darunter versteht man eine verminderte biologische Antwort der Zielorgane auf endogenes oder exogenes Insulin, verursacht durch eine gestörte Signaltransduktion der durch Insulin vermittelten Information in betroffenen Geweben. [45]

Die Insulinresistenz ist gekennzeichnet durch Normoglykämie, die unterhalten wird durch eine Hyperinsulinämie, die wiederum einhergeht mit erhöhten C-Peptid-Serumspiegeln. [36]

Die Insulinresistenz mündet als chronisch progrediente Stoffwechselstörung häufig in einem Typ 2 Diabetes.

Da eine schädliche Stoffwechsellage lange vor der Manifestation eines Diabetes besteht, erleiden betroffene Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung häufig bereits mikro- oder makrovaskuläre Komplikationen. [45]

Dabei ist der Diabetes nicht nur einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose, die vaskulären Komplikationen treten gleichzeitig überzufällig häufig bei Diabetikern auf und sind verantwortlich für die erhöhte Morbidität und Mortalität des Diabetes. [58] Die Wahrscheinlichkeit für Komplikationen nimmt dabei mit der Krankheitsdauer zu.

Die ursächlichen Faktoren und molekularen Mechanismen für die Entstehung der Makroangiopathie sind wenig deutlich.

Zwar korrelieren kardiovaskuläre Ereignisse mit dem Ausmaß der chronischen Hyperglykämie, jedoch sind auch andere häufig begleitende Faktoren wie Dyslipidämie mit einer Hypertriglyzeridämie, reduziertem HDL-Cholesterin und erhöhtem und verändertem LDL-Cholesterin und arterielle Hypertonie an der Atheroskleroseentstehung beteiligt. [53]

Dyslipidämie, Hyperglykämie und Hyperinsulinämie werden also als Ursachen diskutiert. [73]

Atherogenes LDL kann etwa durch Glykosylierung modifiziert werden. [58]

Die intimale Entzündungsreaktion kann unter anderem durch advanced glycation end products (AGEs) beeinflusst werden, die über spezifische Rezeptoren an den Endothelzellen wirken, die Adhäsion und Permeabilität für Entzündungszellen steigern und die Synthese von NO vermindern. [58] [43]

Verschiedene epidemiologische Studien konnten zeigen, dass auch ein positiver Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und der Atheroskleroseentstehung besteht. [65] [76]

Wie bereits erwähnt, tritt Insulinresistenz häufig mit bekannten Risikofaktoren der Atherosklerose wie Hyperlipidämie und Hypertonie auf, und ist somit Teil eines

proatherogenen Milieus. Zusätzlich begünstigt die Insulinresistenz ein gestörtes Lipoproteinprofil.

Der Einfluss der Insulinresistenz auf die Atherogenese an sich ist dennoch nicht sicher geklärt. [65]

Daher bleibt zu klären, welche weiteren Pathomechanismen an der Entstehung der Atherosklerose beim Diabetes und der Insulinresistenz beteiligt sind.

## 1.4 C-Peptid

Das C-Peptid ist ein Spaltprodukt des Proinsulins, des Vorläufermoleküls des Insulins. [72] Es fällt während der Insulinbiosynthese in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas an.

Dabei verbindet es die A- und B-Kette des Proinsulins und dient somit zur Stabilisation der Sekundär- und Tertiärstruktur des sich bildenden Insulinmoleküls. Die Faltung des Moleküls und die Bildung von Disulfidbrücken werden erleichtert. [69] [70]

Das Proinsulin erhält seine Tertiärstruktur im endoplasmatischen Retikulum.

Ist die Insulinbiosynthese auf dem Level des Proinsulins vollendet, wird das C-Peptid vom Proinsulin im Golgiapparat der  $\beta$ -Zelle abgespalten. Das C-Peptid muss entfernt werden, um die biologische Aktivität des Insulins zu optimieren.

C-Peptid und Insulin werden gemeinsam in sekretorischen Granula gespeichert und gemeinsam in äquimolaren Mengen durch Exozytose in den Portalvenenkreislauf sezerniert. [66] [71]

Patienten mit peripherer Insulinresistenz und konsekutiv erhöhten Insulinspiegeln, wie etwa beim frühen Typ 2 Diabetes oder dem metabolischen Syndrom, weisen somit typischerweise auch erhöhte C-Peptidspiegel im Serum auf. [36]

Da C-Peptid in gleichen Mengen wie Insulin in den Kreislauf abgegeben wird und gleichzeitig eine deutlich längere Zirkulationszeit als das Insulin hat, ist es dazu geeignet, unabhängig vom Insulin die Sekretionsfähigkeit der  $\beta$ -Zellen in vivo abzuschätzen. [71]

In diesem Sinne findet es Verwendung als klinischer Marker bei der Unterscheidung der Typen des Diabetes mellitus sowie bei der Diagnostik der familiären Hyperinsulinämie und des Insulinoms.

Das C-Peptid ist ein Oligopeptid mit circa 31 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies sind bekannt und variieren leicht.

Es konnte bisher keine spezifische Struktur des C-Peptids nachgewiesen werden, in Lösung handelt es sich um eine ungeordnete Helix. [24] [79] [71]

Die Variabilität des C-Peptids unter den verschiedenen Spezies ist größer als die des Insulinmoleküls und anderer Peptidhormone. [66] Das C-Peptid verändert sich in der Evolution 12-15 mal schneller als das Insulin.

Trotz der Variabilität kann eine biologische Funktion vermutet werden. Die Konservierung der Länge und einiger struktureller Gegebenheiten geben Hinweise auf funktionelle Gegebenheiten.

Während das humane C-Peptid unverändert bleibt, kann das C-Peptid der Ratte innerhalb der Granula verändert werden [78] [71]

Neben seiner Funktion bei der Insulinsynthese, wird dem C-Peptid sowohl eine physiologische als auch pathologische Wirkung zugeschrieben.

Klinische Studien konzentrierten sich bisher auf die Effekte von C-Peptid zur Prävention und Therapie diabetischer Komplikationen bei Typ 1 Diabetikern mit.

Die Arbeiten beruhen auf der Hypothese, dass der absolute C-Peptid-Mangel bei Typ 1-Diabetikern pathologische Effekte hat.

Die kurzzeitige Gabe führt bei diesen Patienten zu einer Verbesserung der Muskel- und Hautdurchblutung, des myokardialen Blutflusses, der Nierenfunktion und des Glukoseverbrauchs des Körpers sowie der Funktion des autonomen Nervensystems.

[15] [33] [22] [34] [32]

Eine längere Behandlung führt zu einer Verbesserung der Nierenfunktion und der Funktion des sensorischen und autonomen Nervensystems. [31] [14]

Ebenso konnten einige intrazelluläre Effekte des C-Peptids herausgearbeitet werden.

C-Peptid in physiologischen Konzentrationen stimuliert die Aktivierung der Na-K-ATPase in renalen Tubuluszellen der Ratte über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor und Ca-abhängige intrazelluläre Signalwege. [47] Diese Aktivität wird vom C-terminalen Pentapeptid bestimmt. [48]

C-Peptid stimuliert ebenfalls die Na-K-ATPase in humanen renalen Tubuluszellen über die MAP-Kinasen ERK 1/2 und JNK und die Proteinkinase C und die Aktivierung der AKT. [83] [84]

In Swiss 3T3-Fibroblasten induziert C-Peptid die MAP-Kinase ERK 1/2 über die Aktivierung von Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen, der PI3-Kinase und der Proteinkinase C. [37]

In Endothelzellen von Lungenkapillaren der Maus aktiviert C-Peptid die p38 MAP-Kinase und die ERK 1/2. [38]

In L6 Myoblasten und Myozyten der Ratte stimuliert C-Peptid in physiologischen Konzentrationen unter anderem die PI3-Kinase Aktivität und die Phosphorylierung der MAP-Kinase, was zu Glykogensynthese und Aminosäureaufnahme führt. [20]

Ein spezifischer C-Peptid-Rezeptor wird angenommen, konnte aber bisher nicht genau identifiziert werden. [23] [57]

Stereospezifische Bindung von C-Peptid konnten an verschiedenen Zellen, etwa renalen Tubuluszellen, Fibroblasten und Endothelzellen nachgewiesen werden.

Die Bindungskonstante beträgt ungefähr  $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , Sättigung ist bereits bei physiologischen Konzentrationen von ungefähr 0,9 nmol/l erreicht. Das C-terminale Pentapeptid bestimmt dabei die Bindung. [57]

Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass das C-Peptid möglicherweise frühe Schritte der Atherogenese triggert, indem es die gerichtete Migration von T-Lymphozyten und Monozyten stimuliert. [80] [44]

Über die Wirkung von C-Peptid auf Gefäßmuskelzellen im Zusammenhang mit der Atherogenese liegen bisher keine Erkenntnisse vor.

## 1.5 Wirkung des C-Peptids auf verschiedene Schritte der Atherogenese

Bisherige Arbeiten über die Rolle des C-Peptids im Zusammenhang mit der Atherogenese bei Insulinresistenz konnten einige wegweisende Erkenntnisse erbringen.

So konnte gezeigt werden, dass sich das C-Peptid in Gewebsschnitten der thorakalen Aorta von Diabetikern insbesondere in der Gefäßintima ablagert. Dagegen konnte bei Nichtdiabetikern kein oder nur wenig intimales C-Peptid nachgewiesen werden.

Zudem kolokalisiert das C-Peptid gemeinsam CD68+ Makrophagen in der Gefäßintima ab. In vitro induziert das C-Peptid konzentrationsabhängig die gerichtete Migration von Monozyten. Dabei sind Pertussistoxin-sensitive G-Proteine sowie diesen nachgeschaltet die PI3-Kinase an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt.

Die frühe Atherogenese ist gekennzeichnet durch eine erhöhte endotheliale Permeabilität mit der Ablagerung von Plasmakomponenten in der Intima und einer Aktivierung des Endothels.

Es ergibt sich aus diesen Erkenntnissen also die Hypothese, dass sich das C-Peptid in der Gefäßwand ablagert und die Einwanderung von Monozyten in die sich bildende atherosklerotische Läsion unterstützt.

Da Monozyten maßgeblich an der Entzündungsreaktion der frühen Atherogenese beteiligt sind, ergibt sich die Hypothese, dass das C-Peptid auf diese Weise die frühe Atherogenese fördern könnte. [44]

Des Weiteren konnte in immunhistochemischen Färbungen von Gewebsschnitten aus der thorakalen Aorta von Diabetikern festgestellt werden, dass auch CD4+-Lymphozyten in der

Gefäßintima mit C-Peptid kolokalisieren.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass das C-Peptid die Migration von CD4+-Lymphozyten in vitro stimuliert. Dabei sind ebenfalls Pertussistoxin-sensitive G-Proteine und die PI3-Kinase beteiligt.

Die Migration von CD4+-Lymphozyten, der maßgeblichen T-Zell-Population, ausgelöst durch verschiedene chemotaktisch wirkende Stoffe, ist ein wichtiger Schritt in der frühen Atherogenese. Die CD4+-Lymphozyten dringen als naive TH0-Zellen in die Gefäßwand ein, differenzieren zu TH1-Zellen und setzen proinflammatorische Zytokine frei, durch die

weitere Zellen in der Gefäßwand aktiviert werden und die atherosklerotische Entzündungsreaktion vorangetrieben wird.

Man vermutet daher, dass sich bei Diabetikern das C-Peptid in der Intima ablagert, die Migration von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten in die Gefäßwand stimuliert und somit die frühe Atherogenese beeinflusst wird. [80]

In frühen atherosklerotischen Läsionen konnten bei Diabetikern neben der subendothelialen Ablagerung von C-Peptid eine Ablagerung in der Gefäßmedia und dort eine Kolo-kalisation mit glatten Gefäßmuskelzellen festgestellt werden. [44]

Somit wäre eine Wirkung des C-Peptids auf glatte Gefäßmuskelzellen möglich.

## 1.6 Fragestellungen

Über die Rolle des C-Peptids im Zusammenhang mit der Atherogenese bei Insulinresistenz und insbesondere über die Wirkung des C-Peptids auf die Proliferation der SMCs liegen bisher wenig gesicherte Erkenntnisse vor.

Es ergeben sich daher nun folgende Fragestellungen:

- Induziert C-Peptid die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in vitro?
- Welche Signaltransduktionswege sind an diesem Prozess beteiligt?

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Material

#### Geräte und Zubehör

##### Tabelle 1:

In den Versuchen verwendete Geräte, angegeben mit Art des Geräts, Modell und Hersteller.

|                       |                         |                       |
|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| Brutschrank           | Heraeus HeraCell        | Thermo Scientific     |
| Dispenser             | Multipette plus         | Eppendorf             |
| Dosiersystem          | Combitips plus          | Eppendorf             |
| Filterspitzen         | SafeSeal Tips           | Biozym                |
| Flaschenaufsatzfilter | Steritop                | Millipore             |
| Gefrierschrank        |                         | Liebherr              |
| Glaspipettenspitzen   |                         | Duran                 |
| Kühlschrank           |                         | Liebherr              |
| Mikroskop             |                         | Zeiss                 |
| Pipetten              | Pipetman                | Gilson                |
| Pipettenspitzen       | ep T.I.P.S.             | Eppendorf             |
| Pipettierhilfe        | Pipetboy acu            | Integra Biosciences   |
| Schüttelgerät         | Vortex Genie 2          | Scientific Industries |
| Sicherheitswerkbank   | Heraeus HeraSafe        | Thermo Scientific     |
| Szintillationszähler  | Wallac 1410             | Perkin Elmer          |
| Tischschüttler        | Certomat U              | Sartorius Stedim      |
| Wasserbad             | SW1                     | Julabo                |
| Zählkammer            | Blaubrand nach Neubauer | Brand                 |
| Zentrifuge            | Heraeus Multifuge       | Thermo Scientific     |

**Tabelle 2:**

In den Versuchen verwendetes Zubehör, angegeben mit Art des Zubehörs, Modell und Hersteller.

|                      |                                       |                  |
|----------------------|---------------------------------------|------------------|
| Konische Röhrchen    | BD Falcon Conical Tubes               | BD Biosciences   |
| Laborglasflaschen    |                                       | Duran            |
| Reaktionsgefäße      | Safe Lock Reaktionsgefäße             | Eppendorf        |
| Szintillationsgefäße | Polyvials V                           | Zinsser Analytic |
| Zellkulturflaschen   | Cellstar                              | Greiner Bio-One  |
| Zellkulturplatten    | BD Falcon 24-well Cell Culture Plates | BD Biosciences   |

## Lösungen und Reagenzien

**Tabelle 3:**

In den Versuchen verwendete Lösungen und Reagenzien, angegeben mit Art der Substanz, Substanzname und Hersteller.

|                    |   |                   |
|--------------------|---|-------------------|
| Accutase           |   | PAA Laboratories  |
| Antibiotika        | Penicillin, Streptomycin  | PAA Laboratories  |
| Aqua dest          | Ampuwa  | Fresenius Kabi    |
| C-Peptid der Ratte |   | Thermo Scientific |
| C-Peptid human     |   | Sigma-Aldrich     |
| C-Peptid scrambled |   | Thermo Scientific |
| Essigsäure         |   | AppliChem         |
| Insulin human      |   | Sigma-Aldrich     |
| Kollagen Typ 1     | Collagen I  | BD Biosciences    |
| L-Glutamin         |   | PAA Laboratories  |
| LY 294,002         | 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one Hydrochlorid  | Sigma-Aldrich     |
| Natronlauge        |   | Merck             |
| PD 98,059          | 2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one               | Sigma-Aldrich     |
| PDGF-BB human      | Platelet derived growth factor                                  | PeptoTech         |
| Pertussis Toxin    |   | Sigma-Aldrich     |
| Phosphatpuffer     | Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)                      | PAA Laboratories  |
| PP2                | 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine | Calbiochem        |
| Salzsäure          |   | Merck             |
| Serum              | Fetal Bovine Serum  | HyClone           |

|                      |   |                  |
|----------------------|---|------------------|
| Supplement Mix       | Humaner basic Fibroblast Growth Factor mit rekombinatem Epidermal Growth Factor, rekombinatem Insulin FCS und Phenolrot | Promocell        |
| Szintillationslösung | Ultima Gold   | Perkin Elmer     |
| Transferrin human    |   | Sigma-Aldrich    |
| Trichloressigsäure   |   | Merck            |
| Zellkulturmedium     | Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low Glucose mit Glutamin  | PAA Laboratories |
| Zellkulturmedium     | Smooth muscle cell (SMC) Growth Medium 2  | Promocell        |

### Radioaktive Substanz

#### Tabelle 4:

In den Versuchen verwendete radioaktive Substanz, angegeben mit Hersteller.

|                            |  |     |
|----------------------------|--|-----|
| [ <sup>3</sup> H]-Thymidin |  | ICN |
|----------------------------|--|-----|

### Zellen

#### Tabelle 5:

In den Versuchen verwendete Zellen, angegeben mit Bezugsquelle.

|                             |  |                       |
|-----------------------------|--|-----------------------|
| Humane aortale Muskelzellen |  | Promocell             |
| Gefäßmuskelzellen der Ratte |  | aus eigener Isolation |

## 2.2 Methodik

### Zellkulturmedien

Für die Kultur und die Verwendung in Versuchen wurden zunächst folgende Zellkulturmedien angesetzt.

Die Kulturmedien für die humanen SMCs wurden vom Hersteller Promocell bezogen und nach Anleitung angesetzt. Dies enthielt bFGF, EGF, Insulin, FCS, Phenolrot sowie eine Antibiotikamischung aus Penicillin, Streptomycin und zusätzlich L-Glutamin zugegeben.

Promocell Kulturmedium:

500 ml Basismedium

+ Supplement Mix mit

2,0 ng/ml rekombinantem humanem basic Fibroblast Growth Factor

0,5 ng/ml rekombinantem Epidermal Growth Factor

5,0 µg/ml rekombinantem Insulin

0,05 ml/ml FCS

0,62 ng/ml Phenolrot

+ 2% PSG

In der Vorbereitung eines Versuches wurde zur Synchronisation der Zellen ein sogenanntes Hungermedium verwendet.

Das Hungermedium für die humanen SMCs wurde ebenfalls mit Produkten des Herstellers Promocell angesetzt. Um die Synchronisation der Zellen in der Synthese-Phase des Zellzyklus zu erreichen, wurde zudem Insulin und Transferrin zugegeben.

Promocell Hungermedium:

500 ml Basismedium

+ 2,5 mg Insulin

+ 2,5 mg Transferrin

+ 2% PSG

Das Kulturmedium für die SMCs der Ratte wurde aus DMEM angesetzt, das mit fetalem bovinem Serum angereichert wurde. Die Mischung wurde steril gefiltert.

Außerdem wurde eine Antibiotikamischung aus Penicillin, Streptomycin und zusätzlich L-Glutamin zugegeben.

**Kulturmedium:**

500 ml DMEM Low Glucose mit L-Glutamin

+ 10% fetalem bovinen Serum

+ 1% PSG

Dem Hungermedium für humane Zellen entsprechend ein Mangelmedium für Zellen der Ratte hergestellt.

Dafür wurde dem DMEM nur 0,2 % fetales bovines Serum zugefügt. Zur Zellsynchronisation wurde ebenfalls Insulin und Transferrin zur zugefügt.

Die Mischung wurde steril gefiltert und mit einer Antibiotikamischung aus Penicillin und Streptomycin sowie zusätzlich L-Glutamin versetzt.

**Mangelmedium:**

500 ml DMEM Low Glucose mit L-Glutamin

+ 0,2% FCS

+ 2% PSG

+ 2 mg Insulin

+ 2 mg Transferrin

## **Humane aortale Muskelzellen**

Bei den verwendeten humanen Gefäßmuskelzellen handelt es sich um kommerziell erworbene humane aortale Muskelzellen der Firma Promocell.

## **Gewinnung von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Ratte**

Für weitere Versuche wurden zudem Gefäßmuskelzellen der Ratte verwendet.

Diese wurden folgendermaßen isoliert:

Gefäßpräparate der Ratte wurden unter der Sicherheitswerkbank bearbeitet.

Zunächst wurde die der Gefäßmedia anhaftende Intima mechanisch mit der Pinzette von der übrigen Gefäßwand gelöst. Das umliegende Bindegewebe wurde mit Kollagenase gelöst.

Die übrige Gefäßmedia wurde in circa 3x3 mm große Stücke geschnitten und mit erwärmtem Zellkulturmedium bedeckt im Brutschrank bei 37° C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 4% über einen Zeitraum von mehreren Tagen kultiviert.

Durch regelmäßige mikroskopische Kontrollen wurde das Auswachsen der SMCs beobachtet.

Nach ausreichendem Wachstum wurden die SMCs wie gewohnt kultiviert.

Der Erfolg und die Reinheit der Zellisolation wurden mittels  $\alpha$ -Aktin-Test überprüft.

## **Zellkultivierung**

Alle SMCs wurden im Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 4% kultiviert.

Dabei wurden Zellkulturflaschen mit einem Volumen von 250 ml verwendet. Den Zellen wurde 10 ml Zellkulturmedium zugegeben.

Alle zwei Tage wurde unter der Sicherheitswerkbank ein Wechsel des entsprechenden Mediums durchgeführt.

## **Subkultivierung**

Zur Passagierung wurde eine konfluent gewachsene Zellkultur verwendet.

Alle durchzuführenden Arbeiten wurden unter der Sicherheitswerkbank getätigt.

Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt. Um bereits von der Zellkulturflasche abgelöste Zellen zu entfernen, wurden die Zellen kurz mit 2 ml Accutase gewaschen.

Daraufhin wurden zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden 5 ml Accutase zu den Zellen gegeben und diese im Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 4% so lange inkubiert, bis sich der Zellrasen im Mikroskop sichtbar vom Flaschenboden gelöst hatte. Um die andauernde Wirkung der Accutase abzustoppen, wurden 5 ml erwärmtes Zellkulturmedium zur Zellsuspension zugegeben.

Die Zellsuspension wurde daraufhin in ein Röhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, um die überstehende Flüssigkeit zu entfernen.

Das Zellpellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und gleichmäßig auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt.

Im letzten Schritt wurde die Zellsuspension in den Zellkulturflaschen mit erwärmtem Medium auf 10 ml aufgefüllt und kurz geschwenkt.

Die Zellen wurden weiter im Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 4% inkubiert.

Für Versuche wurden Zellenkulturen bis einschließlich der Passage 8 verwendet.

Für humane Gefäßmuskelzellen und SMCs der Ratte wurde dabei gleich verfahren.

## **Kryokonservierung**

Für die längerfristige Konservierung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

Dazu wurden die Zellen wie zur Subkultivierung von den Zellkulturflaschen entfernt und ebenso durch Zentrifugation gereinigt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde in Eppendorf-Röhrchen überführt und flüssigen Stickstoff eingefroren.

Bei Bedarf wurde ein Röhrchen mit Zellen aufgetaut und in Kultur gebracht.

Dazu wurden die aufgetauten Zellen in eine Zellkulturflasche überführt und die Zellsuspension mit 10 ml Kulturmedium aufgefüllt.

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37° C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 4% wie gewohnt kultiviert.

Durch regelmäßige mikroskopische Kontrollen wurde das Wachstum der SMCs beobachtet.

Nach ausreichendem Wachstum wurden die SMCs wie beschrieben subkultiviert.

Die Reinheit der neuen Zellkultur wurde mittels  $\alpha$ -Aktin-Test überprüft.

Für humane Gefäßmuskelzellen und SMCs der Ratte wurde dabei gleich verfahren.

### **[<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation**

Zur Vorbereitung eines Versuches wurde eine 24-well Zellkulturplatte für mindestens eine Stunde mit 200  $\mu$ l Kollagen Typ 1, das in einer Verdünnung von 1:94 in 0,02 N Essigsäure angesetzt wurde, beschichtet.

Die Platte wurde nach der Beschichtung mit 1 ml Phosphatpuffer ausgespült.

Kultivierte SMCs wurden zunächst mit 2 ml Accutase kurz abgespült, um leicht lösbare und eventuell abgestorbene Zellen sofort zu entfernen.

Daraufhin wurden zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden 5 ml Accutase zu den Zellen gegeben und diese im Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 4% so lange inkubiert, bis sich der Zellrasen im Mikroskop sichtbar vom Flaschenboden gelöst hatte. Um die andauernde Wirkung der Accutase abzustoppen, wurden 5 ml Zellkulturmedium zur Zellsuspension zugegeben.

Die Zellsuspension wurde daraufhin in ein Röhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, um die überstehende Flüssigkeit zu entfernen.

Das Zellpellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert.

Um die Zellzahl im Pellet zu bestimmen, wurden 10  $\mu$ l Zellsuspension in der Zählkammer ausgezählt.

Die Zellsuspension wurde entsprechend verdünnt, so dass für humane SMCs 10000 Zellen pro well der Zellkulturplatte in 1 ml Zellkulturmedium ausgesät werden konnten, für SMCs der Ratte 30000 Zellen pro well.

Die Zellen wurden nun 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 4% inkubiert.

Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Zellkulturmedium entfernt. Die Zellen mit je 1 ml pro well Insulin-Transferrin-Hungermedium bedeckt und für weitere 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 4% inkubiert.

Im nächsten Schritt erfolgte zur Ermittlung der Proliferationsrate die Stimulation beziehungsweise die kombinierte Stimulation und Inhibition der Zellen mit C-Peptid der entsprechenden Spezies und weiteren Substanzen.

Es folgte wiederum die Inkubation der Zellen für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 4%.

Nach weiteren 24 Stunden wurde schließlich die Proliferation der SMCs im [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporations-Assay bestimmt.

Im Rahmen des Assays wurden 5 µl Tritium-markiertes Thymidin pro well zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden für weitere 4 Stunden im Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 4% inkubiert.

Vor Messung der inkorporierten Radioaktivität wurde das Hungermedium mit eventuellen Thymidinresten vollständig entfernt.

Es wurde 1 ml eiskalte 5%-ige Trichloressigsäure pro well zu den Zellen gegeben und diese für 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Die Zellen wurden zweimal mit 400 µl eiskaltem Aqua dest gewaschen, um daraufhin mit 400 µl 2N Natronlauge von der Zellkulturplatte abgelöst zu werden.

Zum vollständigen Lösen der Zellen vom Boden der Zellkulturplatte wurde die Platte zusätzlich für 5 Minuten auf dem Schüttler geschwenkt.

Zum Abpuffern der Natronlauge wurden 400 µl 1N Salzsäure pro well zur Zellsuspension gegeben.

Die Zellsuspensionen wurden in Szintillationsgefäße überführt und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt.

Die Inkorporation des Thymidins in die replizierte DNS als Maß für die Proliferation der SMCs wurden über die gemessene Radioaktivität pro Minute im β-Counter bestimmt und in dpm angegeben.

## **Proliferationsassay**

Im ersten Teil der Arbeit wurde versucht, mit verschiedenen Konzentrationen von humanem C-Peptid beziehungsweise C-Peptid der Ratte eine Konzentrationskinetik zu erarbeiten.

Humane SMCs wurden nach entsprechenden Vorversuchen zur Ermittlung der ungefähr notwendigen C-Peptid-Konzentration vergleichend mit 1, 5 und 10 nmol/l humanem C-Peptid stimuliert.

Zusätzlich wurden die Zellen mit scrambled C-Peptid, einem Peptid mit veränderter Aminosäureabfolge vorbehandelt.

SMCs der Ratte wurden nach entsprechenden Vorversuchen mit C-Peptid der Ratte in Konzentrationen von 0,05, 0,1, 0,5 und 1 nmol/l stimuliert.

Als Positivkontrolle PDGF-BB in einer Konzentration von 10 ng/ml.

## **Proliferationsassay mit Inhibitoren der Signaltransduktion**

Für den zweiten Teil der Arbeit wurde der Stimulation mit der wirksamsten C-Peptid-Konzentration von 10 nmol/l für humane SMCs beziehungsweise 0,5 nmol/l für SMCs der Ratte eine Inhibition mit verschiedenen, bestimmte Signaltransduktionswege hemmenden Substanzen im oben genannten Arbeitsschritt vorgeschaltet.

In einem zeitlichen Abstand von 30 Minuten vor der Stimulation mit C-Peptid wurden entweder

5  $\mu$ mol/l PP2 (Inhibitor der Src-Kinase),

5  $\mu$ mol/l LY 294,002 (Inhibitor der PI3-Kinase) oder

5  $\mu$ mol/l PD 98,056 (Inhibitor der MAP-Kinase ERK 1/2) zu den humanen Zellen gegeben.

Entsprechend wurden vor der Stimulation mit C-Peptid der Ratte

10  $\mu$ g/ml PTX (Inhibition Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine),

5  $\mu$ mol/l PP2 (Inhibitor der Src-Kinase),

5  $\mu$ mol/l LY 294,002 (Inhibitor der PI3-Kinase) und

5  $\mu$ mol/l PD 98,056 (Inhibitor der MAP-Kinase ERK 1/2) zu den SMCs der Ratte gegeben.

### **2.3 Auswertung**

Die gewonnenen Daten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet.

Sie wurden als  $\text{mean} \pm \text{standard error of the mean}$  dargestellt.

Die Unterschiede wurden mittels ONE-WAY ANOVA und nachfolgendem Duncan's post-hoc-test untersucht.

Ein  $p\text{-Wert} < 0,05$  wurde als signifikant betrachtet.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Effekt des C-Peptids der Ratte auf die Proliferation von SMCs der Ratte**

Die Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen der Ratte mit C-Peptid der Ratte in der oben beschriebenen Versuchsanordnung ergab eine Induktion der Zellproliferation, gemessen anhand der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation in die replizierte DNS.

SMCs der Ratte wurden mit C-Peptid der Ratte in Konzentrationen von 0,05, 0,1, 0,5 und 1 nmol/l stimuliert.

Es ergab sich eine Konzentrationskinetik mit einer maximal stimulierenden Konzentration des C-Peptids der Ratte von 0,5 nmol/l. Die Proliferation konnte signifikant auf das 1,8±0,3-fache im Vergleich zur Kontrolle mit nicht stimulierten Zellen gesteigert werden. PDGF-BB in einer Konzentration von 10 ng/ml diente als Positivkontrolle.

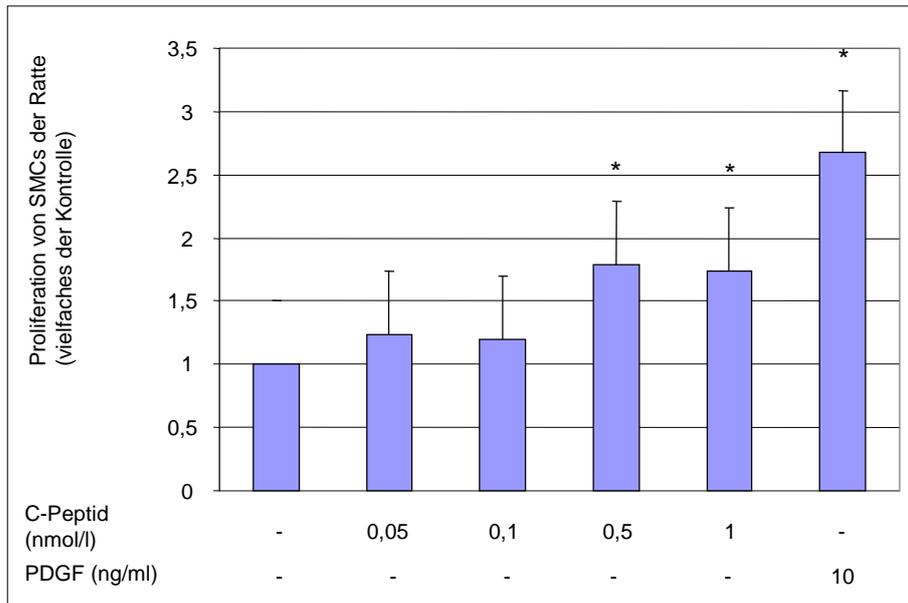


Abbildung 1:

C-Peptid der Ratte in Konzentrationen von 0,05, 0,1, 0,5 und 1 nmol/l induziert konzentrationsabhängig die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (SMCs) der Ratte im Vergleich zur Kontrolle mit nicht stimulierten Zellen.

Platelet-derived growth factor (PDGF) mit 10 ng/ml dient als Positivkontrolle.

Die Säulen geben Mittelwert und Standardfehler aus n=7 unabhängigen Experimenten an.

\* geben signifikante Ergebnisse an;  $p < 0,05$  im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen.

### **3.2 Effekt verschiedener Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion auf die durch C-Peptid induzierte Proliferation von SMCs der Ratte**

Um die molekularen Mechanismen näher zu entschlüsseln, die zur Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen der Ratte durch Stimulation mit C-Peptid führen, wurden, wie oben beschrieben, in weiteren Versuchen verschiedene Substanzen verwendet, die die intrazelluläre Signaltransduktion in SMCs hemmen.

#### **Effekt des Inhibitors PTX – Inhibition Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine**

Die Proliferation von SMCs der Ratte, die durch C-Peptid der Ratte in einer Konzentration von 0,5 nmol/l induziert werden konnte, konnte durch Vorstimulation mit Pertussistoxin, einem Inhibitor Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine, in der Konzentration von 10 µg/ml nicht inhibiert werden.

Dabei wurde die Proliferation der SMCs durch C-Peptid signifikant auf das  $2,1 \pm 0,5$ -fache im Vergleich zur Kontrolle induziert, durch C-Peptid und Pertussistoxin ergab sich eine vergleichbare Proliferation auf das  $2,2 \pm 1,1$ -fache.

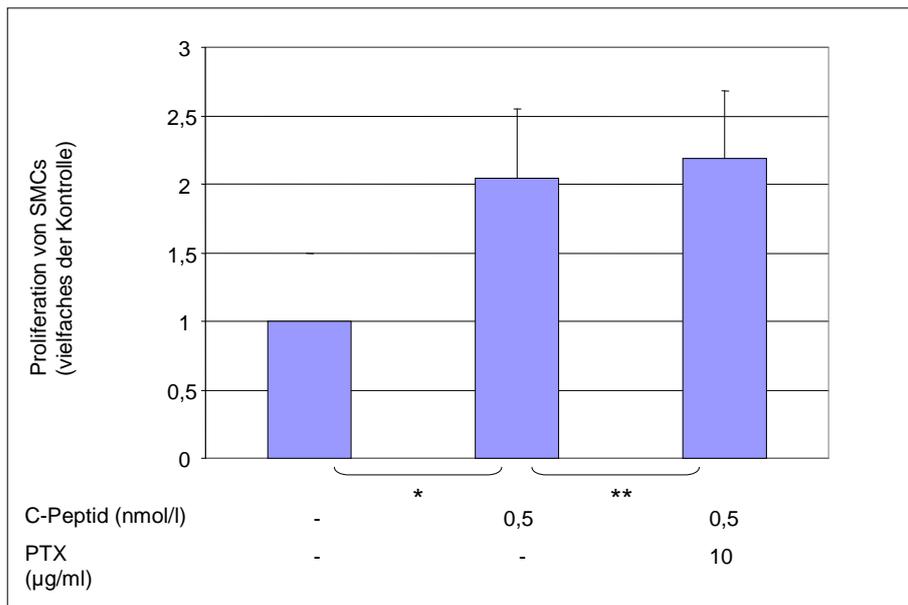


Abbildung 2:

Pertussistoxin (PTX) in einer Konzentration von 10 µg/ml inhibiert die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (SMCs) der Ratte, die durch C-Peptid der Ratte in der Konzentration von 0,5 nmol/l induziert werden kann, nicht.

Die Säulen geben Mittelwert und Standardfehler aus n=5 unabhängigen Experimenten an.

\* geben signifikante Ergebnisse an;  $p < 0,05$  im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen.

\*\* geben nicht signifikante Ergebnisse an;  $p < 0,05$  im Vergleich zu C-Peptid-stimulierten Zellen.

## Effekte des Inhibitors PP2 – Inhibitor der Src-Kinase

Die Proliferation von SMCs der Ratte, die durch C-Peptid der Ratte in einer Konzentration von 0,5 nmol/l induziert wurde, konnte durch Vorstimulation mit PP2, einem Inhibitor der Src-Kinase, in der Konzentration von 5  $\mu$ mol/l signifikant inhibiert werden.

Dabei konnte die durch C-Peptid induzierte Proliferation der SMCs auf das  $1,9 \pm 0,6$ -fache im Vergleich zur Kontrolle durch PP2 auf das  $0,6 \pm 0,4$ -fache im Vergleich zur Kontrolle gesenkt werden.

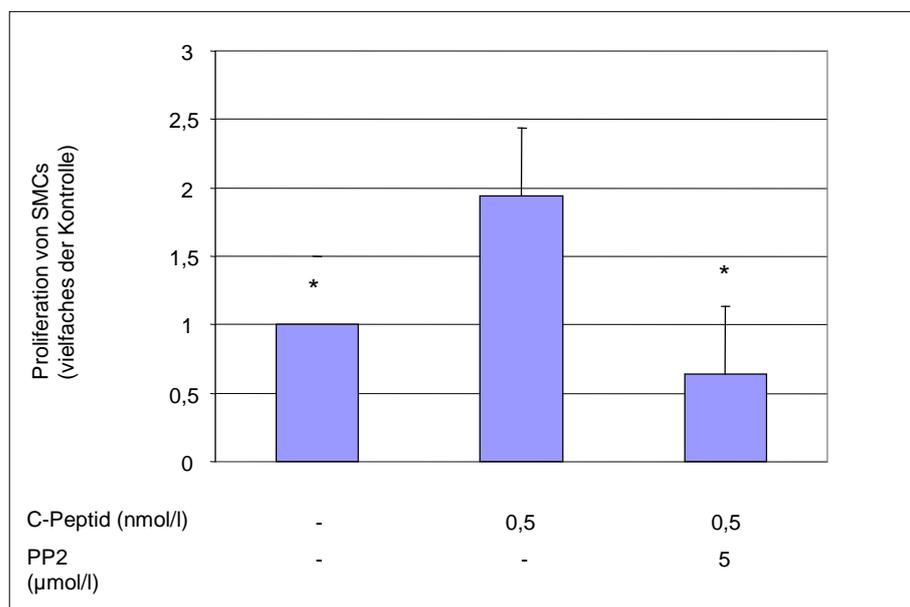


Abbildung 3:

PP2 in einer Konzentration von 5  $\mu$ mol/l inhibiert signifikant die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (SMCs) der Ratte, die durch C-Peptid der Ratte in der Konzentration von 0,5 nmol/l induziert werden kann.

Die Säulen geben Mittelwert und Standardfehler aus n=9 unabhängigen Experimenten an.

\* geben signifikante Ergebnisse an;  $p < 0,05$  im Vergleich zu C-Peptid-stimulierten Zellen.

## Effekt des Inhibitors LY 294,002 – Inhibitor der PI3-Kinase

Die Proliferation von SMCs der Ratte, die durch C-Peptid der Ratte in einer Konzentration von 0,5 nmol/l induziert wurde, konnte durch Vorstimulation mit LY 294,002, einem Inhibitor der PI3-Kinase, in der Konzentration von 5 µmol/l signifikant inhibiert werden. Dabei konnte die durch C-Peptid induzierte Proliferation der SMCs auf das  $1,9 \pm 0,6$ -fache im Vergleich zur Kontrolle durch LY 294,002 auf das  $1,1 \pm 0,3$ -fache im Vergleich zur Kontrolle gesenkt werden.

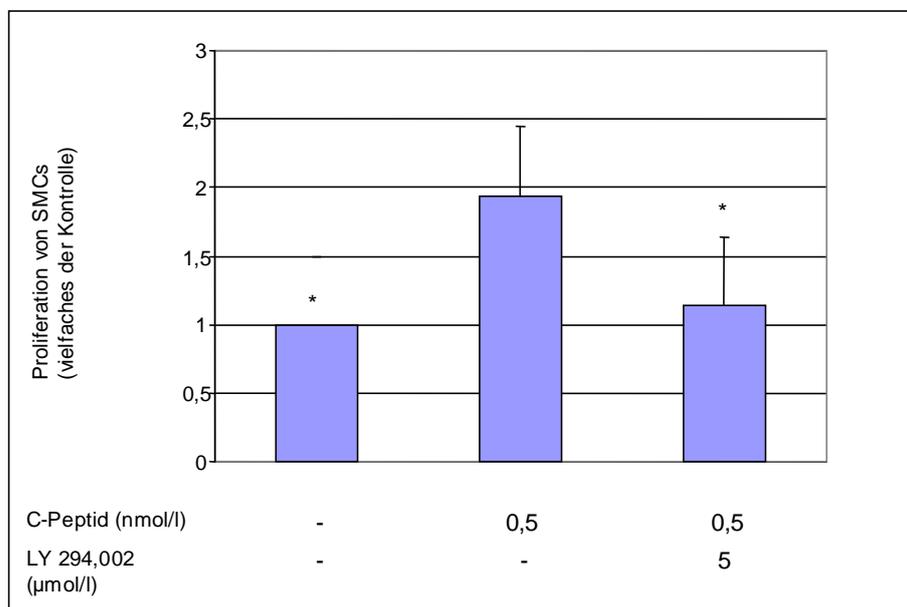


Abbildung 4:

LY 294,002 in einer Konzentration von 5 µmol/l inhibiert signifikant die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (SMCs) der Ratte, die durch C-Peptid der Ratte in der Konzentration von 0,5 nmol/l induziert werden kann.

Die Säulen geben Mittelwert und Standardfehler aus n=9 unabhängigen Experimenten an.

\* geben signifikante Ergebnisse an;  $p < 0,05$  im Vergleich zu C-Peptid-stimulierten Zellen.

## Effekt des Inhibitors PD 98,059 – Inhibitor der MAP-Kinase ERK 1/2

Die Proliferation SMCs der Ratte, die durch C-Peptid der Ratte in einer Konzentration von 0,5 nmol/l induziert wurde, konnte durch Vorstimulation mit PD 98,059, einem Inhibitor der MAP-Kinase ERK 1/2, in der Konzentration von 5  $\mu$ mol/l signifikant inhibiert werden. Dabei konnte die durch C-Peptid induzierte Proliferation der SMCs auf das  $1,9 \pm 0,6$ -fache im Vergleich zur Kontrolle durch PD 98,059 auf das  $1,3 \pm 0,4$ -fache im Vergleich zur Kontrolle gesenkt werden.

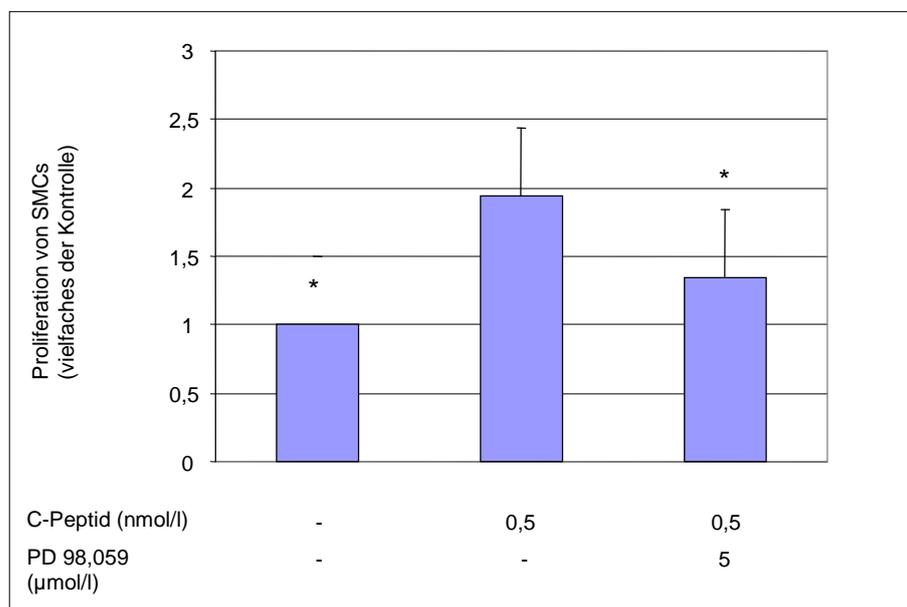


Abbildung 5:

PD 98,059 in einer Konzentration von 5  $\mu$ mol/l inhibiert signifikant die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (SMCs) der Ratte, die durch C-Peptid der Ratte in der Konzentration von 0,5 nmol/l induziert werden kann.

Die Säulen geben Mittelwert und Standardfehler aus  $n=9$  unabhängigen Experimenten an.

\* geben signifikante Ergebnisse an;  $p < 0,05$  im Vergleich zu C-Peptid-stimulierten Zellen.

### **3.3 Effekt des C-Peptids auf die Proliferation humaner SMCs**

Entsprechend den SMCs der Ratte ergab eine Stimulation humaner aortaler Muskelzellen mit humanem C-Peptid eine Induktion der Zellproliferation.

Die humanen SMCs wurden mit C-Peptid-Konzentrationen von 1, 5 und 10 nmol/l stimuliert.

Es konnte eine konzentrationsabhängige Induktion der Proliferation herausgearbeitet werden, mit einem signifikanten maximalen Effekt bei einer Konzentration des C-Peptids von 10 nmol/l. Die maximale Induktion betrug dabei das  $2,6 \pm 0,8$ -fache im Vergleich zur Kontrolle ohne Stimulus. Die Stimulation mit scrambled C-Peptid ergab keine signifikante Induktion der Proliferation der SMCs.

PDGF-BB in einer Konzentration von 10 ng/ml diente als Positivkontrolle.

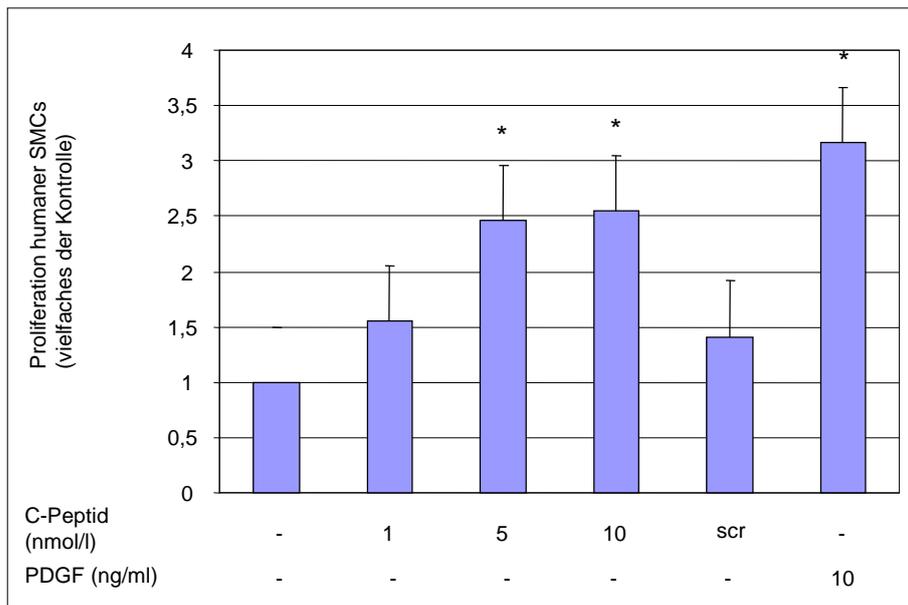


Abbildung 6:

C-Peptid in Konzentrationen von 1, 5 und 10 nmol/l induziert konzentrationsabhängig die Proliferation humaner aortaler Muskelzellen (SMCs) im Vergleich zur Kontrolle mit nicht stimulierten Zellen.

Scrambled C-Peptid (scr) erzielt keinen Effekt.

Platelet-derived growth factor (PDGF) in einer Konzentration von 10 ng/ml dient als Positivkontrolle.

Die Säulen geben Mittelwert und Standardfehler aus n=7 unabhängigen Experimenten an.

\* geben signifikante Ergebnisse an;  $p < 0,05$  im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen.

### **3.4 Effekt verschiedener Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion auf die durch humanes C-Peptid stimulierte Proliferation von humanen aortalen SMCs**

Entsprechend wurde der Effekt derselben Inhibitoren der Signaltransduktion auf die Proliferation humaner aortaler SMCs untersucht.

#### **Effekt des Inhibitors PP2 – Inhibitor der Src-Kinase**

Die Proliferation humaner SMCs, die durch humanes C-Peptid in einer Konzentration von 10 nmol/l induziert wurde, konnte durch Vorstimulation mit PP2, einem Inhibitor der Src-Kinase, in der üblichen Konzentration von 5 µmol/l signifikant inhibiert werden.

Dabei konnte die durch C-Peptid induzierte Proliferation der SMCs auf das  $2,2 \pm 0,6$ -fache im Vergleich zur Kontrolle durch PP2 auf das  $0,9 \pm 0,4$ -fache im Vergleich zur Kontrolle gesenkt werden.

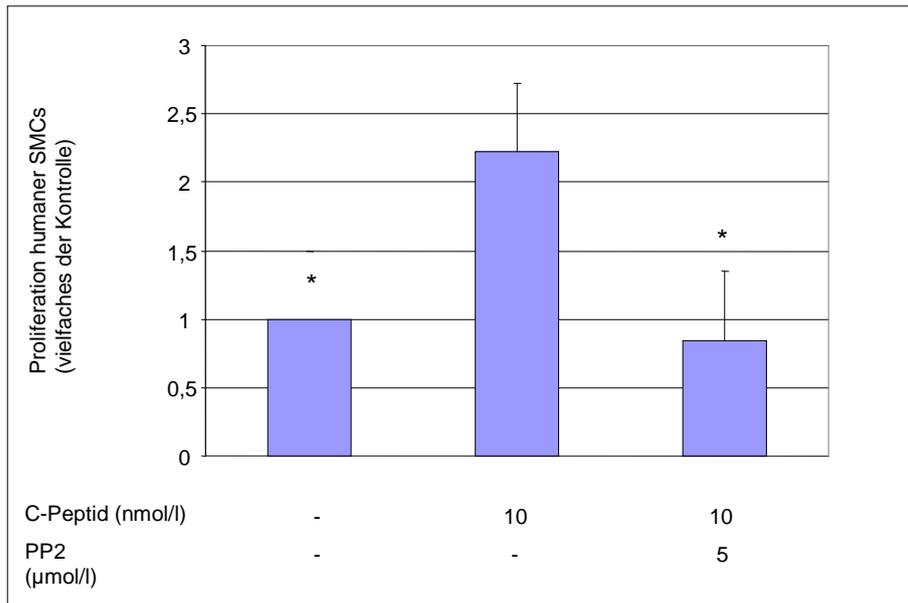


Abbildung 7:

PP2 in einer Konzentration von 5 μmol/l inhibiert signifikant die Proliferation humaner aortaler Muskelzellen (SMCs), die durch humanes C-Peptid in der Konzentration von 10 nmol/l induziert werden kann.

Die Säulen geben Mittelwert und Standardfehler aus n=8 unabhängigen Experimenten an.

\* geben signifikante Werte an;  $p < 0,05$  im Vergleich zu C-Peptid-stimulierten Zellen.

## Effekt des Inhibitors LY 294,002 – Inhibitor der PI-3-Kinase

Die Proliferation humaner SMCs, die durch humanes C-Peptid in einer Konzentration von 10 nmol/l induziert wurde, konnte durch Vorstimulation mit LY 294,002, einem Inhibitor der PI-3-Kinase, in der üblichen Konzentration von 5  $\mu\text{mol/l}$  signifikant inhibiert werden. Dabei konnte die durch C-Peptid induzierte Proliferation der SMCs auf das  $2,2 \pm 0,6$ -fache im Vergleich zur Kontrolle durch LY 294,002 auf das  $0,5 \pm 0,3$ -fache im Vergleich zur Kontrolle gesenkt werden.

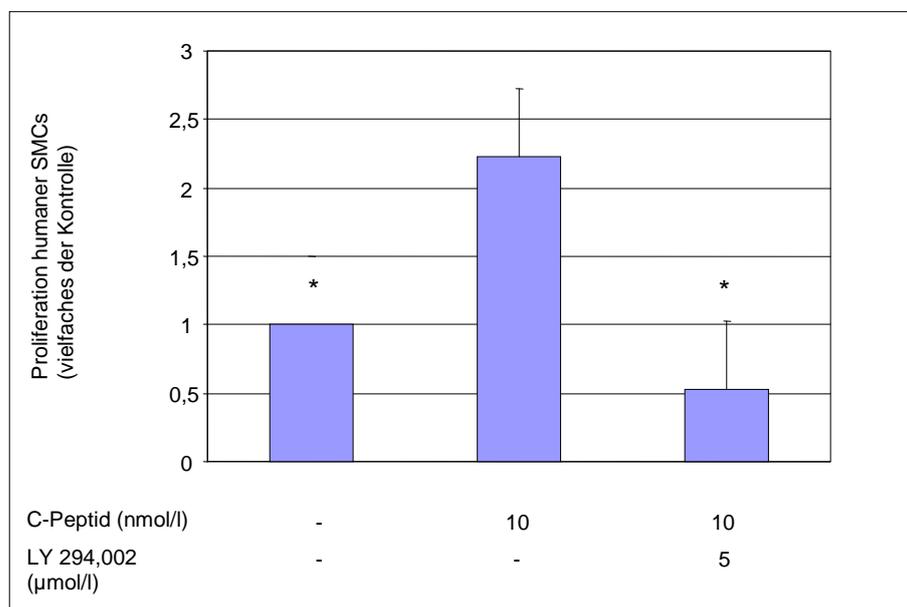


Abbildung 8:

LY 294,002 in einer Konzentration von 5  $\mu\text{mol/l}$  inhibiert signifikant die Proliferation humaner aortaler Muskelzellen (SMCs), die durch humanes C-Peptid in der Konzentration von 10 nmol/l induziert werden kann.

Die Säulen geben Mittelwert und Standardfehler aus  $n=4$  unabhängigen Experimenten an.

\* geben signifikante Werte an;  $p < 0,05$  im Vergleich zu C-Peptid-stimulierten Zellen.

## Effekt des Inhibitors PD 98,059 – Inhibitor der MAP-Kinase ERK 1/2

Die Proliferation humaner SMCs, die durch humanes C-Peptid in einer Konzentration von 10 nmol/l induziert wurde, konnte durch Vorstimulation mit PD 98,059, einem Inhibitor der MAP-Kinase ERK1/2, in der üblichen Konzentration von 5  $\mu$ mol/l signifikant inhibiert werden.

Dabei konnte die durch C-Peptid induzierte Proliferation der SMCs auf das  $2,2 \pm 0,6$ -fache im Vergleich zur Kontrolle durch PD 98,059 auf das  $1,2 \pm 0,4$ -fache im Vergleich zur Kontrolle gesenkt werden.

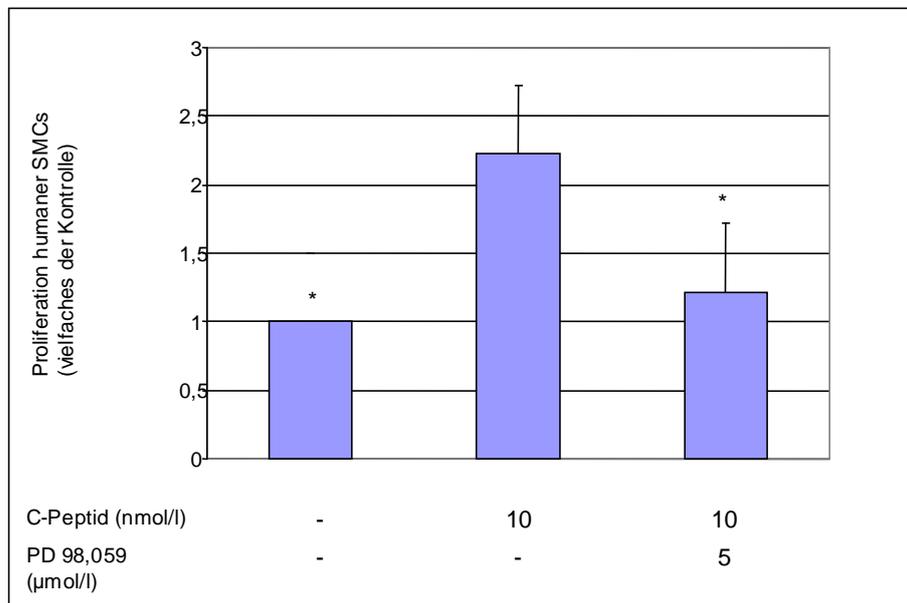


Abbildung 9:

PD 98,059 in einer Konzentration von 5  $\mu$ mol/l inhibiert signifikant die Proliferation humaner aortaler Muskelzellen (SMCs), die durch humanes C-Peptid mit 10 nmol/l induziert werden kann.

Die Säulen geben Mittelwert und Standardfehler aus n=15 unabhängigen Experimenten an.

\* geben signifikante Werte an;  $p < 0,05$  im Vergleich zu C-Peptid-stimulierten Zellen.

### 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das C-Peptid die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen stimuliert.

Dieser Effekt wurde sowohl für humane Zellen durch humanes C-Peptid als auch für Zellen der Ratte durch C-Peptid der Ratte herausgearbeitet.

In weiteren Versuchen konnte eine Inhibition der induzierten Zellproliferation durch bestimmte Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion gezeigt werden.

Dabei inhibierten PP2, ein Inhibitor der Src-Kinase, LY 294,002, ein Inhibitor der PI3-Kinase und PD 98,059, ein Inhibitor der MAP-Kinase ERK 1/2 die durch C-Peptid induzierte Proliferation von SMCs des Menschen und der Ratte.

Durch Pertussistoxin, einen Inhibitor Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine, konnte keine Aufhebung der durch C-Peptid induzierten Proliferation von SMCs der Ratte festgestellt werden.

Die erarbeiteten Ergebnisse geben Hinweise auf den möglichen mitogenen Effekt des C-Peptids auf SMCs über einen bisher unbekanntes C-Peptidrezeptor und intrazellulärer Signaltransduktion über die Src-Kinase und dieser nachgeschaltet die PI3-Kinase und die MAP-Kinase ERK 1/2.

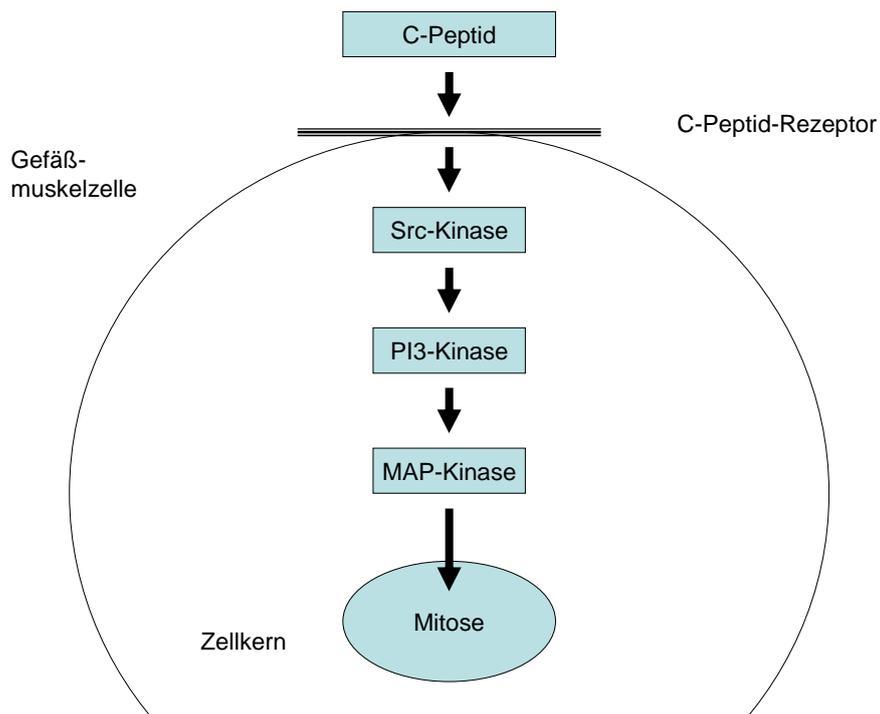


Abbildung 10:

Im Modell bindet das C-Peptid an einen bisher unbekanntem Rezeptor der Gefäßmuskelzelle. Es wird eine intrazelluläre Signalkaskade angestoßen, die über die Src-Kinase, die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und die Mitogen-activated protein-Kinase (MAP-Kinase) den Zellzyklus in Richtung Mitose beeinflusst.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Induktion der Proliferation von SMCs durch C-Peptid**

Lange galt das Spaltprodukt des Proinsulins, das C-Peptid, als biologisch inerte Substanz, die ihre Bedeutung ausschließlich in der Insulinbiosynthese hatte.

Inzwischen konnte eine biologische Aktivität des C-Peptids jedoch nachgewiesen werden. [79]

So führt die kurzzeitige Gabe von C-Peptid bei Typ 1 Diabetikern zu einer Verbesserung der Muskel- und Hautdurchblutung, des myokardialen Blutflusses, der Nierenfunktion und des Glukoseverbrauchs des Körpers sowie der Funktion des autonomen Nervensystems. [15] [33] [22] [34] [32]

Eine längere Behandlung führt zu einer Verbesserung der Nierenfunktion und der Funktion des sensorischen und autonomen Nervensystems. [31] [14]

Speziell im Zusammenhang mit der Atherogenese konnte gezeigt werden, dass das C-Peptid in vitro einen konzentrationsabhängigen chemotaktischen Effekt auf humane CD4+ T-Zellen und Monozyten hat. [44] [80]

### **Induktion der Proliferation von SMCs der Ratte durch C-Peptid der Ratte**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das C-Peptid der Ratte in vitro die Proliferation von SMCs der Ratte induziert.

In der oben beschriebenen Versuchsanordnung konnte durch [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation in die replizierte DNS proliferierender Zellen der mitogene Effekt des C-Peptids gezeigt werden. Dabei wurden in den Versuchsbedingungen beschriebene oder erprobte Methoden zur Zellgewinnung, Zellkultur und [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation verwendet.

Es wurde eine konzentrationsabhängige Stimulation der Proliferation der SMCs der Ratte festgestellt, mit einem maximalen Effekt bei einer C-Peptidkonzentration von 0,5-1 nmol/l. Die Zellproliferation konnte auf das 1,8-fache im Vergleich zur Negativkontrolle gesteigert werden.

Der Effekt war geringer als der des bekannten und in der Atherogenese wirksamen Proliferationsstimulus PDGF-BB in einer Konzentration von 10 ng/ml.

Das C-Peptid der Ratte ist bekannt; wie oben beschrieben, unterscheidet es sich in einigen Aminosäuren vom C-Peptid des Menschen. [71]

Während das humane C-Peptid während der Insulinsynthese unverändert bleibt, kann das C-Peptid der Ratte innerhalb der intrazellulären Speichergranula verändert werden. [78] Dabei wird das C-terminale Pentapeptid abgespalten, das für die biologische Wirkung des C-Peptids verantwortlich zu sein scheint. [57]

Physiologische C-Peptid-Konzentrationen im Serum der Ratte entsprechen mit 0,3-3,0 nmol/l gewöhnlich denen des Menschen. [20]

Es ist bekannt, dass die Proliferation von SMCs der Ratte im Rahmen der Insulinresistenz mit den Insulinlevels korreliert. [1]

Bei peripherer Insulinresistenz treten mit der Hyperinsulinämie typischerweise auch erhöhte C-Peptidspiegel im Serum auf. [36]

Somit ist auch eine durch C-Peptid induzierte Proliferation der SMCs, wie sie hier gezeigt werden konnte, bei Hyperinsulinämie im Rahmen der Insulinresistenz denkbar.

Die in dieser Arbeit gefundene effektivste C-Peptidkonzentration entspricht physiologischen Werten, beobachtet wurde jedoch auch eine Zellproliferation bei höheren C-Peptidkonzentrationen.

Da bekannt ist, dass das C-Peptid der Ratte in vivo vor Sekretion verändert werden kann, sind zur Erzielung eines ähnlichen Effektes möglicherweise höhere C-Peptidkonzentrationen notwendig. [78]

Dies könnte den maximalen mitogenen Effekt auf SMCs der Ratte in vitro bei niedrigeren C-Peptidkonzentrationen erklären.

Insgesamt legen diese Ergebnisse also die Vermutung nahe, dass das C-Peptid die Proliferation bei erhöhten C-Peptidspiegeln induziert.

Eine Arbeit mit ähnlicher Fragestellung konnte grundlegend verschiedene Ergebnisse zu den hier vorgestellten zeigen. [39]

So wurde gezeigt, dass die Proliferation aortaler SMCs der Ratte, die unter hohen Glukosekonzentrationen kultiviert wurden, durch humanes C-Peptid verhindert werden kann.

Dabei wurden aortale SMCs der Ratte für drei Wochen unter hohen Glukosebedingungen von 20 mmol/l kultiviert.

Die festgestellte Hyperproliferation der SMCs konnte konzentrationsabhängig durch gleichzeitige Kultivierung mit humanem C-Peptid zwischen 1 und 100 nmol/l supprimiert werden.

Es wurde daraus geschlossen, dass das C-Peptid die zur atherosklerotischen Plaque führende Proliferation der SMCs verhindert und die Glukoseutilisation bei Diabetikern verbessert. [39]

Beide Studien unterscheiden sich grundlegend im Versuchsaufbau: Es wurden dort SMCs und C-Peptid verschiedener Spezies verwendet, in dieser Arbeit jedoch nur C-Peptid der Ratte mit SMCs der Ratte und humanes C-Peptid mit humanen Zellen.

Inkubationszeiten und die unnatürlich hohe C-Peptid-Konzentrationen unterschieden sich wesentlich von den hier verwendeten.

Die gegenteiligen Ergebnisse sind also vermutlich auf die Unterschiede im Versuchsaufbau zurückzuführen.

### **Induktion der Proliferation humaner aortaler SMCs durch humanes C-Peptid**

Um die gewonnen Erkenntnisse über die Proliferation von SMCs der Ratte durch C-Peptid der Ratte zu bestätigen, wurden weitere Versuche mit humanen aortalen SMCs durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass auch das humane C-Peptid in vitro die Proliferation von humanen aortalen SMCs induziert.

Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Induktion der Proliferation der SMCs herausgearbeitet werden. Der maximale Effekt ergab sich bei einer C-Peptidkonzentration von 5-10 nmol/l. Die Zellproliferation konnte auf das 2,6-fache im Vergleich zur Negativkontrolle gesteigert werden.

Durch scrambled C-Peptid, das heißt C-Peptid mit einer veränderten Aminosäuresequenz, konnte kein Effekt erzielt werden.

In einer früheren Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass sich das C-Peptid in Gewebenschnitten der thorakalen Aorta von Diabetikern insbesondere in der Gefäßintima ablagert. In einigen Fällen konnte auch eine Akkumulation von C-Peptid in der Gefäßmedia festgestellt werden. [44]

Eine Ablagerung des C-Peptids subendothelial in der Intima und der Media entlang des Konzentrationsgradienten zwischen Serum und Gefäßwand und die mitogene Wirkung auf SMC in der Intima und Media ist somit also annehmbar.

Die Entstehung einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaque beruht unter anderem auf der Proliferation von SMCs und dem fibrotischen Umbau der Plaque durch sezerniertes Matrixmaterial der SMCs.

Somit kann also vermutet werden, dass das C-Peptid an der Entstehung einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaque in vivo beteiligt ist.

Physiologische C-Peptid-Konzentrationen im Serum des Menschen liegen bei 0,26-1,32 nmol/l. [28]

Da C-Peptid äquimolar zu Insulin auf einen Glukosereiz aus dem Pankreas sezerniert wird, sind bei Hyperinsulinämie im Rahmen einer Insulinresistenz auch erhöhte C-Peptid-Serumspiegel zu erwarten. [71] [36]

Die verwendete C-Peptid-Konzentration von 5-10 nmol/l ist somit gut annehmbar für Patienten mit Insulinresistenz und könnte die in vivo Situation widerspiegeln.

Durch gleichzeitige Versuche mit scrambled C-Peptid konnte gezeigt werden, dass der proliferative Effekt tatsächlich durch das C-Peptid in der bekannten Aminosäuresequenz bedingt ist.

Der mitogene Effekt an sich ist als gering einzustufen, ist aber vergleichbar mit dem des bekannten und in der Atherogenese wirksamen Stimulus PDGF-BB in einer Konzentration von 10 ng/ml.

Wie oben erwähnt, ist die Proliferation von SMCs während der Atherogenese nicht konstant und insgesamt langsam fortschreitend. [54] Dies könnte den geringen proliferativen Effekt erklären.

Es muss dennoch eingeräumt werden, dass in dieser Arbeit nur eine stoßweise Stimulation der Zellen mit C-Peptid vorgenommen wurde, außerdem die gleichzeitige Stimulation mit Insulin nicht vorgenommen wurde.

Somit sind mögliche synergistische Effekte nicht nachvollziehbar, was das Ergebnis an sich allerdings nicht beeinflusst. Dies ist in weiteren Versuchen zu klären.

## 4.2 Intrazelluläre Signalwege

Es ist bekannt, dass das C-Peptid stereospezifisch an der Zellmembran verschiedener Zellarten binden kann und so eine hormon-ähnliche Wirkung ausübt. Ein Rezeptor konnte jedoch bislang nicht identifiziert werden. [79]

Ebenso konnten einige intrazelluläre Effekte des C-Peptids herausgearbeitet werden.

C-Peptid in physiologischen Konzentrationen stimuliert die Aktivierung der Na-K-ATPase in renalen Tubuluszellen der Ratte über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor und Ca-abhängige intrazelluläre Signalwege. [47] Diese Aktivität wird vom C-terminalen Pentapeptid bestimmt. [48]

C-Peptid stimuliert ebenfalls die Na-K-ATPase in humanen renalen Tubuluszellen über die MAP-Kinasen ERK 1/2 und JNK und die Proteinkinase C und die Aktivierung von AKT. [83] [84]

In Swiss 3T3-Fibroblasten induziert C-Peptid die MAPK ERK 1/2 über die Aktivierung von Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen, der PI3-Kinase und der Proteinkinase C. [37]

In Endothelzellen von Lungenkapillaren der Maus aktiviert C-Peptid die p38 MAP-Kinase und ERK 1/2. [38]

In L6 Myoblasten und Myozyten der Ratte stimuliert C-Peptid in physiologischen Konzentrationen unter anderem die PI3-Kinase Aktivität und die Phosphorylierung der MAP-Kinase, was zu Glykogensynthese und Aminosäureaufnahme führt. [20]

Die Beteiligung Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine und der PI3-Kinase konnte auch in Migrationsversuchen bei der Signaltransduktion in Monozyten und CD4+ T-Zellen nachgewiesen werden. [44] [80]

Die Beteiligung bestimmter Signaltransduktionswege an der Entwicklung des mitogenen Reizes des C-Peptids in SMCs wurde mit Hilfe von Inhibitoren der Signaltransduktion untersucht.

Durch Erweiterung der verwendeten Versuchsanordnung mit diesen Inhibitoren wurde versucht, die durch C-Peptid erreichte Proliferation beider Zellreihen zu unterdrücken.

Es konnten folgende Ergebnisse erarbeitet werden.

### **Inhibition der Proliferation von SMCs durch PTX – Inhibition Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine**

Durch die Verwendung von Pertussistoxin konnte die Proliferation der SMCs der Ratte nicht gesenkt werden. Die Beteiligung Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine bei der Proliferation von SMCs durch C-Peptid erscheint somit unwahrscheinlich.

Dies weist darauf hin, dass es sich bei diesem Zellmembranrezeptor nicht um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor handelt.

### **Inhibition der Proliferation von SMCs durch PP2 – Inhibitor der Src-Kinase**

Das Src-Protein ist eine Non-Rezeptor-Tyrosinkinase, die in Signaltransduktionswegen bei der Regulation von Zellwachstum mitwirkt. Die Src-Kinase ist in der Regel inaktiv und wird nur auf bestimmte Reize aktiviert.

PP2 ist ein potenter und selektiver Inhibitor der Src-Kinasen. Er wirkt selektiv auf die Src-Kinasen Lck, Fyn und Hck.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Src-Kinase mit nachfolgender Aktivierung der PI3-Kinase und der MAP-Kinase ERK 1/2 an der Proliferation von SMCs stimuliert durch Angiotensin II beteiligt ist. [4]

Ebenso ist die Aktivierung der Src-Kinase in SMCs und darauf folgend der PLC/PKC/MAPKK/ERK ein entscheidender Schritt bei der Vermittlung eines mitogenen Signals von glykiertem LDL. [9]

Bradykinin aktiviert in SMCs die Src-Kinase und dieser nachgeschaltet die PI3-Kinase und die AKT. [82]

PP2 in der üblichen Konzentration von 5  $\mu\text{mol/l}$  unterdrückte in dieser Arbeit signifikant die durch C-Peptid induzierte Proliferation der SMCs. Dies konnte sowohl in humanen wie auch in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte gezeigt werden.

Somit kann vermutet werden, dass die Src-Kinase an der intrazellulären Signalübertragung des C-Peptids in SMCs beteiligt ist.

## **Inhibition der Proliferation von SMCs durch LY 294,002 – Inhibitor der PI-3-Kinase**

PI3-Kinasen sind Lipidkinasen, deren Aktivität in sämtlichen eukaryotischen Zellen zu finden ist. Sie sind an einer Vielzahl von zellulären Schlüsselfunktionen wie Zellwachstum, Proliferation, Migration, Differenzierung, Überleben und Zelladhäsion beteiligt.

LY 294,002 ist ein potenter, zellpermeabler und hochselektiver Inhibitor der PI3-Kinase. Der PI3-Kinase nachgeschaltet ist die ERK 1/2 das wichtigste Signaltransduktionsmolekül bei

der Proliferation von SMCs, in etwa bei der Vermittlung des Signals von Angiotensin II, glykiertem LDL und PDGF. [4] [9] [42]

Es konnte auch gezeigt werden, dass die PI3-Kinase das C-Peptid-Signal in verschiedenen Zellarten vermittelt, etwa in Swiss 3T3-Fibroblasten, in L6 Myoblasten und Myozyten der Ratte und in Monozyten und CD4+ T-Zellen. [37] [20] [44] [80]

Die Proliferation SMCs des Menschen und der Ratte, die durch C-Peptid des Menschen und der Ratte in einer Konzentration von 10 nmol/l bzw. 0,5 nmol/l induziert werden konnte, konnte durch LY 294,002, einen Inhibitor der PI-3-Kinase, in der üblichen Konzentration von 5 µmol/l signifikant inhibiert werden.

Dies könnte ein Hinweis auf die wichtige Rolle der PI3-Kinase in der Signaltransduktion des C-Peptid-Signals in SMCs sein.

## **Inhibition der Proliferation von SMCs durch PD 98,059 – Inhibitor der MAP-Kinase ERK 1/2**

Der MAP-Kinase-Weg bezeichnet eine Reihe mehrstufiger Signaltransduktionswege, die unter anderem an der Regulation der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums, des programmierten Zelltods und des Zellzyklus beteiligt sind. Die Signalwege umfassen mindestens drei in Serie geschaltete Kinasen: eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase, eine MAP-Kinase-Kinase und eine MAP-Kinase, welche in dieser Reihenfolge aktiviert werden.

MAP-Kinasen sind Proteinkinasen, die andere Proteine an spezifischen Serin/Threonin-Resten phosphorylieren.

Die MAP-Kinasen selbst werden normalerweise durch direkte Phosphorylierung an einem Tyrosin- und Threoninrest aktiviert. Sind die MAP-Kinasen aktiviert, akkumulieren sie im Zellkern, wo sie kerneigene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und die Transkription von Zielgenen regulieren.

PD 98,059 ist ein potenter, selektiver und zellpermeabler Inhibitor der MAP-Kinase-Kinase.

Es inhibiert nicht die MAP-Kinase selbst, sondern die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK 1/2.

Die MAP-Kinasen werden in drei Gruppen aufgeteilt: Die Extracellular signal-related kinases mit den Isoformen ERK1 und ERK2 (klassische MAP-Kinase), die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase und die c-Jun-N-terminale Kinasen JNK.

Man unterscheidet grundsätzlich drei verschiedene Signalwege: Aktivierung über Mitogene oder Wachstumsfaktoren, was zu Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung über die ERK 1/2 führen kann; Aktivierung über Stress, Tumorbekrosefaktoren oder IL1-Rezeptor Typ 1, was zu Antworten wie Entzündung, Apoptose, Wachstum oder Differenzierung über die p38-MAP-Kinase zur Folge haben kann; und Aktivierung über Stress, UV-Licht oder einen osmotischen Schock, was zu Entzündung, Apoptose, Wachstum, oder Differenzierung über die JNK führt.

Der MAP-Kinase-Weg mit Beteiligung der ERK 1/2 ist entscheidend beteiligt bei der Zelldifferenzierung und Proliferation von SMCs induziert durch LDL, glykiertem LDL und Angiotensin II. [77] [9] [4]

Mehrere in vivo Studien konnten die Beteiligung der ERK 1/2 bei der Bildung von Neointima nach Endothelverletzungen durch Ballonkatheter zeigen. [30] [41]

Die Proliferation von SMCs des Menschen und der Ratte, die durch C-Peptid des Menschen und der Ratte in einer Konzentration von 10 nmol/l bzw. 0,5 nmol/l induziert werden konnte, konnte durch PD 98,059, einen Inhibitor der MAP-Kinase ERK 1/2, in der üblichen Konzentration von 5 µmol/l signifikant inhibiert werden.

Somit konnte also gezeigt werden, dass die MAP-Kinase ERK 1/2 wahrscheinlich an der Signaltransduktion bei der Proliferation von SMCs durch C-Peptid beteiligt ist.

Insulin aktiviert die PI3-Kinase oder die ERK 1/2 MAP-Kinase.

Im Rahmen der Insulinresistenz kommt es dagegen zu einer selektiven Inhibition der PI3-Kinase bei intakter ERK 1/2. [46] [81]

Der proliferative ERK 1/2 MAP-Kinase-Weg wird also bei Insulinresistenz aktiviert und induziert c-Fos, Egr-1 und andere Gene des Zellwachstums, die die Transition von SMCs von ruhenden zu proliferierenden Zellen bewirken. [35]

Insulin alleine ist ein schwacher mitogener Stimulus. Jedoch potenziert das Insulin die Effekte anderer Mitogene wie PDGF, Angiotensin II und Thrombin.

Daher sind proliferative Effekte im Rahmen der Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie als komplexes Zusammenspiel mehrerer Mitogene zu sehen, die zu einer Aktivierung der ERK 1/2 führen.

Die Kontrolle der Proliferation von SMC erfolgt über das Eingreifen in den Zellzyklus und die Transformation der Zelle von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus.

Es ist also anzunehmen, dass das C-Peptid über die Aktivierung der Src-Kinase und nachfolgend der PI3-Kinase und der MAP-Kinase ERK 1/2 im weiteren Verlauf den Zellzyklus beeinflusst.

### **4.3 Vergleich der Effekte auf die Proliferation durch C-Peptid im Menschen und in der Ratte**

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, stimuliert das C-Peptid *in vitro* die Proliferation von SMCs des Menschen und der Ratte.

Dabei ergab sich für beide Spezies eine Konzentrationskinetik mit einer maximalen Induktion der Zellproliferation bei 5-10 nmol/l für humane Zellen und 0,5-1 nmol/l für Rattenzellen.

Es konnte also ein erheblicher Unterschied in der effektivsten C-Peptidkonzentration festgestellt werden.

Die verwendete C-Peptid-Konzentration von 5-10 nmol/l bei Versuchen mit humanen Zellen ist gut annehmbar für Patienten mit Insulinresistenz, bei denen physiologische C-Peptidkonzentrationen von 0,26-1,32 nmol/l im Rahmen der Insulinresistenz deutlich überschritten werden. [28]

Dies könnte somit gut die *in vivo* Situation widerspiegeln.

Die gefundene effektivste C-Peptidkonzentration bei den Versuchen mit SMCs der Ratte entspricht physiologischen Werten von 0,3-3,0 nmol/l, beobachtet wurde jedoch auch eine Zellproliferation bei höheren C-Peptidkonzentrationen.

Da bekannt ist, dass das C-Peptid der Ratte *in vivo* vor Sekretion verändert werden kann, indem das für die biologische Wirkung verantwortliche C-terminale Pentapeptid abgespalten wird, ist der maximale mitogene Effekt auf SMCs der Ratte *in vitro* bei niedrigeren C-Peptidkonzentrationen erklärbar. [78] [57]

*In vivo* sind zur Erzielung eines ähnlichen Effektes möglicherweise höhere C-Peptidkonzentrationen notwendig.

Diese Ergebnisse legen also die Vermutung nahe, dass das C-Peptid die Proliferation bei erhöhten C-Peptidspiegeln induziert.

Die maximal erreichte Proliferation betrug für Zellen der Ratte das 1,8-fache im Vergleich zur Negativkontrolle gesteigert werden, und für humane Zellen das 2,6-fache.

Der mitogene Effekt ist in beiden Fällen als moderat einzustufen, ist aber vergleichbar mit dem des bekannten und in der Atherogenese wirksamen Stimulus PDGF-BB in einer Konzentration von 10 ng/ml.

Wie oben erwähnt, ist die Proliferation von SMCs während der Atherogenese nicht konstant und insgesamt langsam fortschreitend. [54]

Dies könnte den geringen proliferativen Effekt in beiden Fällen erklären.

In Zellen der Ratte induziert das C-Peptid die Src-Kinase, die PI3-Kinase und die MAP-Kinase ERK 1/2. Die Beteiligung dieser Signaltransduktionsmechanismen konnte auch für humane SMCs bestätigt werden.

Dies bekräftigt die Vermutung, dass es sich um einen Mechanismus mit einem bisher unbekanntem C-Peptidrezeptor und intrazellulärer Signaltransduktion über die Src-Kinase und dieser nachgeschaltet die PI3-Kinase und die MAP-Kinase ERK 1/2 handelt.

Da eine Beteiligung Pertussistoxin sensitiver G-Proteine in SMCs der Ratte ausgeschlossen werden konnte, sind weitere Studien notwendig, die diesen Rezeptor genauer identifizieren.

#### 4.4 Schlussfolgerungen

Die erarbeiteten Ergebnisse zeigen, dass das Proinsulinspaltprodukt C-Peptid die Proliferation von SMCs des Menschen und der Ratte induziert.

Dabei wirkt das C-Peptid wohl an einem bisher unbekanntem Rezeptor der SMCs und löst intrazelluläre Signalkaskaden aus, die ihrerseits zur Zellproliferation führen. Als beteiligte Signaltransduktionsmechanismen kommen die Src-Kinase und dieser nachgeschaltet die PI3-Kinase und die MAP-Kinase ERK 1/2 in Frage.

Da Insulin und dessen Spaltprodukt aus der Insulinbiosynthese, das C-Peptid, gemeinsam und in gleichen Mengen sezerniert werden, treten bei Hyperinsulinämie gleichzeitig erhöhte C-Peptid-Serumspiegel auf. [36]

Eine kompensatorische Hyperinsulinämie ist kennzeichnend für die Insulinresistenz in frühen Stadien. Die Insulinresistenz wiederum ist ein gemeinsames Merkmal des Typ 2 Diabetes mellitus und des metabolischen Syndroms. [45]

Diabetes mellitus ist einer der Hauptrisikofaktoren für die Ausbildung der atherosklerotischer Läsionen. Gleichzeitig entwickeln Patienten mit Diabetes eine verfrühte und besonders ausgeprägte Form der Atherosklerose. [56] [58]

Ebenso besteht ein Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und Atherosklerose, der in vielen klinischen Studien belegt werden konnte. [13] [25] [46] [49] [63] [65]

Es ist also anzunehmen, dass sich atherosklerotische Läsionen bereits vor der klinischen Manifestation des Diabetes entwickeln. [45] Als Ursachen werden die bestehende Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Dyslipidämie und advanced glycation end products diskutiert. Dennoch sind die molekularen Mechanismen nicht ausreichend verstanden.

Diabetes akzeleriert gleichzeitig die Akkumulation von SMCs in atherosklerotischen Läsionen. [73]

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Proliferation von SMCs mit Insulinlevels korreliert. [1] Man nimmt also an, dass die Insulinresistenz für die Proliferation von SMCs im Zusammenhang steht. [29] [50]

In fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen bilden akkumulierte SMCs die zellulären und von diesen sezernierte Matrixproteine die bindegewebigen Hauptbestandteile. [67] Die Akkumulation von SMCs rekrutiert sich dabei aus Migration und Proliferation intimaler und medialer SMCs. [54]

Aus diesen Überlegungen ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die durch das C-Peptid stimulierte Proliferation von SMCs einen wichtigen Schritt in der verfrühten und ausgeprägten Entstehung der fortgeschrittenen atherotischen Plaque eines Patienten mit peripherer Insulinresistenz und erhöhten Insulinspiegeln darstellen könnte.

Vor allem im Zusammenhang mit der Wirkung von C-Peptid auch auf andere zelluläre Komponenten der Atherogenese könnte so ein wichtiger Aspekt des Pathomechanismus der Atheroskleroseentstehung bei Insulinresistenz erklärt werden. [44] [80]

## 5 Zusammenfassung

### Einleitung und Fragestellung

Die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen ist ein entscheidender Schritt in der Entwicklung fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen.

Diabetes mellitus und das metabolische Syndrom sind Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose. Bei Diabetikern tritt zudem bereits früh eine äußerst ausgeprägte und diffuse Form der Atherosklerose auf.

Bisher sind die Ursachen und molekularen Mechanismen dafür nicht ausreichend geklärt.

Gemeinsam ist dem frühen Typ 2 Diabetes und dem metabolischen Syndrom eine Insulinresistenz mit kompensatorisch gesteigerter Insulinproduktion.

Da mit dem Insulin das C-Peptid des Proinsulins äquimolar sezerniert wird, sind somit auch erhöhte C-Peptidkonzentrationen im Serum festzustellen.

In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, ob das C-Peptid Einfluss auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen hat und ob bestimmte intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen beteiligt sind.

### Methodik

Mit Hilfe eines [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporationsassays sollte gezeigt werden, dass das C-Peptid des Menschen und der Ratte jeweils die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen des Menschen und der Ratte konzentrationsabhängig stimuliert.

In weiteren Versuchen mit den Inhibitoren der Signaltransduktion sollten die beteiligten Signaltransduktionswege näher entschlüsselt werden.

### Ergebnisse

Dabei ergab sich eine maximale Stimulation bei 10 nmol/l C-Peptid mit einer  $2,6 \pm 0,8$ -fachen Induktion der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle für humane Gefäßmuskelzellen und bei 0,5 nmol/l mit einer  $1,8 \pm 0,3$ -fachen Induktion der Proliferation für Rattenzellen.

Diese Effekte konnten durch durch PP2, einen Inhibitor der Src-Kinase, durch LY 294,002, einen Inhibitor der PI3-Kinase (Phosphoinositol-3-Kinase) und PD 98,059, einen Inhibitor der MAP-Kinase (Mitogen-activated protein-Kinase) ERK 1/2 (Extracellular-signal regulated kinase), aufgehoben werden.

In den Versuchen mit Pertussistoxin, einem Inhibitor Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine, konnte keine Aufhebung der durch C-Peptid induzierten Proliferation der Gefäßmuskelzellen festgestellt werden.

#### Diskussion und Schlussfolgerung

Die erarbeiteten Ergebnisse zeigen, dass das C-Peptid die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen des Menschen und der Ratte *in vitro* induziert.

Dabei wirkt das C-Peptid wohl an einem bisher unbekanntem Rezeptor der Gefäßmuskelzellen und löst bestimmte intrazelluläre Signalkaskaden aus, die ihrerseits zur Zellproliferation führen.

Als beteiligte Signaltransduktionsmechanismen kommen die Src-Kinase und dieser nachgeschaltet die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) sowie die Mitogen-activated protein-Kinase (MAP-Kinase) Extracellular-signal regulated kinase (ERK) 1/2 in Frage.

Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die durch das C-Peptid stimulierte Proliferation von SMCs einen wichtigen Schritt in der verfrühten und ausgeprägten Entstehung der fortgeschrittenen atherotischen Plaque eines Patienten mit peripherer Insulinresistenz und erhöhten Insulinspiegeln darstellen könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Absher PM, Schneider DJ, Baldor LC, Russel JC, Sobel BE: The retardation of vasculopathy induced by attenuation of insulin resistance in the corpulent JCR:LA-cp rat is reflected by decreased vascular smooth muscle cell proliferation in vivo. *Atherosclerosis* 143: 245-251 (1999)
2. Adeghate E, Schattner P, Dunn E: An Update on the Etiology and Epidemiology of Diabetes Mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 1084: 1-29 (2006)
3. Alberti KG, Zimmet PZ: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15: 539-553 (1998)
4. Bokemeyer D, Schmitz U, Kramer HJ: Angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells requires an Src-dependent activation of the epidermal growth factor receptor. *Kidney Int* 58: 549-558 (2000)
5. Brown BG, Albers JJ, Fisher LD: Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N Engl J Med* 323: 1289-1298 (1990)
6. Campbell GR, Campbell JH: The phenotypes of smooth muscle expressed in human atheroma. In: Lee KT, Onodera K, Tanaka K (Hrsg): *Atl II: recent progress in atherosclerosis research*. New York Academy of Sciences: 143-158 (1990)
7. Campbell GR, Campbell JH: Smooth muscle phenotype changes in arterial wall homeostasis: Implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* 42: 139-162 (1985)
8. Chamley-Campbell JH, Campbell GR, Ross R: The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 59: 1-61 (1979)

9. Cho HM, Choi SH, Hwang KC, Oh SY, Kin HG, Yoon DH, Choi MA, Lim S, Song H, Jang Y, Kim TW: The Src/PLC/PKC/MEK/ERK signaling pathway is involved in aortic smooth muscle cell proliferation induced by glycated LDL. *Mol Cells* 19: 60-66 (2005)
10. Clowes AW, Schwartz SM: Significance of quiescent smooth muscle cell migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res* 56: 139-145 (1985)
11. Davies MJ, Woolf N: Atherosclerosis: what is it and why does it occur? *Br Heart J* 69: 3-11 (1993)
12. Dilley RJ, McGeachie JK, Prendergast FJ: A Review of the Proliferative Behaviour, Morphology and Phenotypes of Vascular Smooth Muscle Cells. *Atherosclerosis* 63: 99-107 (1987)
13. Ducimetiere P, Eschwege E, Papoz L, Richard JL, Claude JR, Rosselin G: Relationship of plasma insulin levels to the incidence of myocardial infarction and coronary heart disease mortality in a middle-aged population. *Diabetologia* 19: 205-210 (1980)
14. Ekberg K, Brismar T, Johansson BL, Jonsson B, Lindstrom P, Wahren J: Amelioration of sensory nerve dysfunction by C-peptide in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 52: 536-541 (2003)
15. Forst T, Kunt T, Pohlmann T, Goitom K, Engelbach M, Beyer J, Pfützner A: Biological activity of C-peptide on the skin microcirculation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 101: 2036-2041 (1998)
16. Gimbrone MA: Vascular endothelium, hemodynamic forces and atherogenesis. *Am J Pathol* 155: 1-5 (1999)
17. Glagov S, Ts'ao C: Restitution of aortic cell wall after sustained and necrotizing transmural ligation injury: Role of blood cells and artery cells. *Am J Pathol* 79: 7-30 (1975)

18. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS: Binding sites on macrophages that mediate uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 333-337 (1979)
19. Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM: Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4600-4604 (1990)
20. Grunberger G, Qiang X, Li Z, Matthews S, Sbrissa D, Shisheva A, Sima A: Molecular basis for the insulinomimetic effects of C-Peptide. *Diabetologia* 44: 1247-1257 (2001)
21. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC, Jr., Spertus JA, Costa F: Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112: 2735-2752 (2005)
22. Hansen A, Johansson BL, Wahren J, von Bibra H: C-peptide exerts beneficial effects on myocardial blood flow and function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 51: 3077-3082 (2001)
23. Henriksson M, Pramanik A, Shafqat J, Zhong Z, Tally M, Ekberg K, Wahren J, Rigler R, Johansson J, Jornvall H: Specific binding of proinsulin C-peptide to intact and to detergent-solubilized human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 423-427 (2001)
24. Henriksson M, Shafqat J, Liepinsh E, Tally M, Ekberg K, Wahren J, Jörnvall H, Johansson J: Unordered structure of proinsulin C-peptide in aqueous solution and in the presence of lipid vesicles. *Cell Mol Life Sci* 57: 337-342 (2000)
25. Howard G, O'Leary DH, Zaccaro D, Haffner S, Rewers M, Hamman R, Selby JV, Saad MF, Savage P, Bergman R: Insulin sensitivity and atherosclerosis. *Circulation* 93: 1809-1817 (1996)

26. Imai H, Connell C, Lee K, Kim D, Thomas W: Differential counts by electron microscopy of cell types in normal intimal cell masses in swine abdominal aortas. *Exp Mol Pathol* 42: 377-388 (1985)
27. Imai H, Lee K, Lee S, Lee K, O'Neil R, Thomas W: Ultrastructural features of aortic cells in mitosis in control and cholesterol fed swine. *Lab Invest* 23: 401-415 (1970)
28. Imöhl M: Kohlenhydrate. In: Imöhl M (Hrsg): *Labormedizin pocket*. Börm Bruckmeier Verlag: 94-106 (2005)
29. Indolfi C, Torella D, Cavuto L, Davalli AM, Coppola C, Esposito G, Carriero MV, Rapacciuolo A, Di Lorenzo E, Stabile E, Perrino C, Chieffo A, Pardo F, Chiariello M: Effects of balloon injury on neointimal hyperplasia in streptozotocin-induced diabetes and in hyperinsulinemic nondiabetic pancreatic islet-transplanted rats. *Circulation* 103: 815-819 (2001)
30. Izumi Y, Kim S, Namba M, Yasumoto H, Miyazaki H, Hoshiga M, Kaneda Y, Morishita R, Zhan Y, Iwao H: Gene transfer of dominant-negative mutants of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase prevents neointimal formation in balloon-injured rat artery. *Circ Res* 88: 1120-1126 (2001)
31. Johansson B-L, Borg K, Fernquist-Forbes E, Kernell A, Odergren T, Wahren J: Beneficial effects of C-peptide on incipient nephropathy and neuropathy in patients with type 1 diabetes - a three-month study. *Diabet Med* 17: 181-189 (2000)
32. Johansson BL, Borg K, Fernquist-Forbes E, Odergren T, Remahl S, Wahren J: C-peptide improves autonomic nerve function in IDDM patients. *Diabetologia* 39: 687-695 (1996)
33. Johansson B-L, Linde B, Wahren J: Effects of C-peptide on blood-flow, capillary diffusion capacity and glucose utilization in the exercising forearm of type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 35: 1151-1158 (1992)

34. Johansson B-L, Sjöberg S, Wahren J: The influence of human C-peptide on renal function and glucose utilization in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 35: 121-128 (1992)
35. Jonas M, Edelman ER, Groothuis A, Baker AB, Seifert P, Rogers C: Vascular neointimal formation and signaling pathway activation in response to stent injury in insulin-resistant and diabetic animals. *Circ Res* 2005: 725-733 (2005)
36. Kasuga M: Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *J Clin Invest* 116: 1756-1760 (2006)
37. Kitamura T, Kimura K, Jung B, Makondo K, Okamoto S, Canas X, Sakane N, Yoshida T, Saito M: Proinsulin C-Peptide rapidly stimulates mitogen-activated protein kinases in Swiss 3T3 fibroblasts: requirement of protein kinase C, phosphoinositide 3-kinase and pertussis toxin-sensitive G-protein. *Biochem J* 355: 123-129 (2001)
38. Kitamura T, Kimura K, Jung B, Makondo K, Sakane N, Yoshida T, Saito M: Proinsulin C-peptide activates cAMP response element-binding proteins through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in mouse lung capillary endothelial cells. *Biochem J* 366: 737-744 (2002)
39. Kobayashi Y, Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Akiyama N, Kamiya H, Watarai A, Nakae M, Oiso Y, Nakamura J: Human proinsulin C-Peptide prevents proliferation of rat aortic smooth muscle cells cultured in high-glucose conditions. *Diabetologia* 48: 2396-2401 (2005)
40. Ledet T, Fischer-Dzoga K, Wissler RW: Growth of rabbit aortic smooth muscle cells cultured in media containing diabetic and hyperlipidemic serum. *Diabetes* 25: 207-215 (1976)
41. Liu B, Fisher M, Groves P: Down-regulation of ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases using antisense oligonucleotides inhibits intimal

- hyperplasia in a porcine model of coronary balloon angioplasty. *Cardiovasc Res* 54: 640-648 (2002)
42. Liu B, Itoh H, Louie O, Kubota K, Kent K: The role of phospholipase C and phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *J Surg Res* 120(2): 256-265 (2004)
  43. Lusis AJ: Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-241 (2000)
  44. Marx N, Walcher D, Raichle C, Aleksic M, Bach H, Grüb M, Hombach V, Libby P, Zieske A, Homma S, Strong J: C-Peptide Colocalizes with Macrophages in Early Arteriosclerotic Lesions of Diabetic Subjects and Induces Monocyte Chemotaxis in Vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 540-545 (2004)
  45. Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Haring HU: Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocr Rev* 21: 585-618 (2000)
  46. Nigro J, Osman N, Dart AM, Little PJ: Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocr Rev* 27: 242-259 (2006)
  47. Ohtomo Y, Aperia A, Sahlgren B, Johansson B-L, Wahren J: C-peptide stimulates rat renal tubular Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase activity in synergism with neuropeptide Y. *Diabetologia* 39: 199-205 (1996)
  48. Ohtomo Y, Bergman T, Johansson B-L, Jörnvall H, Wahren J: Differential effects of proinsulin C-peptide fragments on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase activity of renal tubule segments. *Diabetologia* 41: 287-291 (1998)
  49. Orchard TJ, Eichner J, Kuller LH, Becker DJ, McCallum LM, Grandits GA: Insulin as a predictor of coronary heart disease: interaction with apolipoprotein E phenotype. A report from the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Ann Epidemiol* 4: 40-45 (1994)

50. Park S-H, Marso SP, Zhou Z, Foroudi F, Topol EJ, Lincoff AM: Neointimal hyperplasia after arterial injury is increased in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 104: 815-819 (2001)
51. Pietilä K, Nikkari T: Enhanced growth of smooth muscle cells from atherosclerotic rabbit aortas in culture. *Atherosclerosis* 36: 241-248 (1980)
52. Poole JCF, Cromwell SB, Benditt EP: Behaviour of smooth muscle cells and formation of extracellular structures in the reaction of arterial walls to injury. *Am J Pathol* 62: 391-414 (1971)
53. Powers AC: Diabetes mellitus. In: Dietel M, Suttrop N, Zeitz M (Hrsg): *Harrisons Innere Medizin*. ABW: 1-31 (2005)
54. Raines E, Ross R: Smooth muscle cells and the pathogenesis of atherosclerosis. *Br Heart J* 69(Supplement): 30-37 (1993)
55. Raines EW, Bowen-Pope DF, Ross R: Platelet-derived growth factor. In: Sporn MB, Roberts AB (Hrsg): *Handbook of experimental pharmacology: peptide growth factors and their receptors I*. Springer: 173-262 (1990)
56. Riede U-N, Drexler H, Ihling C, Kaiserling E, Müntefering H: Kardiovaskuläres System. In: Riede U-N, Werner M, Schaefer H-E (Hrsg): *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Thieme: 421-498 (2004)
57. Rigler R, Pramanik A, Jönasson P, Kratz G, Jansson O, Nygren P-A, Stahl S, Ekberg K, Johansson B-L, Uhlen S, Uhlen M, Jörnvall H, Wahren J: Specific binding of proinsulin C-peptide to human membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1318-1323 (1999)
58. Ross R: Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 340(2): 115-126 (1999)

59. Ross R: The Pathogenesis of Atherosclerosis - An Update. *N Engl J Med* 314(8): 488- 500 (1986)
60. Ross R: The Pathogenesis of Atherosclerosis: a Perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809 (1993)
61. Ross R, Glomset JA, Kariya B, Harker L: A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 1207-1210 (1974)
62. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope D: The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46: 155-169 (1986)
63. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J: The Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study G. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *N Engl J Med* 341: 410-418 (1999)
64. Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH: Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res* 58: 427-444 (1976)
65. Semenkovich C: Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest* 116: 1813-1822 (2006)
66. Sima AAF, Grunberger G, Jörnvall H, Wahren J, Group aTC-PS: Proinsulin C-Peptide - A Consensus Statement. *Int J Exp Diabetes Res* 2: 145-151 (2001)
67. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. *Circulation* 92: 1355-1374 (1995)

68. Stavenow L, Tejler L: Growth stimulating activity from lysed cultured arterial smooth muscle cells and skin fibroblasts. *Med Biol* 63: 175-181 (1985)
69. Steiner D, Cunningham D, Spigelman L, Aten B: Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* 157: 697-700 (1967)
70. Steiner D, Oyer P: Biosynthesis of insulin and a propable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 57: 473-481 (1967)
71. Steiner DF: The Proinsulin C-Peptide - A Multirole Model. *Exp Diabetes Res* 5: 7-14 (2004)
72. Steiner DF, Clark JL, Nolan C, Rubenstein AH, Margoliash E, Aten B, Oyer P: Proinsulin and the biosynthesis of insulin. *Rec Prog Horm Res* 25: 207-292 (1969)
73. Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, Bornfeldt KE: Diabetes Accelerates Smooth Musle Cell Accumulation in Lesions of Atherosclerosis. Lack of Direct Growth-Promoting Effects of High Glucose Levels. *Diabetes* 50: 851-860 (2001)
74. Thomas WA, Lee KT, Kim DN: Cell population kinetics in atherogenesis. Cell births and losses in intimal cell mass-derived lesions in the abdominal aorta of swine. *Ann N Y Acad Sci* 454: 305-315 (1985)
75. Thyberg J, Hedin U, Sjölund M, Palmberg L, Bottger BA: Regulation of Differentiated Properties and Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 10: 966-90 (1990)
76. Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A: Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 22: 920-924 (1999)
77. Velarde V, Jenkins AJ, Christopher J, Lyons TJ, Jaffa AA: Activation of MAPK by modified low-density lipoproteins in vascular smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 91: 1412-1420 (2001)

78. Verchere C, Paoletta M, Neerman-Arbez M, Rose K, Irminger J, Gingerich R, Kahn S, Halban P: Des-(27-31)C-Peptide. A novel secretory product of the rat pancreatic beta cell produced by truncation of proinsulin connecting peptide in secretory granules. *J Biol Chem* 271: 27475-27481 (1996)
79. Wahren J, Shafqat J, Johansson J, Chibalin A, Ekberg K, Jörnvall H: Molecular and Cellular Effects of C-Peptide - New Perspectives on an Old Peptide. *Exp Diabetes Res* 5: 15-23 (2004)
80. Walcher D, Aleksic M, Jerg V, Hombach V, Zieske A, Homma S, Strong J, Marx N: C-Peptide Induces Chemotaxis of Human CD4-Positive Cells. *Diabetes* 53: 1664-1670 (2004)
81. Wang CCL, Goalstone ML, Draznin B: Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes* 53: 2735-2740 (2004)
82. Yang CM, Lin MI, Hsieh HL, Sun CC, Ma YH, D HL: Bradykinin-induced p42/p44 MAPK phosphorylation and cell proliferation via Src, EGF receptors and PI3-K/Akt in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 203: 538-546 (2005)
83. Zhong Z, Davidescu A, Ehren I, Ekberg K, Jörnvall H, Wahren J, Chibalin A: C-peptide stimulates ERK 1/2 and JNK MAP kinases via activation of protein kinase C in human renal tubular cells. *Diabetologia* 48: 187-197 (2005)
84. Zhong Z, Kotova O, Davidescu A, Ehren I, Ekberg K, Jörnvall H, Wahren J, Chibalin A: C-peptide stimulates Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase via activation of ERK 1/2 MAP kinases in human renal tubular cells. *Cell Mol Life Sci* 61: 2782-2790 (2004)