

Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. G. Adler

Sektion Nephrologie
Leiter: Prof. Dr. F. Keller

Einfluss von TGF- β auf die N-Cadherin-Expression und das Migrationsverhalten vaskulärer glatter Muskelzellen

Dissertation

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

vorgelegt von
Johannes Michael Nüßle
aus Ulm
2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. Stracke

2. Berichterstatter: PD Dr. Menke

Tag der Promotion: 17.11.2011

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Shuntstenose und Atherosklerose	1
1.2 Vaskuläre glatte Muskelzellen	3
1.3 Cadherine	6
1.4 TGF- β	8
1.5 Fragestellung	12
2. Material und Methodik	14
2.1 Materialien	14
2.2 Zellkultur	19
2.3 Migrationsassay	20
2.4 Western Blot	23
2.5 RNA-Isolation	26
2.6 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	29
3. Ergebnisse	33
3.1 Migrationsverhalten vaskulärer glatter Muskelzellen unter TGF- β - Stimulation <i>in vitro</i>	33
3.2 Genexpression vaskulärer glatter Muskelzellen unter TGF- β -Stimulation <i>in vitro</i>	35
3.3 Proteinmuster vaskulärer glatter Muskelzellen unter TGF- β -Stimulation <i>in vitro</i>	39
4. Diskussion	46
4.1 Charakterisierung des Migrationsverhaltens vaskulärer glatter Muskelzellen <i>in vitro</i>	46
4.2 Charakterisierung der Genexpression in vaskulären glatten Muskelzellen unter Stimulation <i>in vitro</i>	50
4.3 Effekt von TGF- β 1 auf Proteine in vaskulären glatten Muskelzellen <i>in vitro</i>	52

4.4 Schlussfolgerungen.....	56
5. Zusammenfassung.....	58
6. Literaturverzeichnis	60
Danksagung	69
Lebenslauf.....	70

Abkürzungsverzeichnis

ALK	Activinrezeptor-ähnliche Kinase
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CASMC	Koronararterielle glatte Muskelzelle
Co-Smad	Gemeinsames Smad
CRP	C-reaktives Protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin
ECL	Verstärkte Chemolumineszenz
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immuntest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EPLIN	<i>epithelial protein lost in neoplasm</i>
ERK	Extrazellulär signalregulierte Kinase
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O dest. steril	Destilliertes, steriles Wasser
HAV	Histidin-Alanin-Valin
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IFN-γ	Interferon-gamma
I-Smad	Inhibitorisches Smad
JNK	C-Jun N-terminale Kinase

kb	Kilobasen
LABP	Latentes TGF- β -bindendes Protein
LAP	Latenz-assoziiertes Peptid
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktives Protein-1
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mRNA	Boten-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
N-Cadherin	Neurales Cadherin
p120ctn	p120-Catenin
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Thrombozyten-Wachstumsfaktor
PE	Polyethylen
PI 3-Kinase	Phosphoinositid 3-Kinase
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
R-Cadherin	Retinales Cadherin
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
R-Smad	Rezeptor-reguliertes Smad
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde

SMC	Glatte Muskelzelle
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
Taq	Thermus aquaticus DNA-Polymerase
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS + Tween 20 (Waschpuffer für Western Blot)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor-beta
TNS	Trypsin-neutralisierende Lösung
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
VE-Cadherin	Vaskulär-endotheliales Cadherin
VSMC	Vaskuläre glatte Muskelzelle

1. Einleitung

1.1 Shuntstenose und Atherosklerose

Patienten, die unter Nierenerkrankungen leiden, insbesondere unter chronischer Niereninsuffizienz, werden im Laufe ihres Lebens häufig dialysepflichtig. Um einen möglichst komplikationsarmen und langlebigen Dialysezugang gewährleisten zu können bedient man sich verschiedener Techniken. Dazu gehören die Anlage einer nativen arteriovenösen Fistel in unterschiedlichen Ausführungen, die Verwendung eines Kunststoff-Shunts aus Polytetrafluorethylen (PTFE) sowie die Nutzung eines doppellumigen Silikonkatheters zur Dialyse. In Deutschland wird bei langfristig dialysepflichtigen Patienten hauptsächlich auf die Anlage einer arteriovenösen Fistel vertraut, die im Hinblick auf Infektionsgefahr, Thromboserate und Folgekosten als bestes der genannten Verfahren beurteilt wird. Dabei muss man dennoch bei mindestens 20% - 30% der Patienten mit einem Versagen der Therapie innerhalb der ersten zwei Jahre rechnen (Ravani et. al. 2007, Roy-Chaudhury et. al. 2006).

Das Risiko von Komplikationen ist somit nicht unerheblich. Zwei Hauptursachen des Therapieversagens der arteriovenösen Fistel sind zu nennen: Das fehlende Ausreifen der Fisteln, das zu einem frühen Therapieversagen (innerhalb des ersten Monats) führt und die venöse neointimale Hyperplasie, die auf lange Sicht (spätes Therapieversagen, später als drei Monate nach Therapiebeginn) zur Shuntstenose führen kann (Mercado et. al. 2008).

Die Shuntstenose, d.h. eine stenotische Läsion in Hämodialyse-Shunts, stellt ein wichtiges Gebiet der Grundlagenforschung dar. Die Pathologie der Shuntstenose ist bislang unzureichend geklärt und bedarf sowohl klinischer als auch biologischer Aufklärung. Nur so können auch effektive therapeutische Strategien erarbeitet werden, die dem Patienten nutzen (Besarab et. al. 2007).

Ähnlich wie dies in atherosklerotischen Gefäßwänden bekannt ist, weisen stenotische Läsionen in Hämodialyse-Shunts Veränderungen im Sinne einer neointimalen Hyperplasie auf. Zudem scheinen in diesem Kontext auch entzündliche Vorgänge eine Rolle zu spielen. Hierbei kommt Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1 und IGF-I eine wichtige Bedeutung zu (Stracke et. al. 2002). Das genaue Zusammenspiel dieser Faktoren und der beteiligten Zelltypen ist bisher

nur in Grundzügen verstanden und daher Gegenstand der aktuellen Forschung in den Fachgebieten Nephrologie und Biologie.

Ein weiteres Krankheitsbild, das im Blickpunkt der Grundlagenforschung steht, ist die Atherosklerose.

Als Atherosklerose bezeichnet man eine systemische Erkrankung, die zu einer Verhärtung der Gefäße führt und fokal oder diffus auftreten kann. Die klinische Bedeutung der Atherosklerose besteht vor allem in den Folgeerkrankungen und Komplikationen, die im Gefäßsystem durch atherosklerotische Veränderungen auftreten können. Weltweit stellen die Folgeerkrankungen der Atherosklerose die Haupttodesursache dar; in den westlichen Industrienationen versterben sogar mehr als 50% der Menschen an den Folgen Atherosklerose induzierter Komplikationen (Kreuzer u. Tiefenbacher 2003, Lusis 2000). In den letzten Jahrzehnten stieg die Prävalenz der Atherosklerose und ihrer Begleit- und Folgeerscheinungen weltweit stetig an. Nicht zu verwechseln ist Atherosklerose mit der Arteriosklerose und der Arteriolosklerose. Letztere Begriffe beschreiben eine Verhärtung von Gefäßwänden bestimmter Größe, allerdings ohne Bezug auf die Pathogenese dieser Veränderung (Kumar et. al. 2007). Mit Atherosklerose ist die Verdickung der Gefäßwand im Sinne der Ablagerung von Lipidbestandteilen und verschiedener Zellen unter Aufrechterhaltung einer chronischen Entzündungsreaktion in der Gefäßwand gemeint. Beginnend mit einer Zellschädigung, die zur endothelialen Dysfunktion führt, ist im Verlauf die Ausbildung atherosklerotischer Plaques in der Intima der Gefäßwände von zentraler Bedeutung (Mitchell u. Sidawy 1998).

An der Entstehung der Atherosklerose sind eine Vielzahl von Zellen und Faktoren in und an der Gefäßwand beteiligt. Die wichtigsten Zelltypen, die an der Ausbildung von atherosklerotischen Plaques mitwirken, sind Endothelzellen, Monozyten, Lymphozyten und vaskuläre glatte Muskelzellen (siehe 1.2). Ebenso sind in Form des Thrombozyten-Wachstumsfaktors (PDGF), dem Transformierenden Wachstumsfaktor-beta (TGF- β) und Interferon-gamma (IFN- γ) viele Zytokine und Wachstumsfaktoren an der Pathogenese beteiligt (Doran et. al. 2008, Raines u. Ross 1993).

Bei der Entstehung der Atherosklerose spielen neben den genetischen Faktoren auch Umwelteinflüsse eine Rolle. Dazu zählen Ernährungsgewohnheiten,

körperliche Inaktivität und andere bekannte kardiovaskuläre Risikofaktoren wie z.B. Rauchen oder Diabetes mellitus.

Alle genannten Faktoren können dazu beitragen, dass die chronische entzündliche Aktivität in den Gefäßwänden aufrechterhalten und dadurch auch das Fortschreiten der Atherosklerose unterstützt wird (Stoll u. Bendszus 2006, Sary et. al. 1994). Erhöhte Serumspiegel an C-reaktivem Protein (CRP) und anderen Akute-Phase-Proteinen belegen, dass Entzündungsvorgänge neben der Ablagerung von Lipiden eine Rolle bei der Initiation und der Progression der Atherosklerose spielen (Santos et. al. 2008).

Somit stellen sowohl die Shuntstenose als auch die Atherosklerose bedeutende Pathologien dar, die gerade in ihren Grundzügen noch unzureichend verstanden sind und deshalb intensiv erforscht werden müssen. Dabei spielen sich – nach bisherigem Kenntnisstand – in ihrer Konsequenz recht ähnliche pathologische Vorgänge im Sinne der neointimalen Hyperplasie ab. Dennoch bestehen deutliche Unterschiede: Shuntstenosen entwickeln sich nach Fistelanlage in arterialisierten Venen während atherosklerotische Veränderungen ganz überwiegend das arterielle Gefäßgebiet betreffen. Außerdem spielen bei der Entstehung von Shuntstenosen die Plaqueformation und Schaumzellen keine Rolle. Stenosen in Hämodialyse-Shunts weisen zudem zu atherosklerotischen Gefäßwänden eine konzentrisch und nicht exzentrisch verdickte Neointima auf (Lee u. Roy-Chaudhury 2009). Beiden Pathologien gemeinsam ist allerdings der Einfluss vaskulärer glatter Muskelzellen auf ihre Entstehung und Aufrechterhaltung.

1.2 Vaskuläre glatte Muskelzellen

Die eigentliche Funktion vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMCs) besteht vor allem in der Regulation des Gefäßdurchmessers durch ihre kontraktile Eigenschaften. VSMCs befinden sich primär in der Tunica media (kurz Media) des jeweiligen Gefäßes. Die Tunica media ist die mittlere Schicht der Gefäßwand, die vom Gefäßlumen durch die Tunica interna (auch Intima genannt) und vom umliegenden Gewebe durch die Tunica externa getrennt ist. Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie dies bei der Shuntstenose und der Atherosklerose der Fall ist, findet man jedoch auch eine Migration der

Muskelzellen in die Intima. Dabei kommt es nach einer Gefäßläsion zunächst noch innerhalb der Media zur Stimulation des Wachstums der Zellen, dem dann die Migration der VSMCs in die Intima folgt. Dort kommt es anschließend zu einer weiteren Proliferation der Zellen (Raines u. Ross 1993). Dieser Vorgang wird als neointimale Hyperplasie bezeichnet und stellt sowohl einen Kernpunkt der atherosklerotischen Pathogenese als auch der Entstehung von Shuntstenosen dar. Ermöglicht wird die Migration der VSMCs u.a. durch Matrix-Metalloproteinasen. Diese Enzyme können sowohl extrazelluläre Matrix als auch Cadherin-abhängige Zell-Zell-Kontakte auflösen (siehe 1.3) und den Zellen somit eine Migration aus der Media in die Intima ermöglichen (Newby 2005). Auch phänotypisch zeigen die Muskelzellen nach Migration in die Intima Veränderungen auf. Während die in der Media lokalisierten Zellen ausnahmslos einen kontraktile Phänotyp aufweisen, so zeigen die VSMCs nach Migration in die Intima überwiegend synthetisch-proliferative Eigenschaften. Der kontraktile Phänotyp weist zytoplasmatisch viele Myofilamente auf, während beim synthetisch-proliferativen Typ der VSMCs vor allem ein stark ausgeprägter Golgi-Apparat und ein umfangreiches endoplasmatisches Retikulum unter Verlust eines Großteils der Myofilamente auffallen (Thyberg et. al. 1995). Im Gegensatz zu Shuntstenosen findet sich bei atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden eine exzentrische Lage der VSMCs, Shuntstenosen zeichnen sich durch eine konzentrische Neointima aus.

Der Großteil an extrazellulärer Matrix, der sich in atherosklerotischen Plaques findet, wird von den aus der Media eingewanderten glatten Muskelzellen synthetisiert. Außerdem ist die gesamte Plaquestabilität in großem Maße von den vaskulären glatten Muskelzellen und ihrer Proliferation abhängig (Stoneman u. Bennett 2004).

Zwar tragen die VSMCs durch ihre Migration und Proliferation zur Ausbildung von atherosklerotischen Plaques und damit zur Einengung des Gefäßlumens bei, dennoch erfüllen sie auch eine protektive Funktion, indem sie die Plaques vor Ruptur bewahren und dadurch eine Thrombusentstehung verhindern können (Newby u. Zaltsman 1999). Im Verlauf der Krankheitsentstehung können die Plaques durch fibrotischen Umbau und Verarmung an VSMCs zusätzlich geschwächt und damit anfällig für Komplikationen werden. Von entscheidender Bedeutung für die Entstehung von Komplikationen durch eine Plaqueruptur ist

zudem die Plaquearchitektur: Exzentrische Plaques haben durch höhere mechanische Belastung ein größeres Risiko Einrisse zu erleiden oder komplett zu rupturieren als vergleichbar große Plaques, die eine zirkuläre Architektur über die komplette Gefäßwand hinweg zeigen. Meistens geschehen diese Ereignisse in der Schulterregion der Plaques, die eine mechanische Schwachstelle darstellt (Lee 2000), was Abbildung 1 verdeutlicht.

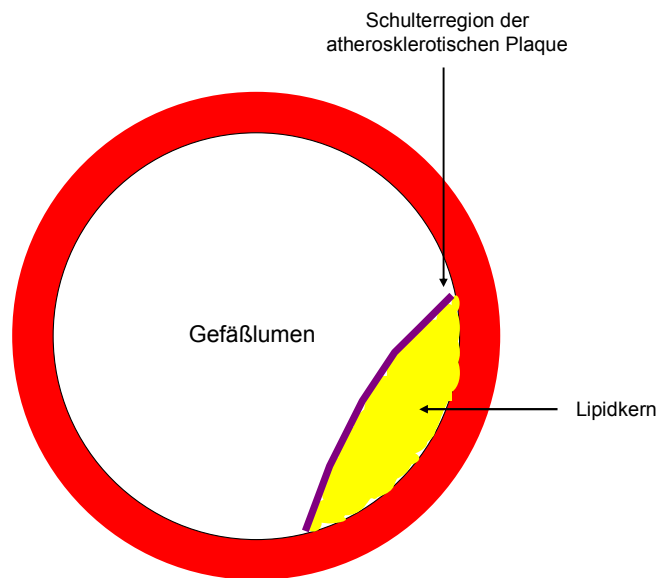


Abbildung 1 Exzentrische Plaquearchitektur mit Einengung des Gefäßlumens.

Bemerkenswert bei der Entstehung exzentrisch gelegener Plaques ist, dass die exzentrische Lage nicht nur auf eine dortige Verletzung der Gefäßwand im Sinne der response-to-injury-Hypothese nach Ross und Glomset zurückzuführen ist, sondern sich schon vereinzelt glatte Muskelzellen in der Intima der Gefäßwand befinden, bevor atherosklerotische Veränderungen auftreten. Die exzentrische Lage dieser Zellen korreliert mit der Lage, in der später atherosklerotische Veränderungen auftreten. Deshalb kann den VSMCs nicht ausschließlich eine Bedeutung bei der Progression der Atherosklerose nach bereits vorliegender endothelialer Dysfunktion zugeschrieben werden; vielmehr spielen VSMCs auch bei der Initiation und frühen Entwicklung der Atherosklerose eine Rolle (Doran et. al. 2008). Somit können VSMCs in allen Phasen der Entstehung atherosklerotischer Plaques und ebenso als Schlüsselfaktor in der Pathogenese von Shuntstenosen ein potentielles Ziel therapeutischer Interventionen darstellen.

Bei der Entstehung beider Pathologien durch den Einfluss von VSMCs sind auch Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, wie etwa Cadherine von Bedeutung.

1.3 Cadherine

Cadherine sind Calcium-abhängige Adhäsionsmoleküle, zu deren Hauptaufgabe die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten gehört. Es handelt sich bei Ihnen um transmembranäre Glykoproteine, die zur Ausbildung von interzellulären Kontakten Kalziumionen (Ca^{2+}) benötigen (Niessen u. Gottardi 2008).

Beim Menschen sind mehr als 80 Untertypen von Cadherinen nachgewiesen. Cadherine können in klassische (Typ I und II) und nicht-klassische Cadherine unterteilt werden. Zu den Vertretern der klassischen Typ I-Cadherine zählen E-, N- und P-Cadherin. Das vaskuläre VE-Cadherin zählt zu den klassischen Cadherinen des Typs II. Die Gruppe klassischer Cadherine zeichnet sich durch drei Domänen aus, eine extrazelluläre, eine transmembranäre und eine zytoplasmatische Domäne. Diese Cadherine bilden intrazellulär Komplexe mit Cateninen. Die extrazelluläre Domäne eines klassischen Cadherins besitzt fünf Bindungsstellen für Ca^{2+} und ermöglicht durch Homodimerisierung mit einem Cadherin-Molekül einer benachbarten Zelle die Ausbildung eines Zell-Zell-Kontaktes (George u. Beeching 2006). Die Homodimerisierung wird über ein Tripeptid vermittelt, das die Sequenz Histidin-Alanin-Valin (HAV) aufweist. Diese Sequenz findet sich bei allen klassischen Typ I-Cadherinen. Die restlichen Aminosäuresequenzen der Cadherine zeichnen die jeweilige Bindungsspezifität aus (George u. Beeching 2006, Alattia et. al. 1999).

Die intrazelluläre Domäne klassischer Cadherine steht über α - und β -Catenin und weiteren weniger gut charakterisierten Proteinen mit Aktinfilamenten und damit mit dem stabilisierenden Zytoskelett in Verbindung. Außerdem bindet das zu den Cateninen gehörende p120ctn direkt an die zytoplasmatische Domäne und wird als Stabilisator des Cadherin-Catenin-Komplexes angesehen. Neuere Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass EPLIN (*epithelial protein lost in neoplasm*) an der Interaktion von α -Catenin mit den Aktinfilamenten beteiligt ist. Abe und Takeichi konnten diesen Zusammenhang in epithelialen Zellen nachweisen. Demnach kann ohne EPLIN kein funktionierender Cadherin-Catenin-Aktin-Komplex gebildet

werden und es kommt zusätzlich zu einer Destabilisierung von F-Aktin (Abe u. Takeichi 2008, Weis u. Nelson 2006).

Durch die Interaktion mit β -Catenin sind die Cadherine außerdem am Wnt/APC-Signalweg beteiligt und haben dadurch neben ihrer mechanischen auch signaltransduzierende Eigenschaften. Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau klassischer Cadherin-Komplexe und ihrer Verbindung zum Zytoskelett. Die genaue Lokalisation von EPLIN ist nicht hinreichend geklärt und daher in Abbildung 2 nicht dargestellt.

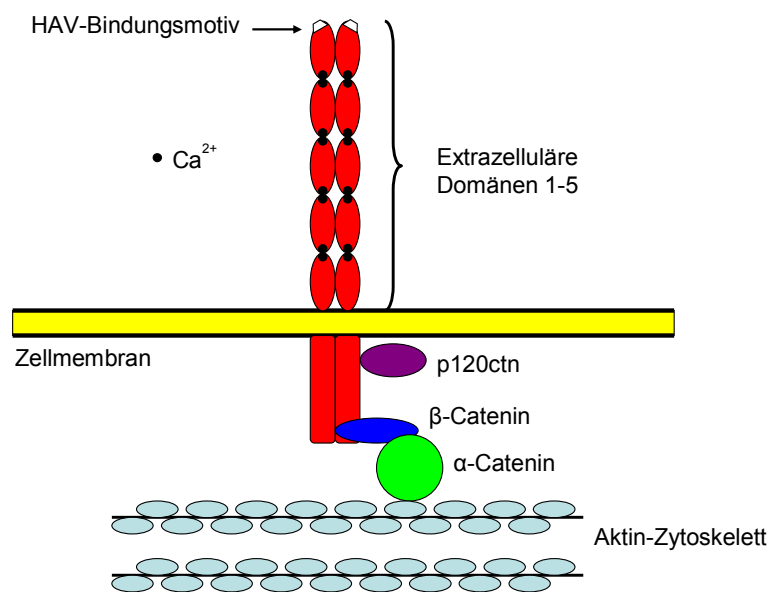


Abbildung 2 Aufbau klassischer Cadherin-Komplexe. Zur homodimeren Bindung ist das HAV-Motiv (Histidin-Alanin-Valin) nötig. p120ctn (p120-Catenin), β -Catenin (Beta-Catenin) und α -Catenin (Alpha-Catenin) verankern die intrazelluläre Domäne eines Cadherins mit dem Aktin-Zytoskelett. Calciumionen (Ca^{2+}) sind schwarz dargestellt.

In vaskulären glatten Muskelzellen sind die klassischen Cadherine R- und N-Cadherin sowie das nicht-klassische T-Cadherin, welches keine zytoplasmatische Domäne besitzt, von Bedeutung. E-Cadherin hingegen wird in normalen VSMCs nicht exprimiert. Nur in Muskelzellen, die in bereits atherosklerotisch veränderten Gefäßen vorkommen, findet sich auch E-Cadherin (Moiseeva 2001). N-Cadherin stellt in VSMCs ein wichtiges Adhäsionsmolekül dar. Neben seiner mechanisch stabilisierenden Eigenschaft ist es auch in der Lage, das Zellwachstum,

apoptotische Vorgänge sowie das Migrationsverhalten zu modulieren (Resink et. al. 2009, George u. Beeching 2006).

Auch einige Wachstumsfaktoren spielen in diesen Zellvorgängen eine wichtige Rolle als Regulatoren. Dazu gehören unter anderem Mitglieder der TGF- β -Superfamilie.

1.4 TGF- β

Heutzutage sind mehr als 60 Mitglieder der TGF- β -Superfamilie bekannt. Dazu gehören neben den drei bekannten TGF- β -Isoformen (TGF- β 1-3) auch eine Vielzahl an Activinen, Inhibinen, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und einige BMPs (*bone morphogenetic proteins*). Bei den genannten Substanzen handelt es sich um multifunktionelle Regulatoren diverser Zellprozesse. Dazu gehören beispielsweise Migration, Proliferation, Zelldifferenzierung, Zellstabilität, Bildung extrazellulärer Matrix (ECM) und Apoptose. Außerdem spielen Mitglieder der TGF- β -Superfamilie eine Rolle während der Embryo- und Ontogenese (Grainger 2004, Verrecchia u. Mauviel 2007, Ruiz-Ortega et. al. 2007, Giehl et. al. 2007).

Unter den aufgeführten Substanzen stellt TGF- β einen wichtigen Vertreter der TGF- β -Superfamilie dar. TGF- β besitzt mit den drei Isoformen eine große Variabilität in seinem Einfluss auf verschiedenste Funktionen der meisten Zellen. Insbesondere hat TGF- β große Bedeutung in physiologischen und pathologischen Prozessen der Gefäßwände. Dabei werden alle Zellen aus denen sich die Gefäßwand zusammensetzt von TGF- β in ihrem Verhalten reguliert. Die Wirkungsweise von TGF- β zeichnet sich dabei sowohl durch endokrine als auch durch auto- und parakrine Mechanismen aus (Roberts 1998).

Durch die Beeinflussung der Zellen der Gefäßwand kommt TGF- β eine Schlüsselrolle in der Entstehung bestimmter Krankheiten, wie z.B. Atherosklerose, fibrosierender Erkrankungen sowie Autoimmunerkrankungen, zu. Des Weiteren sind auch Krebserkrankungen bekannt, die auf Mutationen in TGF- β -Genen oder Veränderungen im TGF- β -Signalweg zurückzuführen sind. Nachweislich sind erhöhte Plasmaspiegel von TGF- β 1 in einigen Krebsarten mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet. Dies gilt beispielsweise für Brustkrebs, den kleinzelligen Lungenkrebs, das Prostatakarzinom und das hepatozelluläre

Karzinom. Hierbei fällt ein früher Verlust der Wachstumskontrolle durch TGF- β auf. TGF- β wird von maligne entarteten Zellen häufig in großen Mengen synthetisiert und supprimiert dabei auch die wirtseigene Immunantwort (Barcellos-Hoff u. Akhurst 2009, Teicher 2001, Teicher 2007). Weiter findet unter Einwirkung von TGF- β auch eine epitheliale-mesenchymale Transition statt, wie man sie z.B. beim Pankreaskarzinom vorfindet. Dieser Vorgang ist u.a. bei der Metastasierung primär epithelialer Tumoren zu beobachten (Ellenrieder et. al. 2001).

Auch in Entzündungsvorgängen stellt TGF- β einen wichtigen Einflussfaktor dar. TGF- β besitzt hierbei in Geweben, die ständig unter Einfluss wirtseigener und fremder Antigene stehen, wie etwa im Darmtrakt, eine immunsuppressive Funktion. Sowohl auf naive T-Zellen als auch auf Makrophagen hat TGF- β einen hemmenden Einfluss und schützt somit den Körper auch vor autoimmunen Reaktionen.

Allerdings stellt TGF- β unter Einfluss bestimmter Antigene einen proinflammatorischen Faktor dar. Kommen beispielsweise unter infektiösen Umständen sogenannte PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster) wie etwa Lipopolysaccharide aus Bakterienwänden in den Körper, so wirkt TGF- β stimulierend auf naive T-Zellen und fördert deren Differenzierung in aktive T-Helferzellen. Dies hat eine Ausschüttung von Zytokinen zur Folge und fördert insgesamt Entzündungsvorgänge und damit die Bekämpfung wirtsfremder Antigene (Sanjabi et. al. 2009).

Stracke et. al. zeigten außerdem eine erhöhte Produktion von TGF- β in stenotischen Läsionen von Hämodialyse-Shunts. Hierbei wird die durch TGF- β stimulierte Bildung von extrazellulärer Matrix und damit auch die Neointima-Bildung unterstützt, was letztendlich zur Stenosierung der Shunts beiträgt. Am Ort der Läsionen wird TGF- β sowohl von Immunzellen (Lymphozyten, Makrophagen) als auch von vaskulären glatten Muskelzellen synthetisiert (Stracke et. al. 2002).

Auch in der Bypass-Chirurgie konnte ein Zusammenhang zwischen neointimaler Hyperplasie und erhöhter TGF- β 1-Konzentration nachgewiesen werden. So zeigten in Bypass-Patienten schon vor der Bypass-Anlage venöse Segmente (V. saphena magna) eine höhere TGF- β 1-Konzentration als arterielle Segmente (A. thoracica interna). Diese Tatsache korreliert mit einer stärkeren neointimalen Hyperplasie in venösen Segmenten als in arteriellen Segmenten. Dies ist eine

weitere Erklärung, warum venöse Segmente in diesem Kontext früher stenosieren als arterielle Segmente (Friedl et. al. 2004).

Substanzen der TGF- β -Superfamilie werden als inaktive Proteine synthetisiert. Im Fall von TGF- β spricht man dabei vom latenten TGF- β , das keine biologische Aktivität aufweist. Dieses Vorläufermolekül besteht aus einer Hauptregion und einem Latenz-assoziierten Peptid (LAP), das wiederum in extrazellulärer Umgebung über ein latentes TGF- β -bindendes Protein (LTBP) in der Matrix verankert werden kann. Dort findet anschließend die Aktivierung der TGF- β -Moleküle durch proteolytische Aktivität verschiedener Enzyme, wie z.B. Plasmin oder Matrix- Metalloproteinasen statt. Außerdem kann TGF- β auch durch Proteine der extrazellulären Matrix aktiviert werden, zu denen u.a. Thrombospondin-1 zählt (Ruiz-Ortega et. al. 2007, Grainger 2004).

Aktives TGF- β stellt seine Wirkung durch Bindung an spezifische TGF- β -Rezeptoren her. Die Transduktion des TGF- β -Signals in das Zellinnere wird durch die Typ I- und Typ II-TGF- β -Rezeptoren sichergestellt. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um transmembranäre Glykoproteine, die jeweils Serin-Threonin-Kinaseaktivität aufweisen (ten Dijke u. Hill 2004, Lin et. al. 2006). Von diesen Rezeptoren existieren jeweils noch Untergruppen; bei Säugetieren sind mittlerweile 7 Typ I- und 5 Typ II-Rezeptoren nachgewiesen. Der TGF- β -Rezeptor vom Typ I wird auch als Activinrezeptor-ähnliche Kinase (ALK) bezeichnet (Bertolino et. al. 2005).

Durch Bindung von TGF- β an den Typ II-Rezeptor kommt es zu einer heteromeren Komplexbildung von Typ II- und Typ I-Rezeptor und einer dadurch verursachten Konformationsänderung des Typ I-Rezeptors sowie einer Aktivierung desselben durch eine vom Typ II-Rezeptor hervorgerufene Transphosphorylierung. Die Kinase des aktivierten Typ I-Rezeptors kann nun wiederum bestimmte Zellproteine phosphorylieren und damit deren Aktivität regulieren. Zu den wichtigsten Proteinen, die durch Phosphorylierung nach TGF- β -Bindung aktiviert werden, zählen die Smad-Proteine. In der Gruppe der Smad-Proteine kann man rezeptor-regulierte Smads (R-Smads), das gemeinsame Smad (Co-Smad) und inhibitorische Smads (I-Smads) unterscheiden. Zu den R-Smads werden Smad1, 2, 3, 5 und 8 gerechnet. Smad4 stellt das Co-Smad dar, während Smad6 und 7 als I-Smads gelten.

Nach Phosphorylierung eines R-Smads kann die Bildung eines Komplexes zwischen diesem aktivierten R-Smad und dem gemeinsamen Smad erfolgen. Dieser Komplex kann anschließend in den Zellkern translozieren und dort die Genexpression regulieren. Diese Regulation kann auf zwei Arten geschehen. Entweder der Komplex aus dem R-Smad und Smad4 fungiert alleine als Transkriptionsfaktor, oder der Komplex bindet an im Kern lokalisierte andere Transkriptionsfaktoren, die dadurch in ihrer Aktivität reguliert werden und ihrerseits die Genexpression steuern können. Die zweite Regulationsart ist häufiger, da die Bindung des Komplexes aus R-Smad und Smad4 an DNA eher schwach ausgeprägt ist.

Zwei hauptsächliche Smad-Signalwege sind bekannt. Einerseits führt eine Aktivierung der ALK4, 5 oder 7 zur Phosphorylierung der Smad-Proteine 2 und 3. Andererseits sorgen aktivierte ALK1, 2, 3 oder 6 für eine Aktivierung der Smads 1, 5 und 8. In jedem Fall folgt anschließend eine Rekrutierung von Smad4 durch die aktivierten R-Smads (Bertolino et. al. 2005, Castañares et. al. 2007). Die I-Smads regulieren die TGF- β -Signalkaskade in negativer Weise, indem sie mit den R-Smads sowohl um die Bindung am Co-Smad (gilt für Smad6) als auch am Rezeptor (gilt für Smad7) konkurrieren. Außerdem unterstützen die I-Smads die Degradation der TGF- β -Rezeptoren (Lin et. al. 2006, Ruiz-Ortega et. al. 2007).

Neben den klassischen TGF- β -Smad-Signalwegen gibt es allerdings auch Smad-unabhängige Signaltransduktionswege in Zusammenhang mit TGF- β . Einige dieser Smad-unabhängigen Signalwege sind in der Genese von Tumorerkrankungen von Bedeutung. Hierzu zählen u.a. die Aktivierung von Rho-GTPasen und der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinasen) p38, der Extrazellulär signalregulierten Kinasen (ERK) 1 und 2, der C-jun N-terminalen Kinase (JNK) und der Phosphoinositid 3-Kinase (PI 3-Kinase) (Giehl et. al. 2007, Ruiz-Ortega et. al. 2007, Moustakas u. Heldin 2005). Die TGF- β -Signalwege sind in Abbildung 3 zusammenfassend aufgegriffen.

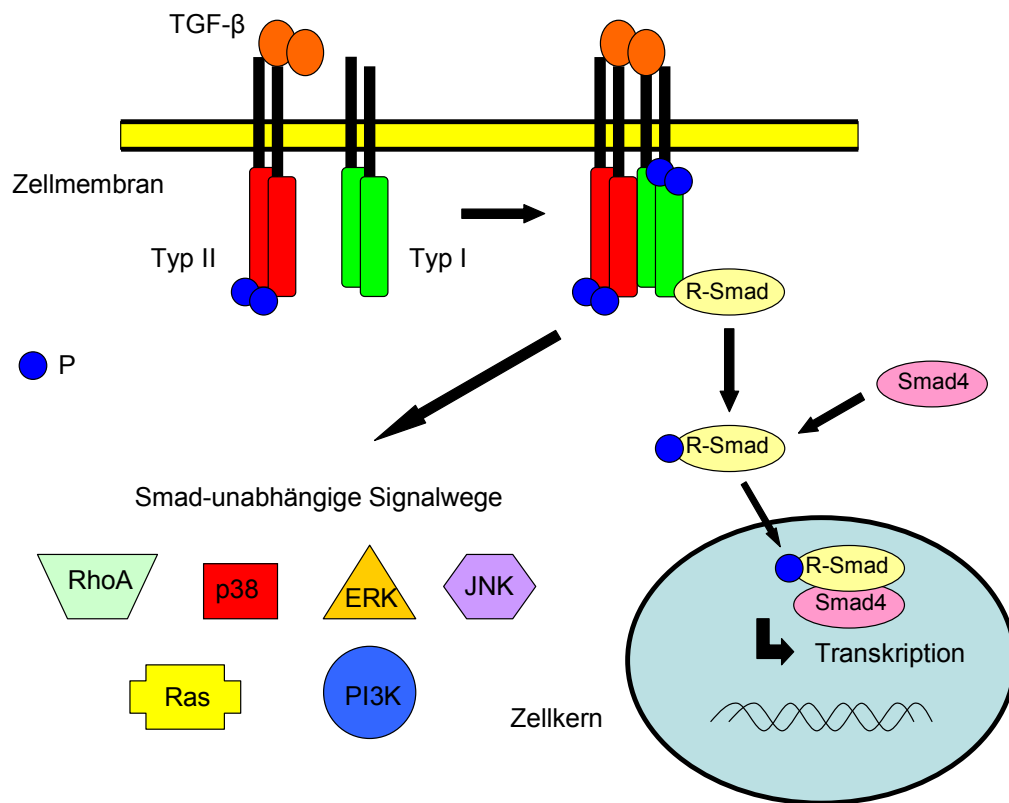


Abbildung 3 TGF- β -Signalwege (vereinfacht). Dargestellt sind Smad-abhängige Signalwege, die über Aktivierung der R-Smads (rezeptor-regulierte Smads) initiiert werden. Smad4 stellt das Co-Smad (gemeinsames Smad) dar. Zur Smad-unabhängigen Signaltransduktion gehören die Kinasen RhoA (*Ras homolog gene family, member A*), p38, ERK (Extrazellulär signalregulierte Kinase), JNK (C-Jun N-terminale Kinase), Ras (*Rat sarcoma*) und PI 3K (Phosphoinositid 3-Kinase). Phosphatreste sind als blaue Kreise dargestellt.

1.5 Fragestellung

Stenosen in arteriovenösen Hämodialyse-Fisteln zählen zu den häufigsten Ursachen von spätem Therapieversagen bei dialysepflichtigen Patienten.

Atherosklerose stellt eine wichtige Volkserkrankung dar, deren Pathogenese nicht vollständig verstanden ist. Deshalb sind beide Pathologien Gegenstand aktueller, intensiver Forschung.

Die Rolle von TGF- β im Kontext von Shuntstenosen und atherosklerotischen Veränderungen ist bisher nicht befriedigend geklärt. Sowohl protektive als auch schädigende Einflüsse auf die Gefäßwand werden diskutiert. Auch der Einfluss von TGF- β auf das Migrationsverhalten von glatten vaskulären Muskelzellen stellt sich in den bisherigen Forschungsergebnissen kontrovers dar. Deshalb sollte in

der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von TGF- β in der Regulation humaner VSMCs untersucht werden.

Der gewählte Ansatz befasste sich insbesondere mit der Analyse der Wirkung von TGF- β auf die Migration von VSMCs und den Einfluss von TGF- β auf die Zell-Zelladhäsion. Neben der quantitativen Beschreibung der TGF- β -induzierten Veränderungen in VSMCs war es das Ziel dieser Arbeit, die molekularen Zusammenhänge zwischen TGF- β -Stimulation und den zu identifizierenden zellulären Vorgängen zu analysieren.

2. Material und Methodik

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Alle Chemikalien und Lösungen wurden in höchster erhältlicher Reinheit von den Firmen Abcam, Amersham Life Science, Anamed, BD Bioscience, Biomers.net, Calbiochem, Cell Signaling Technology, FMC Bioproducts, Invitrogen, Kindler, Lonza, Mallinckrodt Baker, Merck, PAA Laboratories, Pierce Biotechnology, R&D Systems, Riedel-de Haën, Roche, Roth, Santa Cruz Biotechnology und Sigma-Aldrich bezogen.

<u>Substanz:</u>	<u>Bezeichnung:</u>	<u>Hersteller:</u>
Accutase		PAA Laboratories
Agarose	SeaKem LE Agarose	FMC Bioproducts
β-Mercaptoethanol		Merck
DEPC-Wasser		Sigma-Aldrich
EDTA		Merck
ECL-Entwicklerlösung	ECL Western Blotting Detection	Amersham Life Science
Einschlussmedium	Eukitt	Kindler
Ethanol (99,9%)		Riedel-de Haën
Ethidiumbromid		Sigma-Aldrich
Giemsa-Lösung		Merck
H ₂ O ₂ (30%)		Mallinckrodt Baker
HCl		Merck
Kollagen		Sigma-Aldrich
NaCl		Merck
NaOH		Merck
Milchpulver	Milchpulver Blotting grade	Roth
Oligo(dT)-Primer		Invitrogen
PDGF-BB		R&D Systems

Phosphatpuffer	PBS Tablets	Calbiochem
Proteaseinhibitoren	Complete Mini	Roche
RT-PCR Primer		Biomers.net
Reverse Transkriptase	SuperScript II	Invitrogen
Rinderserumalbumin	BSA	Pierce Biotechnology
SDS-Gele		Anamed
TBS		Merck
TGF- β	Isoformen 1-3	R&D Systems
Tris-Base	Trizma Base	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Trizma HCl	Sigma-Aldrich
Triton X-100		Sigma-Aldrich
Trypsin		Lonza
Trypsininhibitor	TNS	Lonza
Tween 20		Sigma-Aldrich
Zellkulturmedium	SmBM (CC-3181)	Lonza
Zusätze für Zellmedium	SmGM-2 (CC-4149)	Lonza

2.1.2. Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Block-Puffer:	100 ml Proteinwaschpuffer 5 g Magermilchpulver
Elektrophoreselaufpuffer (10x):	30,3 g Tris-Base 144 g Glycin 10 g SDS wurden mit H ₂ O dest. steril auf einen pH von 8,3 eingestellt.

Vor Gebrauch wurden 45 ml Elektrophoreselaufpuffer (10x) in 405 ml H₂O dest. steril gelöst.

Lysepuffer:	50 μ l 1 M Tris-HCl, pH 7,4 300 μ l 2,5 M NaCl 45 μ l 0,5 M EDTA 500 μ l 10% Triton X-100
-------------	--

	1 Tablette Complete Mini wurde in 4055 μ l H ₂ O dest. steril gelöst.
Phosphatpuffer (PBS 1x):	Eine Tablette PBS Tablets in 1 l H ₂ O dest. steril gelöst ergibt: 10 mM PBS 140 mM NaCl 2,7 mM KCl pH 7,4
Proteinprobenpuffer (5x) Stammlösung:	33,5 ml 2 M Tris-HCl, pH 6,8 33 g Glycerin 100% 13,3 g SDS 10 mg Bromphenolblau wurden auf 100 ml mit H ₂ O dest. steril aufgefüllt.
Vor Gebrauch wurden zu 150 μ l Stammlösung 50 μ l β -Mercaptoethanol (99%) hinzugefügt. Zur Durchführung der Western Blots wurde zu 4 Teilen Proteinprobe jeweils ein Teil Proteinprobenpuffer gegeben, was folgende Endkonzentrationen in der Probenlösung ergab:	
	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 5% Glycerin 5% β -Mercaptoethanol 2% SDS 0,002% Bromphenolblau
Proteintransferpuffer (10x):	30,3 g Tris-Base 112,6 g Glycerin wurden mit H ₂ O dest. steril auf einen pH von 8,3 eingestellt.
Proteinwaschpuffer (TBST):	50 ml TBS (10x) 0,5 ml Tween 20 wurden auf 500 ml mit H ₂ O dest. steril aufgefüllt.

RNA-Laufpuffer:	0,1% Orange G 30% Glycerin 0,5 µM EDTA
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS 1x):	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl wurden mit H ₂ O dest. steril auf einen pH von 7,4 eingestellt.
Zellkulturmedium:	500 ml Basalmedium (SmBM CC-3181 der Firma Lonza) + Supplement (SmGM-2 CC-4149, beinhaltet humanes EGF, Insulin, humanes FGF, FCS und Gentamicin/Amphotericin B). Zur Verwendung als Minimalmedium wurde auf die Zugabe von FCS zum Basalmedium verzichtet.

2.1.3 Antikörper

Tabelle 1 Erstantikörper für Western Blot.

Antikörper	Hersteller (Bestellnummer)	Verdünnung
Anti-Akt	Cell Signaling Technology (#9272)	1:1000
Anti-β-Aktin	Sigma (A5441)	1:5000
Anti-β-Catenin	Sigma (C2206)	1:2000
Anti-N-Cadherin	BD Bioscience (610920)	1:2000
Anti-P-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology (#9271)	1:5000
Anti-Snail1	Abcam (Ab11732)	1:500

Tabelle 2 Zweitantikörper für Western Blot (jeweils gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase).

Antikörper	Hersteller (Bestellnummer)	Verdünnung
Anti-Maus IgG	Dako (P0260)	1:20000
Anti-Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology (sc-2357)	1:10000

2.1.4 Kits

Kit:

Micro BCA Protein Assay Reagent Kit
 REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix
 RNeasy Mini Kit

Hersteller:

Pierce Biotechnology
 Sigma-Aldrich
 Qiagen

2.1.5 Laborbedarf

Artikel:

Bezeichnung:

Hersteller:

PCR-Gefäße		Biozym
Falcon-Röhrchen	10 und 50 ml	Becton Dickinson
Filter	PVDF 8 µm	Whatman
Membran Western-Blot	PVDF	GE Healthcare
Objektträger	Menzel-Gläser	Thermo Scientific
Pipetten	Reference	Eppendorf
Pipettenspitzen	epT.I.P.S.	Eppendorf
	Biosphere Filter Tips	Sarstedt
	Glas, 5 und 10 ml	Becton Dickinson
Zellschaber	Cell scraper 18 cm	Becton Dickinson
Zellkulturflaschen	Cell star 75 cm ²	Greiner Bio-one
Zellkulturplatten	6-well cell culture plates	Becton Dickinson
	96-well cell culture plates	Becton Dickinson
Zellschredder	QIAshredder	Qiagen

2.1.6 Geräte

Gerät:

Bezeichnung:

Hersteller:

Blotting-Kammer		Bio-Rad
Brutschrank	Hera cell	Heraeus
Elektrophorese-Kammer	Max Submarine Unit HE 99X	Hoefer Scientific Instruments
Elektrophorese-Netzgerät	Power Pack P 25 E 452	Biometra Consort
ELISA-Reader	Vmax Kinetic Microplate	Molecular Devices
Migrationskammer	Boyden chamber	Corning Costar

Mikroskope	Axioplan	Zeiss
	IM	Zeiss
pH-Meter	CG 804	Schott
Sicherheitswerkbank	Microflow Klasse 2	Nunc
Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf
Waage	A 120 S	Sartorius
Zählkammer	nach Neubauer	Assistent
Zentrifugen	Biofuge pico	Heraeus
	Minifuge T	Heraeus

2.1.7 Software

Programm:

Office Excel 2003

SOFTmax software for MAXline Microplate readers

Hersteller:

Microsoft

Molecular Devices

2.2 Zellkultur

Für die Versuche wurden primäre vaskuläre glatte Muskelzellen der Firma Lonza verwendet, die aus humanen Koronararterien (CASMCs, CC-2583) isoliert wurden. Es wurden Zellen der 6. bis 8. Passage herangezogen.

Die Zellen wurden jeweils in Kulturflaschen von 75 cm² Fläche in einem Gesamtvolumen von 12,5 ml Nährmedium kultiviert. Die Kulturflaschen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Unter Kontrolle der Zelldichte mittels Mikroskopie wurden die Zellen bei ausreichender Konfluenz zur Passagierung in neue Kulturflaschen überführt und weiterhin kultiviert. Dabei wurde zunächst das Nährmedium in der ursprünglichen Kulturflasche abgesaugt und die Zellen wurden mit 5 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurde mit 2 ml Trypsin das Ablösen der Zellen vorgenommen. Unter mikroskopischer Kontrolle erfolgte das vollständige Lösen der Zellen vom Flaschenboden und es wurden anschließend 4 ml Trypsin-neutralisierende Lösung (TNS) hinzugegeben, um das Trypsin zu neutralisieren. Die Zellen wurden in ein 10 ml-Röhrchen überführt und für zehn Minuten bei 1.100 Umdrehungen pro Minute (RPM) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die sich im Sediment befindlichen

Muskelzellen in Nährmedium resuspendiert und in eine neue Kulturf Flasche eingebracht.

2.3 Migrationsassay

Zur Untersuchung des Wanderungsverhaltens (Migration) von vaskulären glatten Muskelzellen wurden Versuche mit Hilfe eines veränderten Boyden-Kammer-Migrationsassays durchgeführt.

2.3.1 Aufbau der Boyden-Kammer

Um das Migrationsverhalten der vaskulären glatten Muskelzellen zu untersuchen, wurde in der Boyden-Kammer die Stimulation von VSMCs vorgenommen.

Diese Kammer besteht aus zwei getrennten Abteilungen. In die untere Abteilung werden die für die Stimulation genutzten Substanzen gegeben. Die obere Abteilung beinhaltet die Zellen, deren Migrationsverhalten untersucht werden soll. Getrennt werden die beiden Abteilungen durch eine Membran, die eine Vielzahl an Poren aufweist. Die Poren haben eine Größe von 8 μm , was eine Migration der Zellen vom oberen in das untere Kompartiment der Kammer erlaubt. Über der Membran bildet sich ein Konzentrationsgradient des jeweils verwendeten Stoffes. Dieser Gradient stellt den Stimulus für die Zellen dar. Abbildung 4 zeigt den Aufbau der Boyden-Kammer.

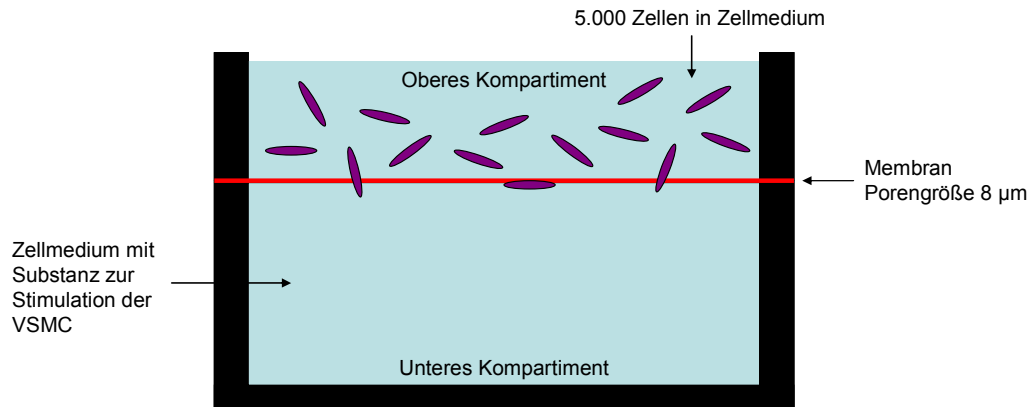


Abbildung 4 Aufbau der Boyden-Kammer. Vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMCs) durchwandern die Poren der Membran zwischen den Kompartimenten von oben nach unten. Die jeweilige Stimulationssubstanz befindet sich im unteren Kompartiment der Kammer. Die Stimulation der VSMCs erfolgt über 24 Stunden.

2.3.2 Durchführung der Migrationsversuche

Zur Vorbereitung der Zellen wurden die Kulturflaschen 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit Minimalmedium befüllt. Die Boyden-Kammer wurde zwei Stunden vor Versuchsbeginn im Brutschrank bei 37 °C gelagert.

Die in die Kammer einzubringende Membran wurde zunächst mit Kollagen beschichtet. Hierzu wurden in einer Petrischale 50 µl Kollagen in HCl zusammen mit 50 µl NaOH in 10 ml PBS gelöst. Die Membran wurde dann für vier Stunden in der Lösung bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend für eine Stunde bei RT getrocknet. Um eine Temperatur- und Bedingungsangleichung zu erreichen, wurde die Membran mit Minimalmedium bedeckt und in einer Petrischale für 20 Minuten im Brutschrank unter Zellkulturbedingungen zwischengelagert.

Zwischenzeitlich konnten die gewünschten Substanzen in die unteren Löcher der Kammer pipettiert werden. Hierzu wurden exakt 28 µl der jeweiligen Substanz (in der gewünschten Konzentration in Minimalmedium verdünnt) luftblasenfrei in das gewünschte Loch pipettiert, um ein optimales Abschließen von Membran und Flüssigkeit zu gewährleisten. Als Negativkontrolle diente Medium ohne Zusätze.

Als Positivkontrolle wurde PDGF-BB in einer Konzentration von 10 ng/ml verwendet. Jede Substanz wurde in je vier Löcher einpipettiert, so dass man bei der Auswertung das arithmetische Mittel berechnen konnte. Die Membran konnte dann von oben aufgebracht werden und die Kammer nach Einbringen einer Gummidichtung wieder zusammengesetzt und mittels Schrauben fest verschlossen werden.

Die komplett zusammengesetzte Kammer mitsamt den gewünschten Stimulationssubstanzen wurde nun vorübergehend wieder im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen abgelöst und gezählt waren. Das Ablösen der Zellen wurde durch Zugabe von Accutase durchgeführt. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl pro ml Medium bestimmt. Dazu wurden zwei Zählungen durchgeführt und das arithmetische Mittel bestimmt. Für die Migrationsversuche wurde eine Zellzahl von 109.000/ml benötigt. Bei einem festgelegten Volumen von 45,5 µl pro Loch in der oberen Abteilung der Boyden-Kammer entsprach dies einer Zellzahl von 5.000 pro Loch.

Das Einhalten der Zellzahl von 109.000/ml wurde durch Zugabe von Medium bzw. durch Zentrifugation und anschließendes Absaugen von Medium und erneutes Zählen und Angleichen des Volumens gewährleistet.

In jedes Loch des oberen Kompartiments wurden anschließend 45,5 µl der Zellsuspension (in Minimalmedium) einpipettiert und die vollständig befüllte Boyden-Kammer wurde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 24 Stunden inkubiert.

2.3.3 Färben der Membran

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Boyden-Kammer vorsichtig zerlegt und die Membran nach Giemsa gefärbt. Hierzu wurden drei Küvetten vorbereitet, die Aqua bidest., Ethanol (99,9%) und Giemsa-Färbelösung beinhaltet haben. Zunächst musste die Membran mit Aqua bidest. abgespült werden. Für zehn Minuten erfolgte dann die Fixierung der Zellen auf der Membran in Ethanol. Die eigentliche Färbung der Zellen wurde für 30 Minuten in einer Giemsa-Färbelösung vorgenommen. Vor der Überführung der gefärbten Membran auf den Objektträger folgte ein weiterer Waschschrift in Aqua bidest. Nach Aufbringen der Membran auf den Objektträger wurden die nicht migrierten Zellen auf der Oberseite der Membran mit Hilfe eines Wattetupfers vorsichtig entfernt. Die Zellen, die durch die

Membran hindurch migriert waren, befanden sich auf der Unterseite der Membran und wurden nun mit dieser für einige Minuten auf dem Objektträger getrocknet. Anschließend erfolgte das Fixieren der Membran mit einem Deckglas und Eukitt.

2.3.4 Auswertung der Migrationsversuche

Die fixierte Membran auf dem Objektträger wurde mikroskopisch beurteilt und ausgewertet. Im Lichtmikroskop wurde hierfür das 40er-Objektiv verwendet. Pro Migrationsfeld wurden fünf untereinander liegende Gesichtsfelder betrachtet und die sich darin befindenden Zellen gezählt und summiert. Pro Stimulationssubstanz wurden vier Migrationsfelder zur Auswertung herangezogen und aus den Zellzahlen dieser Felder wurde das arithmetische Mittel berechnet.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant erachtet.

2.4 Western Blot

Beim Western Blot bedient man sich zweier Techniken, der Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine nach deren Molekülgröße sowie (nach dem Transfer der Proteine auf eine Membran) der Bindung spezifischer Antikörper an die gesuchten Proteine, die dadurch sichtbar gemacht werden.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt nach dem jeweiligen Molekulargewicht. Dies wird durch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht. Natriumdodecylsulfat (SDS) sorgt für eine gleichmäßige negative Ladungsverteilung aller Proteine und ermöglicht somit die Auftrennung der Proteine allein aufgrund des spezifischen Molekulargewichtes.

Je nachdem wie der Proteintransfer auf die Membran erfolgt, kann man unterschiedliche Verfahren des Western Blots anwenden. In unserem Fall wurde das sogenannte Tank-Blot-System verwendet.

2.4.1 Vorbereitung der Zellen

Vaskuläre glatte Muskelzellen wurden unter den oben beschriebenen Zellkulturbedingungen (siehe 2.2) in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm kultiviert. Bei konfluentem Wachstum der Zellen erfolgte ein Wechsel vom

Nähr- in das Minimalmedium. Dieser Zustand wurde über 24 Stunden aufrechterhalten. Außerdem wurden die Zellen für die vorgesehenen Zeiträume mit den gewünschten Substanzen stimuliert.

2.4.2 Lyse der Zellen

Nach Stimulation der Zellen erfolgte die Lyse. Dabei wurden die Petrischalen auf Eis gekühlt, das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend dreimal mit gekühltem PBS (4 ml) gewaschen. Für 20 Minuten wurden die Zellen auf einer Wippe unter Eiskühlung mit 300 µl Lysepuffer inkubiert. Anschließend wurden die Muskelzellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgekratzt und in vorbereitete, gekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Für 10 Minuten wurden diese Gefäße bei 13.000 RPM zentrifugiert, der Überstand anschließend abpipettiert und bei -80°C tiefgefroren.

2.4.3 Proteinbestimmung

10 µl des durch Zentrifugation des Zelllysates gewonnenen Überstandes wurden für die Proteinbestimmung herangezogen. Die Proteinbestimmung wurde mittels Micro BCA Protein Assay Kit der Fa. Pierce durchgeführt.

Zur Vorbereitung wurden die drei Reagenzien des Kits nach den Angaben des Herstellers zu einer verwendbaren Lösung vermischt (Verhältnis A:B:C = 25:24:1). Je 2 µl des Zelllysates wurden anschließend mit 100 µl Aqua bidest. und 100 µl des fertig gemischten Reagenz vermischt. Dies geschah auf einer 96-Well-Platte, die für die anschließende photometrische Messung am geeignetsten ist. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für eine Stunde bei 60°C. Die photometrische Messung erfolgte dann bei Raumtemperatur bei 490 nm mit einem ELISA-Reader. Als Standardwerte dienten hierbei unterschiedliche Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA).

2.4.4 Durchführung der SDS-PAGE

Durch photometrische Messung wurden die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Proben ermittelt werden. Dadurch konnten durch Verwendung unterschiedlicher Volumina gleiche Proteinmengen für den Western-Blot herangezogen werden konnten.

Um den für die Gelelektrophorese benötigten Probenpuffer verwenden zu können, wurden unter der Sicherheitswerkbank 50 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Zu den in Reaktionsgefäßen vorbereiteten Proteinmengen wurde dann jeweils im Verhältnis 1:4 der Probenpuffer hinzupipettiert. Nach kurzem Anzentrifugieren der Proben erfolgte eine vierminütige Inkubation im Heizblock bei 95°C, wodurch Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine zerstört wurden.

Die benötigten Gele (SDS-Fertiggele) wurden für den Versuch vorbereitet. Dazu wurden die Geltaschen mit Aqua bidest. ausgespült sowie die Gele in die dafür vorgesehenen Positionen in der Gelkammer gebracht und mit Klammern befestigt. Die Gelkammer wurde vollständig mit dem Laufpuffer gefüllt. Die gesamten vorbereiteten Volumina der Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Außerdem wurden eine Leerprobe (nur Probenpuffer) und ein Größenstandard jeweils in eine Geltasche pipettiert.

Die Gelkammer wurde dann verschlossen und über das Netzgerät wurde eine Spannung von 125 V über 80 Minuten angelegt.

2.4.5 Proteintransfer oder Tank-Blot

Der nächste Schritt war der Transfer (sogenanntes Blotting) der Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran). Hierfür wurden die benötigten Schwämme und Filter zunächst für einige Minuten im Transferpuffer äquilibriert. Außerdem wurde die Membran vorbehandelt. Dazu erfolgte ein Bad in Methanol für 10 Sekunden, anschließendes Waschen in Aqua bidest. für 2 Minuten und Einlegen in Transferpuffer für 10 Minuten. Auch die Gele wurden für einige Minuten in Transferpuffer inkubiert.

Anschließend erfolgte der Zusammenbau der Gel-Kassette (Plexi-Unterteil – Schwamm – Filter – Membran – Gel – Filter – Schwamm – schwarzes Oberteil). Diese Kassette wurde in der mit Transferpuffer gefüllten Blotting-Kammer unter Kühlung (Kühlraum) für 80 Minuten einer Spannung von 80 V ausgesetzt.

Nach Beenden des Transfers wurde die Membran aus der Gel-Kassette herausgenommen und für 10 Minuten in Waschpuffer eingelegt.

2.4.6 Blocking

Auf der Membran befindliche freie Bindungsstellen mussten blockiert werden, um dort unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern, die spezifisch auf

ihre antigenen Determinanten (Epitope) binden sollten. Als Substanz für das Blocking wurde eine 5%ige Milchlösung (5 g Milchpulver in 100 ml Tris-gepufferte Salzlösung + Tween 20 (TBST) gelöst) verwendet. Die Membran wurde für eine Stunde in die 5%ige Milchlösung eingelegt.

2.4.7 Antikörperbindung

Der spezifische Antikörper (Primärantikörper), der zur Detektion des zu untersuchenden Proteins notwendig war, wurde in der gewünschten Konzentration in einem 50 ml-Röhrchen vorgelegt. In dieses Röhrchen wurde die Membran eingelegt und über Nacht unter ständigem Rollen in der verdünnten Antikörper-Lösung inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen um nicht an Protein gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend folgte die Zugabe des zweiten, unspezifischen Antikörpers auf die Membran für eine Stunde unter Bewegung auf der Wippe. Der Sekundärantikörper bindet an die F_c-Region des Primärantikörpers. Der Sekundärantikörper ist mit einem Enzym (Meerrettich-Peroxidase = HRP) gekoppelt. Nach Inkubation der Membran mit dem zweiten Antikörper erfolgte erneut ein dreimaliges Waschen der Membran mit TBST.

Um die Proteine im letzten Schritt sichtbar zu machen, wurde die ECL-Entwicklerlösung vorbereitet. Dazu wurden je 4 ml der beiden Grundsubstanzen vermischt und die Membran anschließend in der fertigen Lösung für eine Minute inkubiert. Dann wurde die Membran in doppelseitige Polyethylen-Folie (PE-Folie) eingebracht und in die Entwicklerkassette eingelegt. Je nach Belichtungszeit wurde dann ein Röntgenfilm in die Entwicklerkassette eingebracht und nach Ende der Belichtungszeit entwickelt.

2.5 RNA-Isolation

Zur genaueren Untersuchung der molekularen Vorgänge in stimulierten VSMCs wurde RNA aus den Zellen isoliert, die danach weiteren Versuchen (RT-PCR) zugänglich war. Die Isolierung der RNA wurde mittels RNeasy mini Kit der Fa. Qiagen durchgeführt.

2.5.1 Vorbereitung der Zellen

VSMCs der 7. und 8. Passage wurden jeweils bis zur Konfluenz kultiviert (Bedingungen siehe 2.2). Das Ablösen der Zellen folgte nach dem Waschen derselben mit PBS. Durch Trypsinzugabe (2 ml) und unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen abgelöst. Der Ablösevorgang wurde anschließend durch Zugabe von 4 ml TNS beendet. Die Zellen wurden in ein 10 ml-Röhrchen überführt und für zehn Minuten bei 1.100 RPM zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt und in eine 6-Well-Platte überführt, wobei jeweils 80.000 Zellen pro Well in 2 ml Nährmedium eingebracht wurden. Für 24 Stunden wurden die Zellen dort belassen. Zuletzt wurde das Nährmedium abgesaugt und durch Minimalmedium ersetzt und für weitere 24 Stunden inkubiert.

2.5.2 Stimulation und Lyse der Zellen

Nach der Vorbereitung der Zellen wurden nun die gewünschten Substanzen zur Stimulation der VSMCs in die Wells einpipettiert. Die Inkubation erfolgte für 2 bzw. 18 Stunden, um frühe und späte Effekte auf die RNA-Synthese untersuchen zu können.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Lyse der Zellen vorgenommen. Alle notwendigen Schritte wurden dabei unter der Sicherheitswerkbank und unter Kühlung der Reagenzien und Zellen mittels Eis durchgeführt.

Zu 1 ml Lysepuffer (RLT-Puffer) wurden in einem vorbereitenden Schritt 10 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Pro Well wurden jeweils 300 µl RLT-Puffer nach Absaugen des Mediums einpipettiert. Nach kurzer Einwirkzeit des Lysepuffers erfolgte das Abkratzen der Zellen mit einem Zellschaber. Um die DNA zu denaturieren (nicht allerdings die RNA), wurde das im RLT-Puffer gelöste Zelllysate zehnmal in einer Spritze mit dünner Kanüle aufgezogen. Das Zelllysate wurde nach Überführung in gekühlte Reaktionsgefäße für fünf Minuten bei 14.000 RPM zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde jeweils in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß einpipettiert und dann bei -80°C tiefgefroren.

2.5.3 Isolation von RNA aus Zelllysate

Alle Schritte der eigentlichen RNA-Isolation wurden unter Kühlung auf Eis vorgenommen. Das Zelllysate wurde unter langsamem Auftauen in einen

vorbereiteten QIAshredder pipettiert und zur Homogenisierung bei 14.000 RPM für zwei Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das homogenisierte Zelllysate mit 300 µl Ethanol (70%) vermischt und das entstandene Gesamtvolumen in eine RNeasy-Säule einpipettiert. Nach 15-sekündigem Zentrifugieren wurden 350 µl RW1-Puffer hinzugegeben und es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 15 Sekunden (jeweils 14.000 RPM). Um eventuell vorhandene DNasen zu zerstören, wurden 80 µl eines vorbereiteten DNase-Mixes (bestehend aus 10 µl DNase I und 70 µl RDD-Puffer) auf die Säule gegeben und für 15 Minuten dort belassen. Danach wurde die Säule mit zunächst 350 µl und dann mit 700 µl RW1-Puffer jeweils unter 15-sekündigem Zentrifugieren gewaschen. Abschließend folgten zwei Zentrifugier-Vorgänge mit jeweils 500 µl RPE-Puffer, zunächst für 15 Sekunden, dann für zwei Minuten.

Die mit RNA beladene Säule wurde nun in ein neues 2 ml-Tube überführt und durch nochmaliges Zentrifugieren (drei Minuten) wurden eventuell noch vorhandene Pufferreste ausgewaschen.

Um die RNA zu extrahieren, erfolgte nach Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser eine Zentrifugation für eine Minute, wobei die beladene Säule auf ein vorbereitetes 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgesteckt wurde. Somit konnte die gewünschte RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser isoliert werden.

2.5.4 Kontrolle der isolierten RNA

Um zu überprüfen, ob die RNA-Isolation erfolgreich war, wurde mit dem gewonnenen Extrakt eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde eine Gelkammer verwendet, die ausschließlich dem Nachweis von RNA dient. Die Gelkammer wurde für die Elektrophorese zunächst gereinigt, was mittels Einfüllen von Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-Wasser) und H₂O₂ (30%) für 30 Minuten vorgenommen wurde. Die Endkonzentration des H₂O₂ betrug hierbei 1%.

Für die Elektrophorese wurde ein 1%iges Agarosegel hergestellt (0,7g Agarose wurden in der Mikrowelle durch Aufkochen in 70 ml Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat (TAE) gelöst). Die aufgekochte Flüssigkeit wurde mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt. Die interkalierende Wirkung von Ethidiumbromid macht Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar. Das festgewordene Gel wurde nach einer halben Stunde Trockenzeit in die nun mit TAE als Laufpuffer gefüllte Gelkammer eingesetzt.

2 µl der RNA-Proben wurden jeweils mit 5 µl Ladepuffer vermischt und anschließend in die Taschen des Agarosegels gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 50 V für 45 Minuten durchgeführt. Die Auswertung des Gels erfolgte unter UV-Licht.

2.6 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Die RT-PCR dient der Vervielfältigung und semiquantitativen Beurteilung bestimmter mRNA-Sequenzen, die nach Stimulation der VSMCs untersucht wurden. Um auszuschließen, dass außer mRNA-Fragmenten auch andere RNA-Subtypen in der PCR vervielfältigt wurden und eventuell die Ergebnisse der Versuche beeinflussen, wurden spezielle Primer (Oligo(dT)-Primer) eingesetzt, die spezifisch nur an mRNA-Sequenzen, die einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende aufweisen, binden. Die Reverse Transkriptase konnte somit nur die gewünschten mRNA-Abschnitte vervielfältigen, da nur diese einen Primer als Startpunkt für die Polymerase aufwiesen.

2.6.1 Herstellung der cDNA

Zur Vorbereitung der Reaktion wurde ein Ausgleich der RNA-Konzentrationsunterschiede durch Nutzung unterschiedlicher Volumina vorgenommen.

Zunächst wurde ein Mastermix hergestellt, der aus 6 µl 5x cDNA-Puffer, 3 µl Dithiothreitol (DTT), 6 µl Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) (10 mM) und 1 µl SuperScript (Reverse Transkriptase) pro Ansatz bestand. Aus dem angeführten Mastermix wurden für die Reaktion je 13 µl pro Ansatz benötigt. Dieses Volumen wurde jeweils zu einem vorbereiteten Ansatz aus 1 µl Oligo(dT)-Primer, der gewünschten Menge RNA und einem variablen Volumen von RNase-freiem Wasser (von insgesamt je 12 µl) hinzugefügt. Das erforderliche Gesamtvolumen betrug jeweils 25 µl pro Ansatz. Nach Zugabe des Mastermix, Vortexen und Anzentrifugieren der Proben, erfolgte die Inkubation der 1,5 ml Reaktionsgefäße bei 37°C im Thermoblock für eine Stunde. Anschließend wurde die Reaktion für 15 Minuten bei 70°C im Thermoblock beendet.

2.6.2 Kontrolle der synthetisierten cDNA

Um für die gewünschten RT-PCR-Versuche vergleichbare Mengen an cDNA zu verwenden, wurden mit den synthetisierten cDNA-Ansätzen jeweils β -Aktin-PCRs durchgeführt.

Verwendet wurde bei allen PCR-Ansätzen der REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix mit MgCl_2 der Fa. Sigma-Aldrich.

Aus dem hergestellten Mastermix, bestehend aus 12,5 μl REDTaq ReadyMix, 10,5 μl H_2O dest. steril. und 1 μl Aktin-Primer (Konzentration 10 nM) pro Ansatz, wurden 0,2 ml PCR-Gefäße mit je 24 μl befüllt. Pro Ansatz wurde je 1 μl der gewünschten, unverdünnten cDNA hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurde ein mit 25 μl Mastermix befülltes 0,2 ml PCR-Gefäß verwendet. Die PCR-Gefäße wurden vor PCR-Beginn gut durchgemischt (Vortexer) und anzentrifugiert. Zur Vervielfältigung der β -Aktin-mRNA erfolgten dann 28 Zyklen im Thermocycler.

Schema für β -Aktin-PCR:

Beginn mit	94 °C für 4 min (Denaturieren)
28 Zyklen mit	94 °C für 1 min
	60 °C für 45 sec (Annealing)
	72 °C für 1 min (Elongation)

Beenden der Reaktion mit 72 °C für 10 min

Die Kontrolle und der Vergleich der Aktin-mRNA-Konzentration in den gewonnenen cDNAs erfolgte mittels Gelelektrophorese der Aktin-PCR. Zunächst wurde ein 1,5%iges Agarosegel hergestellt (siehe RNA-Gelelektrophorese unter 2.5.4). Die Taschen des Gels wurden dann mit je 10 μl der PCR-Ansätze befüllt und es erfolgte eine Elektrophorese bei 100 V für 45 Minuten (restliche Bedingungen siehe RNA-Gelelektrophorese unter 2.5.4). Als Marker diente ein 100bp-Marker der Firma Invitrogen (100 bp DNA Ladder).

2.6.3 Durchführung der RT-PCR mit spezifischen Primern

Um den Einfluss von TGF- β auf stimulierte VSMCs auf Transkriptionsebene zu untersuchen, wurden verschiedene Primer für PCRs, wie z.B. Primer für N-Cadherin, die Transkriptionsfaktoren Snail1 und Sip1, α - und β -Catenin, p120ctn und Integrin- β_1 , verwendet.

Tabelle 3 zeigt die Sequenzen der für die RT-PCR verwendeten Primer und die entsprechenden Fragmentgrößen.

Tabelle 3 Verwendete Primer für die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).

cDNA	Primer-Sequenz: 5'-3'; oben: sense, unten: antisense	Größe
β-Aktin	GACTACCTCATGAAGATCCT GCGGATGTCCACGTCACACT	311 bp
N-Cadherin	TAAAATATGATGAAGAAGGTGGAGG TGAGGAATTAAGGGAGCTCA	316 bp
Snail1	GCGCTCTTTCCTCGTCAGGA ATCCTTGGCCTCAGAGAGCTGG	435 bp
Sip1	GCCACAAATGAAAGTCCTGG TCCCTGAGAGATCAGCTACA	260 bp
α-Catenin	AGTTGGATGACTCTGACTTT G TTCAGATGGTGGCAGTAGAG	460 bp
β-Catenin	TGAGACATTAGATGAGGGCA AAGGTTATGCAAGGTCCCAG	363 bp
p120	GAACTGCGGAAGCCACTG GGAACGGAGATAGTGGTGCTA	425 bp
Integrin-β ₁	TTTGTGGAGGAAATGGTGTT GCTCTGCACTGAACACATTC	250 bp

Je nach verwendetem Primer mussten die PCRs mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen, unterschiedlichen Zeiten für die Elongation sowie unterschiedlichen Anzahlen von Zyklen durchgeführt werden. Das Denaturieren für 4 Minuten bei 94 °C sowie das Beenden der Reaktion für 10 Minuten bei 72 °C wurden jeweils beibehalten.

In Tabelle 4 sind die verschiedenen Bedingungen für die jeweilige RT-PCR ersichtlich.

Tabelle 4 Bedingungen für die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).

cDNA	PCR-Zyklen	Zeitablauf eines Zyklus
β-Aktin	28	94 °C für 60 sec, 60 °C für 45 sec, 72 °C für 60 sec
N-Cadherin	35	94 °C für 30 sec, 58 °C für 45 sec, 72 °C für 45 sec
Snail1	35	94 °C für 45 sec, 65 °C für 45 sec, 72 °C für 60 sec
Sip1	35	94 °C für 30 sec, 65 °C für 45 sec, 72 °C für 45 sec
α-Catenin	35	94 °C für 30 sec, 56 °C für 45 sec, 72 °C für 60 sec
β-Catenin	35	94 °C für 30 sec, 57 °C für 45 sec, 72 °C für 60 sec
p120	35	94 °C für 30 sec, 60 °C für 45 sec, 72 °C für 60 sec
Integrin-β ₁	35	94 °C für 30 sec, 57 °C für 45 sec, 72 °C für 45 sec

3. Ergebnisse

3.1 Migrationsverhalten vaskulärer glatter Muskelzellen unter TGF- β -Stimulation *in vitro*

3.1.1 Wirkung von TGF- β 1 auf die Migration von VSMCs

VSMCs zeigen *in vitro* auch ohne Stimulation stets eine gewisse Migrationstendenz. Als Kontrollsubstanz für die Versuche in der Boyden-Kammer diente Minimalmedium. Die Zellzahl der migrierten VSMCs in der Gruppe nicht stimulierter Zellen wurde mit 100% beziffert. Zur Stimulation der Migration der Zellen wurde PDGF-BB als Positivkontrolle in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt. TGF- β 1 wurde in einer Konzentration von 5 ng/ml verwendet. PDGF stimuliert signifikant die Migration ($138,8\% \pm 13,8\%$ des Ausgangswertes), wohingegen TGF- β 1 keinen signifikanten Einfluss auf das Wanderungsverhalten der VSMCs hat. Insgesamt zeigt sich jedoch eine geringfügige Hemmung der Migration unter Stimulation mit TGF- β 1. Die Säulen in Abbildung 5 zeigen die Mittelwerte und Standardfehler der Migrationsassays (n=22).

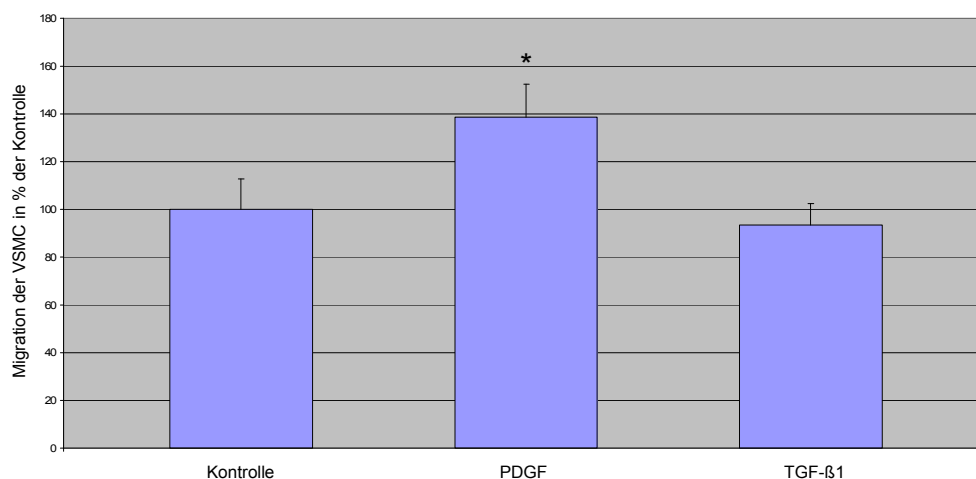


Abbildung 5 Migrationsverhalten vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMCs) unter 24-stündiger Stimulation mit Thrombozyten-Wachstumsfaktor (PDGF) in einer Konzentration von 10 ng/ml und Transformierendem Wachstumsfaktor-beta1 (TGF- β 1) in einer Konzentration von 5 ng/ml im Vergleich zur Kontrolle (nur Minimalmedium).

* $p < 0,05$, daher signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle

3.1.2 Wirkung des Anti-N-Cadherin-Peptids auf die Migration von VSMCs

In diesen Versuchen wurde zur Stimulation der VSMCs ein Peptid verwendet, das sich gegen die Adhäsionsfunktion von N-Cadherin richtet und somit eine Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten der VSMCs untereinander verhindert.

Unter Stimulation mit dem Anti-N-Cadherin-Peptid (Aminosäuresequenz: N-Ac-LRAHAVDING-NH₂) zeigen VSMCs eine signifikant reduzierte Migration sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch im Vergleich zum verwendeten Kontrollpeptid (Aminosäuresequenz: N-Ac-CRAHADDC-NH₂). Das Anti-N-Cadherin-Peptid reduziert die Zahl an migrierten VSMCs auf 37,4%±3,8% des Ausgangswertes (Kontrolle). Die Säulen in Abbildung 6 zeigen die Mittelwerte und Standardfehler der Migrationsassays (n=11).

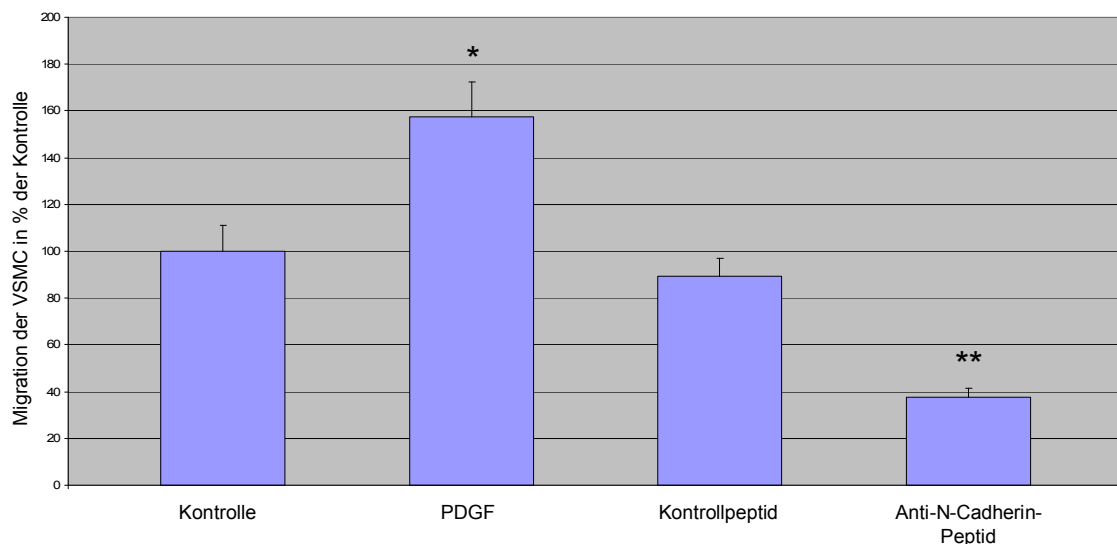


Abbildung 6 Migrationsverhalten vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMCs) unter 24-stündiger Stimulation mit Thrombozyten-Wachstumsfaktor (PDGF) in einer Konzentration von 10 ng/ml und Anti-N-Cadherin-Peptid in einer Konzentration von 160 µg/ml im Vergleich zur Kontrolle (nur Minimalmedium) und zum Kontrollpeptid in einer Konzentration von 180 µg/ml.

* $p < 0,05$, daher signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle

** $p < 0,05$, daher signifikanter Unterschied im Vergleich zum Kontrollpeptid

In weiteren Migrationsversuchen konnte gezeigt werden, dass neben TGF-β1 auch die Isoformen TGF-β2 und TGF-β3 eine geringfügige Inhibition der Migration bei VSMCs bewirken. Dabei ist die Ausprägung dieser Migrationshemmung bei allen drei Isoformen nahezu identisch.

Unter Verwendung von Kombinationen der hier verwendeten Wachstumsfaktoren und Peptide, zeigt sich eine Abschwächung der durch Anti-N-Cadherin-Peptid induzierten Migrationshemmung der VSMCs durch PDGF auf $40,6\% \pm 7,4\%$ im Vergleich zur Kontrolle. Die TGF- β -Isoformen verstärken hingegen die inhibitorische Wirkung des Anti-N-Cadherin-Peptids auf $18,2\% \pm 4,3\%$ des Ausgangswertes.

Die Säulen in Abbildung 7 zeigen die Mittelwerte und Standardfehler der Migrationsassays (n=4).

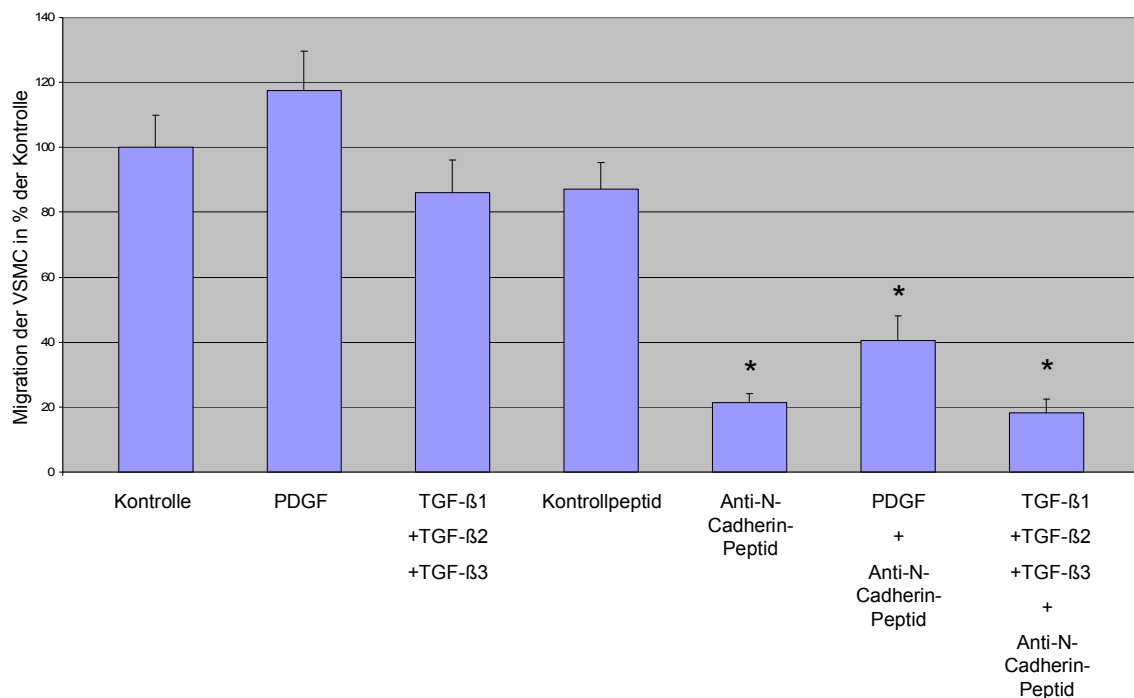


Abbildung 7 Migrationsverhalten vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMCs) unter 24-stündiger Stimulation mit Thrombozyten-Wachstumsfaktor (PDGF) in einer Konzentration von 10 ng/ml, Transformierendem Wachstumsfaktor-beta1, 2 und 3 jeweils in einer Konzentration von 5 ng/ml und Anti-N-Cadherin-Peptid in einer Konzentration von 160 μ g/ml im Vergleich zur Kontrolle (nur Minimalmedium) und zum Kontrollpeptid in einer Konzentration von 180 μ g/ml. Kombinationen unter Verwendung der angegebenen Konzentrationen zeigen eine migrationsfördernde Wirkung von PDGF und einen inhibitorischen Effekt der TGF- β -Isoformen auf das Migrationsverhalten der Zellen.

* $p < 0,05$, daher signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle und zum Kontrollpeptid

3.2 Genexpression vaskulärer glatter Muskelzellen unter TGF- β -Stimulation *in vitro*

TGF- β 1 und die TGF- β -Rezeptoren sind an der Aktivierung und Suppression einer Vielzahl von Genen beteiligt. In den durchgeführten Versuchen wurde die

Genexpression von N-Cadherin und Snail1 untersucht. Hierbei wird die frühe von der späten Genexpression unterschieden um kurzfristige und langfristige Effekte differenzieren zu können. Die frühe Genexpression wurde in unserem Fall bis zu einer Dauer von zwei Stunden definiert, die späte Genexpression stellt den Zeitraum zwischen zwei und 18 Stunden dar.

Um vor allem die von den Zellen produzierte mRNA und keine andere RNA-Form (tRNA, rRNA) zu bestimmen, wurde zur Synthese der cDNA ein Oligo(dT)-Primer verwendet, der an die regulatorische Poly-A-Sequenz der mRNA bindet. Die entstandene cDNA wurde mit Hilfe spezifischer Primer und anschließender RT-PCR millionenfach vervielfältigt.

3.2.1 Früher Einfluss von TGF- β 1 auf die Genexpression von VSMCs

Auf die Expression des N-Cadherin-Gens hat TGF- β 1 bei einer Stimulationszeit von zwei Stunden keinen Einfluss. Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse der dazugehörigen RT-PCR.

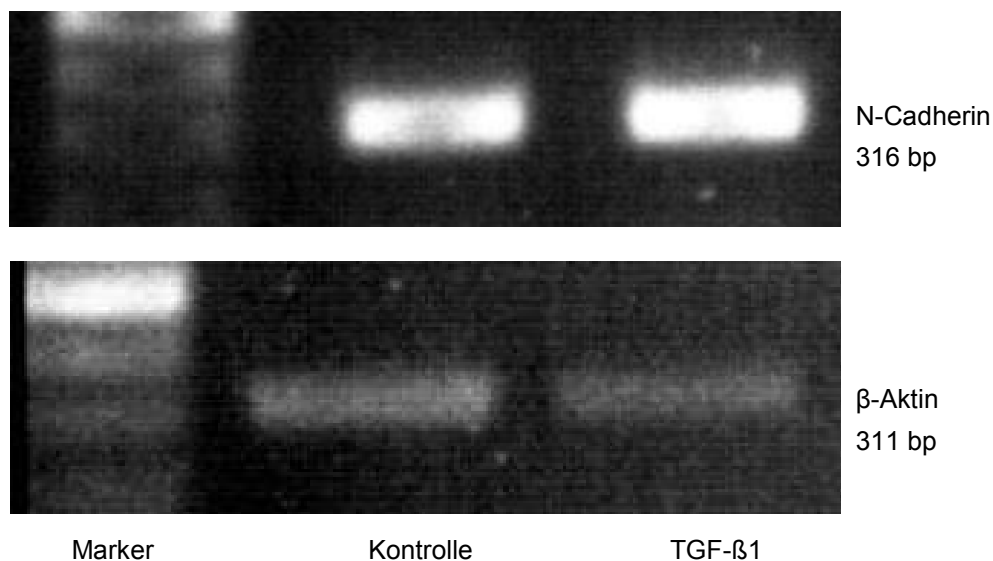


Abbildung 8 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zur Analyse der Genexpression in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs). Durch Verwendung spezifischer Primer können die in den vorherigen Reaktionsschritten gewonnenen copy-Desoxyribonukleinsäure-Fragmente (cDNA) spezifisch vervielfältigt und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Die Stimulation der VSMCs erfolgte für zwei Stunden mit Transformierendem Wachstumsfaktor-beta1 (TGF- β 1) in einer Konzentration von 5 ng/ml. Die Kontrollbanden werden aus VSMCs gewonnen, die nicht mit TGF- β 1 stimuliert wurden. Beta-Aktin (β -Aktin) dient als Kontrolle zur Beladung mit gleichen Mengen an cDNA.

Auf die Expression des Gens für Snail1, einem bekannten Transkriptionsfaktor aus der Zink-Finger-Familie, hat TGF- β 1 bei einer Stimulationszeit von zwei Stunden

einen positiven Einfluss. Die semiquantitative RT-PCR zeigt eine Zunahme in der Intensität der Bande von Snail1 nach einer Stimulation mit TGF- β 1. Die Bande von β -Aktin zeigt keine Intensitätssteigerung im Vergleich zur Kontrollbande und lässt daher auf vergleichbare Mengen an cDNA in den Ansätzen schließen. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der dazugehörigen RT-PCR.

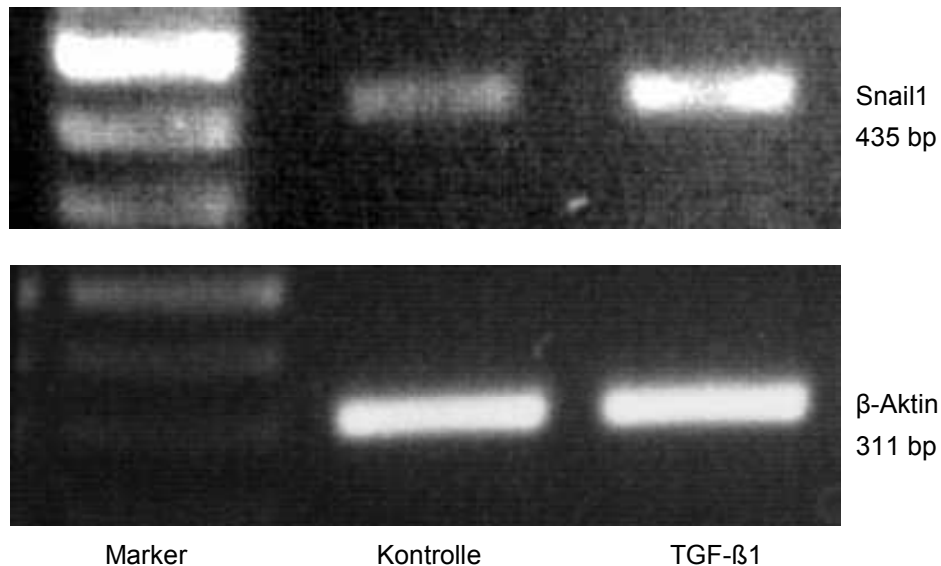


Abbildung 9 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zur Analyse der Genexpression in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs). Die Stimulation der VSMCs erfolgte für zwei Stunden mit Transformierendem Wachstumsfaktor-beta1 (TGF- β 1) in einer Konzentration von 5 ng/ml. Die Kontrollbanden werden aus VSMCs gewonnen, die nicht mit TGF- β 1 stimuliert wurden. Beta-Aktin (β -Aktin) dient als Kontrolle zur Beladung mit gleichen Mengen an cDNA.

3.2.2 Später Einfluss von TGF- β 1 auf die Genexpression von VSMCs

Betrachtet man bei einer Stimulationsdauer von 18 Stunden die Auswirkung von TGF- β 1 auf die Genexpression in VSMCs, so fallen sowohl bei dem mRNA-Gehalt von N-Cadherin als auch von Snail1 deutliche Zunahmen auf. Snail1 weist somit bereits nach kurzer Stimulation durch TGF- β 1 eine gesteigerte Genexpression auf, die über 18 Stunden anhält. Die Genexpression von N-Cadherin wird erst zu einem späteren Zeitpunkt induziert.

Um unspezifische Effekte auf die Genexpression von N-Cadherin und Snail1 auszuschließen, wurde mit SB505124 ein selektiver Inhibitor der TGF- β Typ I-Rezeptorkinase verwendet. Unter Einsatz von SB505124 stellt sich keine gesteigerte Genexpression ein und die Banden der N-Cadherin-mRNA und der Snail1-mRNA zeigen in der RT-PCR eine auf Ausgangsniveau (ohne Stimulation

mit TGF- β 1) befindliche Intensität. Die entsprechende RT-PCR ist in Abbildung 10 zu sehen.

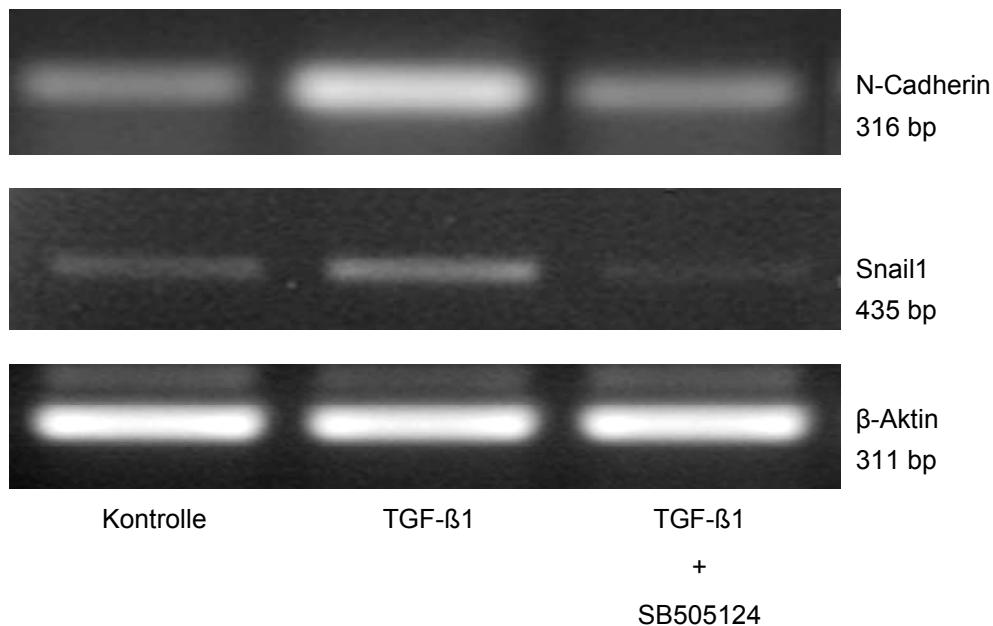


Abbildung 10 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zur Analyse der Genexpression in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs). Die Stimulation der VSMCs erfolgte für 18 Stunden mit Transformierendem Wachstumsfaktor-beta1 (TGF- β 1) in einer Konzentration von 5 ng/ml und für die dritte Spur zusätzlich zu TGF- β 1 mit SB505124 (0,5 μ M), einem Inhibitor der TGF- β Typ I-Rezeptorkinase. Die Kontrollbanden werden aus VSMCs gewonnen, die nicht mit TGF- β 1 stimuliert wurden. Beta-Aktin (β -Aktin) dient als Kontrolle zur Beladung mit gleichen Mengen an cDNA.

Auch weitere, strukturell und funktionell mit N-Cadherin assoziierte Proteine wurden auf ihre Genexpression hin untersucht. β -Catenin und p120ctn sind unter anderem für die intrazelluläre Verankerung von Cadherinen von Bedeutung. In der RT-PCR zeigt sich sowohl nach zwei- als auch nach 18-stündiger Stimulation der Zellen mit TGF- β 1 keine Veränderung der Genexpression von β -Catenin oder p120ctn. Abbildung 11 zeigt dies beispielhaft für β -Catenin nach 18-stündiger Stimulation der VSMCs mit TGF- β 1.

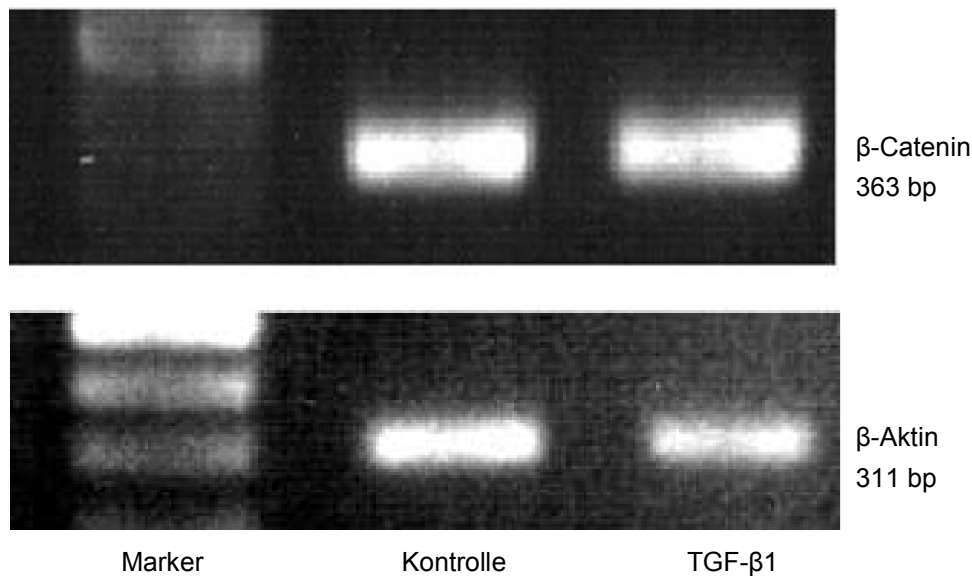


Abbildung 11 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zur Analyse der Genexpression in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs). Die Stimulation der VSMCs erfolgte für 18 Stunden mit Transformierendem Wachstumsfaktor-beta1 (TGF- β 1) in einer Konzentration von 5 ng/ml. Die Kontrollbanden werden aus VSMCs gewonnen, die nicht mit TGF- β 1 stimuliert wurden. Beta-Aktin (β -Aktin) dient als Kontrolle zur Beladung mit gleichen Mengen an cDNA.

Außerdem zeigen in VSMCs auch die Strukturproteine α -Catenin und Integrin- β 1 weder nach zwei noch nach 18 Stunden Stimulation mit TGF- β 1 eine Änderung in ihrer Genexpression gegenüber nicht stimulierten Zellen.

3.3 Proteinmuster vaskulärer glatter Muskelzellen unter TGF- β -Stimulation *in vitro*

Um die Effekte von TGF- β 1 auch auf Proteinebene zu bestimmen, wurden unter anderem die Mengen an N-Cadherin und Snail1 im Western Blot untersucht.

Nach 18-stündiger Stimulation der VSMCs mit TGF- β 1 zeigt sich eine Zunahme des Gehalts an N-Cadherin und β -Catenin. Diese Zunahme an N-Cadherin und β -Catenin ist durch Inhibition der TGF- β Typ I-Rezeptorkinase mittels Zugabe von SB505124 hemmbar. Auf den Gehalt an β -Aktin hat die Verwendung von SB505124 keinen Einfluss. Die Ergebnisse des zugehörigen Western Blots zeigt Abbildung 12.

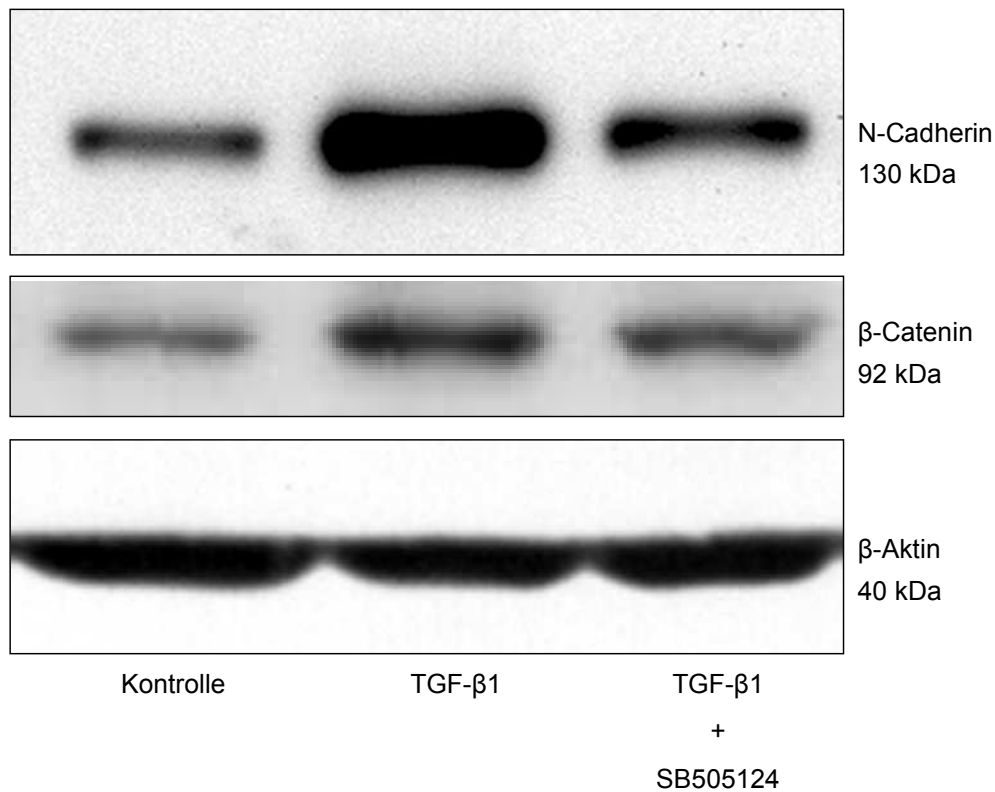


Abbildung 12 Western Blot zur Analyse des Proteingehalts in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs). Die Stimulation der Zellen erfolgte jeweils für 18 Stunden mit Transformierendem Wachstumsfaktor-beta1 (TGF-β1) in einer Konzentration von 5 ng/ml und in der dritten Spur zusätzlich mit SB505124 (0,5 μM). Zellen der Kontrollbande wurden nicht stimuliert und erhielten ausschließlich Medium. Der Gehalt an beta-Aktin (β-Aktin) dient als Kontrolle für den Gesamtproteingehalt der Zellen.

Auch Snail1 zeigt eine Sensibilität auf Inhibition der TGF-β-Kaskade mit Hilfe von SB505124. Durch TGF-β1 wird die Menge an Snail1-Protein in den Zellen erhöht. Dies ist sowohl bereits nach sechs als auch nach 18 Stunden bei stimulierten Zellen sichtbar. SB505124 verhindert einen Anstieg des Proteingehalts an Snail1 in VSMCs. Den entsprechenden Western Blot zeigt Abbildung 13.

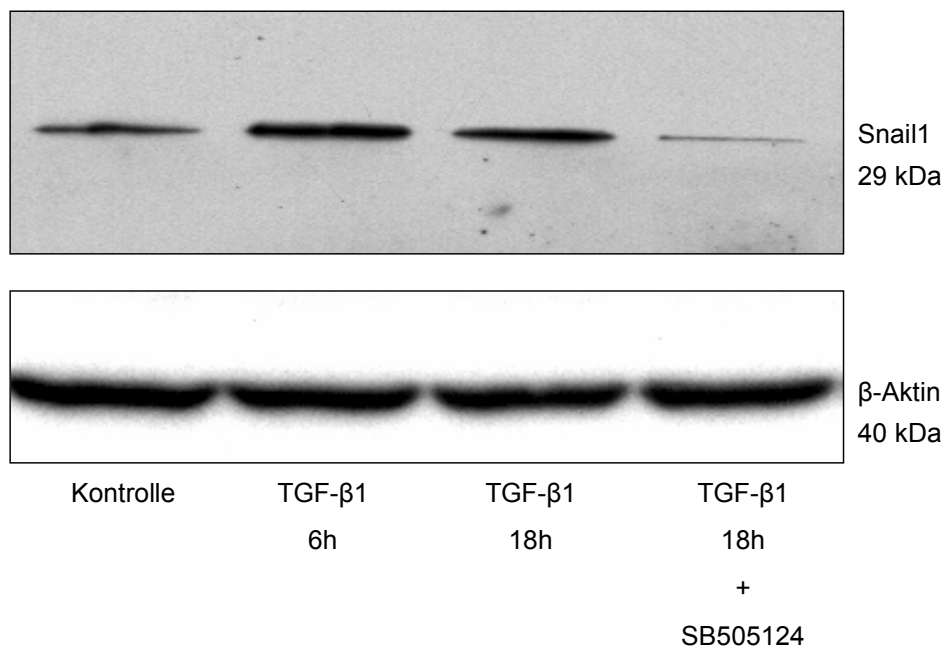


Abbildung 13 Western Blot zur Analyse des Proteingehalts in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs). Die Stimulation der Zellen erfolgte für sechs oder 18 Stunden mit Transformierendem Wachstumsfaktor-beta1 (TGF-β1) in einer Konzentration von 5 ng/ml und in der vierten Spur zusätzlich mit SB505124 (0,5 μM). Zellen der Kontrollbande wurden nicht stimuliert und erhielten ausschließlich Minimalmedium. Der Gehalt an Beta-Aktin (β-Aktin) dient als Kontrolle für den Gesamtproteingehalt der Zellen.

TGF-β1 führt in VSMCs zu einer Erhöhung des Gehalts an N-Cadherin. Dies ist deutlich ab einer Stimulationszeit von zwei Stunden ersichtlich und auch nach 48 Stunden Stimulation mit TGF-β1 noch nachweisbar.

Um eine mögliche Abhängigkeit der Erhöhung von N-Cadherin in den VSMCs von der Aktivität bestimmter Kinasen zu untersuchen, wurden VSMCs mit TGF-β1 über eine Zeitspanne von zehn Minuten bis 48 Stunden stimuliert. Anschließend wurden im Western Blot die Mengen an N-Cadherin und P-Akt (der phosphorylierten und damit aktivierten Form der Kinase Akt, die auch als Proteinkinase B bezeichnet wird) analysiert. Akt spielt unter anderem eine Rolle während der epithelialen-mesenchymalen Transition, ist ein Substrat der Phosphoinositid 3-Kinase (PI 3-Kinase) und ist somit Bestandteil verschiedener Signaltransduktionswege, einschließlich der TGF-β-Signalkaskade. Die Aktivierung von Akt geschieht durch Phosphorylierung an den beiden Aminosäureresten Threonin 308 (Thr308) und Serin 473 (Ser473).

Ein erhöhter Gehalt an N-Cadherin korreliert in VSMCs über diesen Zeitverlauf mit einem erhöhten Gehalt an P-Akt. Abbildung 14 zeigt den Zeitverlauf im Western Blot nach Stimulation der VSMCs mit TGF- β 1.

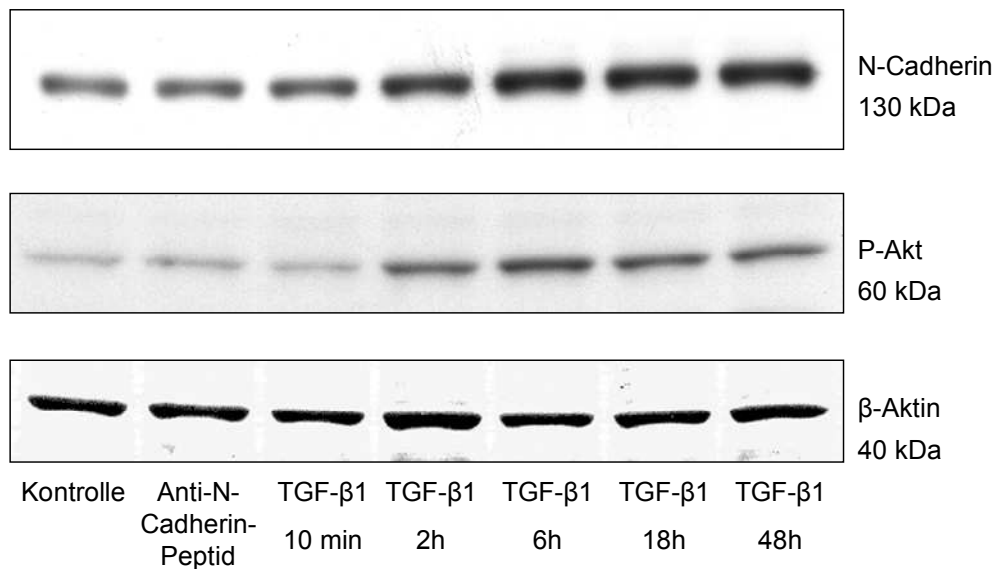


Abbildung 14 Western Blot zur Analyse des Proteingehalts in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs). Die Stimulation der Zellen erfolgte in einem Zeitraum von zehn Minuten bis 48 Stunden mit Transformierendem Wachstumsfaktor-beta1 (TGF- β 1) in einer Konzentration von 5 ng/ml. Zellen der Kontrollbande wurden nicht stimuliert und erhielten ausschließlich Minimalmedium. Das Anti-N-Cadherin-Peptid wurde in einer Konzentration von 160 μ g/ml zugesetzt. Der Gehalt an beta-Aktin (β -Aktin) dient als Kontrolle für den Gesamtproteingehalt der Zellen.

Um die Abhängigkeit der gesteigerten N-Cadherin-Expression von der PI 3-Kinase zu belegen, wurden neben TGF- β 1 zusätzlich verschiedene pharmakologische Inhibitoren eingesetzt und die Ergebnisse im Western Blot sichtbar gemacht. SB505124 dient als Inhibitor der TGF- β Typ I-Rezeptorkinase, LY294002 ist ein Hemmstoff der PI 3-Kinase und PD98059 inhibiert die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (MEK1), die einen weiteren Signalweg in den Zellen darstellt.

In Abbildung 15 sind die Effekte der Stimulation mit TGF- β 1 und den genannten Inhibitoren auf den Gehalt an N-Cadherin und phosphoryliertem Akt zu sehen. Unter Zugabe von SB505124 wird die Erhöhung von N-Cadherin und P-Akt nach Stimulation mit TGF- β 1 in VSMCs gehemmt. Außerdem entspricht der Gehalt an beiden Proteinen annähernd den Kontrollwerten. LY294002 hat einen ähnlichen Effekt auf beide Proteine und zeigt ebenso einen den Kontrollwerten

entsprechenden Gehalt an N-Cadherin und P-Akt. PD98059 hingegen hat unter simultaner Stimulation mit TGF- β 1 keinen Effekt auf den Gehalt an N-Cadherin und P-Akt in VSMCs.

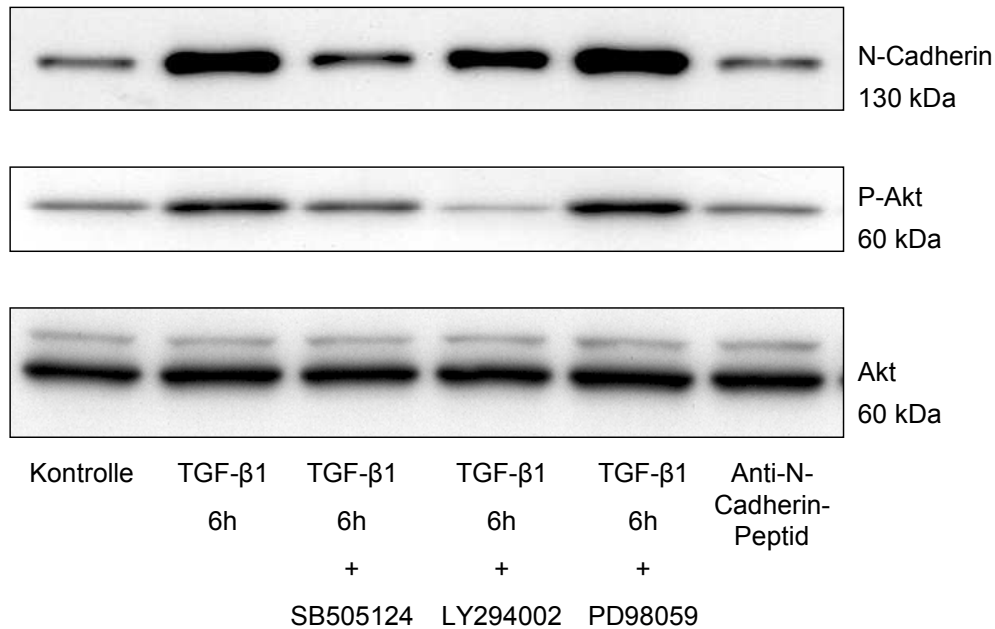


Abbildung 15 Western Blot zur Analyse des Proteingehalts in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs). Die Stimulation der Zellen erfolgte jeweils für sechs Stunden mit Transformierendem Wachstumsfaktor-beta1 (TGF- β 1) in einer Konzentration von 5 ng/ml. Die Inhibitoren SB505124 (0,5 μ M), LY294002 (20 μ M) und PD98059 (25 μ M) dienen der Ermittlung von Abhängigkeiten im TGF- β -Signalweg für die N-Cadherin-Expression. Zellen der Kontrollbande wurden nicht stimuliert und erhielten ausschließlich Minimalmedium. Das Anti-N-Cadherin-Peptid wurde in einer Konzentration von 160 μ g/ml zugesetzt. Der Gehalt an beta-Aktin (β -Aktin) dient als Kontrolle für den Gesamtproteingehalt der Zellen.

TGF- β 1 stellt auch einen Regulator der Aktivität von RhoA (*Ras homolog gene family, member A*) dar. RhoA gehört zu den sogenannten kleinen GTPasen und ist an der Migration von Zellen und dem Umbau des Zytoskeletts beteiligt. VSMCs, die mit TGF- β 1 stimuliert werden, zeigen einen erhöhten Anteil an aktiviertem RhoA (RhoA-GTP). Diese Erhöhung der Aktivität von RhoA ist schon nach einer Stimulationszeit von 15 Minuten nachweisbar; nach 30 Minuten zeigt sich eine noch deutlichere Erhöhung des Gehalts an RhoA-GTP in den VSMCs (siehe Abbildung 16). Der Gesamtgehalt von RhoA wird in diesen Zellen nicht verändert, was auf einen Einsatz gleicher Lysatmengen hinweist. Abbildung 16 zeigt die entsprechende Affinitäts-Präzipitation mit GST-Rhotekin.

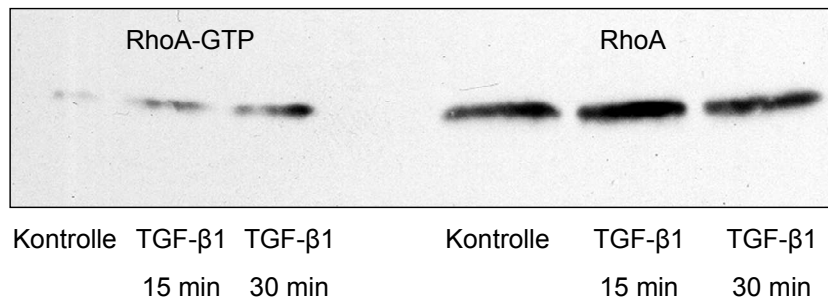


Abbildung 16 Affinitäts-Präzipitation von *Ras homolog gene family, member A* (RhoA) und RhoA-GTP (RhoA-Guanosintriphosphat). Vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMCs) wurden jeweils mit Transformierendem Wachstumsfaktor-beta1 (TGF- β 1) in einer Konzentration von 5 ng/ml stimuliert. Die Stimulationsdauer betrug 15 bzw. 30 Minuten. Zellen der Kontrollbanden wurden nicht stimuliert. Durchführung der Affinitäts-Präzipitation in Zusammenarbeit mit K. Giehl/C. Längle.

Um den Einfluss zu untersuchen, den das Anti-N-Cadherin-Peptid auf VSMCs durch die Bindung an das HAV-Motiv hat, wurde die RhoA-Aktivität nach Stimulation der VSMCs mit TGF- β 1, dem Anti-N-Cadherin-Peptid und einem Kontrollpeptid analysiert. Das Anti-N-Cadherin-Peptid aktiviert N-Cadherin-Moleküle, verhindert jedoch eine Zell-Zell-Adhäsion zwischen den VSMCs.

Die durch TGF- β 1 hervorgerufene Steigerung an RhoA-GTP ist durch Zusatz des ALK5-Inhibitors SB505124 inhibierbar. Die Aktivität von RhoA entspricht somit bei Hemmung der ALK5 derjenigen RhoA-Aktivität bei nicht stimulierten VSMCs. Von Interesse ist auch eine leichte Aktivierung von RhoA in Zellen, die mit Anti-N-Cadherin-Peptid behandelt wurden. Der Gesamtgehalt an RhoA wird jeweils nicht durch Stimulation der VSMCs mit TGF- β 1, dem Kontrollpeptid oder dem Anti-N-Cadherin-Peptid verändert, was auf gleiche Lysatmengen in den Versuchen schließen lässt. Die dazugehörige Affinitäts-Präzipitation ist in Abbildung 17 zu sehen.

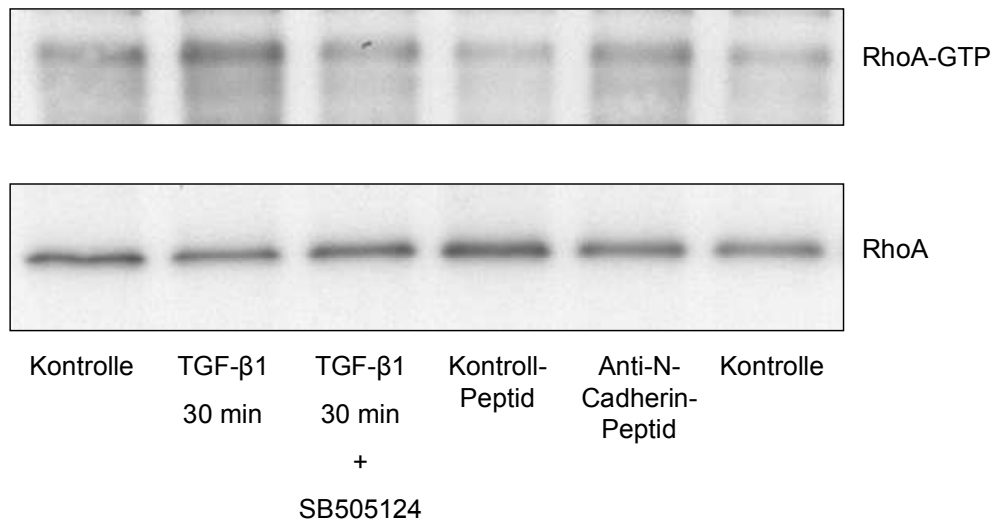


Abbildung 17 Affinitäts-Präzipitation von *Ras homolog gene family, member A* (RhoA) und RhoA-GTP (RhoA-Guanosintriphosphat). Vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMCs) wurden jeweils mit Transformierendem Wachstumsfaktor-beta1 (TGF-β1) in einer Konzentration von 5 ng/ml für 30 Minuten stimuliert. Zusätzlich wurde die Activinrezeptor-ähnliche Kinase 5 (ALK5) durch SB505124 (0,5 μM) inhibiert. Die Stimulation mit Anti-N-Cadherin-Peptid erfolgte in einer Konzentration von 200 μg/ml.
Durchführung der Affinitäts-Präzipitation in Zusammenarbeit mit K. Giehl/C. Längle.

4. Diskussion

Vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMCs) spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Shuntstenosen und Atherosklerose. Die Literatur hinsichtlich genauer Mechanismen der Migration von VSMCs und ihrer Regulatoren ist bisher spärlich.

TGF- β 1 stellt einen wichtigen Faktor in physiologischen und pathologischen Vorgängen des Menschen, u.a. im Gefäßsystem, dar. Die Literatur zu TGF- β 1 ist umfangreich, dennoch ist sein Einfluss auf VSMCs bisher nur unbefriedigend geklärt.

4.1 Charakterisierung des Migrationsverhaltens vaskulärer glatter Muskelzellen *in vitro*

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss verschiedener Faktoren auf das Migrationsverhalten von VSMCs zu analysieren.

Der Thrombozyten-Wachstumsfaktor (PDGF) gilt derzeit als potentester Faktor für die Stimulation der Migration von VSMCs. PDGF tritt als Homo- oder Heterodimer auf, wobei bisher vier Isoformen (A-D) bekannt sind. In der vorliegenden Arbeit wurde PDGF-BB, die am besten untersuchte Isoform des Thrombozyten-Wachstumsfaktors, verwendet. In unseren Versuchen konnte eine signifikante Migrationssteigerung von VSMCs unter Stimulation mit PDGF-BB im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen gezeigt werden. Diese Ergebnisse sind in der Fachliteratur häufig beschrieben (Abedi u. Zachary 1995, Pukac et. al. 1998, Chung et. al. 2009). Die migrationsfördernde Eigenschaft von PDGF-BB machten wir uns zunutze und verwendeten diese Substanz als Positivkontrolle für das Migrationsverhalten der VSMCs.

Mitglieder der TGF- β -Familie beeinflussen das Migrationsverhalten einer Vielzahl von Zellen. Die Art des Einflusses auf die jeweiligen Zellen ist ebenso vielfältig wie die Stärke der Stimulation oder Inhibition des Migrationsverhaltens. So sind stimulatorische (Ma et. al. 2007, Michon et. al. 2002) wie auch inhibitorische Effekte von TGF- β auf die Migration von VSMCs (Engel u. Ryan 1997, Kojima et. al. 1991) beschrieben. Ma et. al. führen die promigratorische Wirkung von TGF- β auf VSMCs auf die Induktion von MCP-1 (Monozyten-Chemoattraktives Protein-1)

in endothelialen Zellen zurück, was einen chemoattraktiven Effekt auf die VSMCs hat. Michon et. al. konnten die komplexen Effekte von TGF- β auf Zellvorgänge in VSMCs auf unterschiedliche Bindungsmotive am Typ II-TGF- β -Rezeptor zurückführen. Je nachdem, welche Motive des Rezeptors aktiviert oder inhibiert werden, überwiegt entweder der migrationsfördernde Effekt auf die VSMCs oder das Migrationsverhalten ändert sich nicht signifikant. Das Peptid (IM-1), das einen stimulatorischen Effekt auf die Migration der VSMCs hatte, verursachte in den Zellen eine gesteigerte Expression von PAI-1-mRNA (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-mRNA). Das andere Peptid (IM-2), das sich von IM-1 durch ein anderes Bindungsmotiv am Typ II-TGF- β -Rezeptor unterscheidet, zeigte keinen der beiden genannten Effekte.

Engel u. Ryan zeigten für TGF- β keinen Effekt auf das Migrationsverhalten von humanen aortalen VSMCs. Worauf diese fehlende Wirkung von TGF- β auf die Migration der Zellen zurückzuführen ist, wird allerdings nicht beschrieben. Eine Konzentrationsabhängigkeit von TGF- β scheint bei der Beeinflussung der Migration von VSMCs nicht vorzuliegen. Dies belegen die hierzu durchgeführten Versuche von Engel et. al.

Unsere Ergebnisse zeigen eine Hemmung der Migration sowohl durch TGF- β 1 als auch durch andere Isoformen des Wachstumsfaktors (TGF- β 2 und TGF- β 3, siehe Abbildung 7). Diese Hemmung ist allerdings nicht signifikant.

Die Unterschiede im Verhalten der VSMCs auf Stimulation durch TGF- β sind nicht abschließend geklärt, sie werden aber u.a. durch verschiedene Zellkultursysteme und Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies, von denen die VSMCs stammen, erklärt (Engel u. Ryan 1997). In unseren Versuchen wurden primäre humane vaskuläre (aortale) glatte Muskelzellen verwendet, die bis zur Konfluenz kultiviert wurden.

Der Zusammenhang zwischen gesteigerter Expression von PAI-1-mRNA in VSMCs und Induktion der Migration ist beschrieben (Ma et. al. 2007, Samarakoon u. Higgins 2008). Dahingehend könnten weitere Versuche hilfreich sein um den in unseren Versuchen gefundenen inhibitorischen Effekt von TGF- β 1 auf die Migration der VSMCs und die Wirkung von TGF- β 1 auf den Gehalt an PAI-1 in VSMCs zu analysieren.

Auch die Rolle von N-Cadherin in der Entstehung atherosklerotischer Plaques ist unzureichend erörtert. Der Einfluss N-Cadherin-blockierender Peptide und Antikörper auf migratorische Vorgänge von Zellen stellt derzeit noch ein kontroverses Thema dar.

Jones et. al. konnten für die Wundheilung *in vivo* nachweisen, dass arterielle VSMCs – nach Blockade von N-Cadherin (und damit der Zell-Zell-Adhäsion) durch Anti-N-Cadherin-Antikörper – eine signifikant verminderte Migration in das Wundgebiet im Vergleich zu unbehandelten VSMCs zeigten. Die Autoren führen diesen Effekt auf eine durch die Blockade von N-Cadherin verursachte Verhinderung der Interaktion zwischen Integrinen und extrazellulärer Matrix zurück. Dadurch fehlen den VSMCs wichtige Leitstrukturen um in die Wundregion zu gelangen (Jones et. al. 2002).

Jedoch können VSMCs auch in ihrer Migration stimuliert werden indem eine verminderte Expression oder eine Blockade von N-Cadherin durch Anti-N-Cadherin-Antikörper zu einer Verminderung der RhoA-Aktivität führt (Blindt et. al. 2004).

Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikante Inhibition der Migration von VSMCs durch Einsatz eines Peptids, das die Adhäsionsfunktion von N-Cadherin außer Kraft setzt (siehe Ergebnisteil genauer). Ähnliche Ergebnisse sind sowohl für *in vitro*- als auch *in vivo*-Bedingungen beschrieben (Jones et. al. 2002, Koutsouki et. al. 2003). Diese Ergebnisse decken sich nicht mit unseren Erwartungen – wir gingen davon aus, dass durch die Blockade von N-Cadherin die Adhäsion der VSMCs untereinander aufgehoben und somit die Migration für die Zellen erleichtert sein sollte.

Aufgrund unserer Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass sich für die VSMCs durch die Blockade von N-Cadherin nicht nur die mechanische Verankerung untereinander verändert, sondern auch intrazellulär Signalvorgänge ablaufen, die die Migration der Zellen beeinflussen können.

Diskutiert wird derzeit eine Änderung im Expressionsmuster der Cadherine in VSMCs während der Migration (George u. Beeching 2006). Diese Änderung könnte sich ähnlich verhalten wie bei der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), die in physiologischen Vorgängen und auch der Tumorgenese eine Rolle spielt. Allerdings wird E-Cadherin, das während der EMT herunterreguliert wird, in

VSMCs nicht exprimiert. Somit müsste bei solch einem Vorgang ein anderes klassisches Cadherinmolekül oder anderes Adhäsionsmolekül neben N-Cadherin beteiligt sein.

An Myofibroblasten von Ratten wurde unseren Daten entsprechend gezeigt, dass eine Blockade der extrazellulären N-Cadherin-Anteile durch monoklonale Antikörper die Migration der Zellen hemmt (De Wever et. al. 2004).

In vitro-Studien an Neuronen zeigen außerdem, dass ein bestimmtes Motiv von N-Cadherin (HAV-Motiv der extrazellulären Domäne 4) über eine Interaktion mit dem FGF-Rezeptor in der Lage ist, das axonale Aussprossen zu verhindern (Williams et. al. 2001).

Für das Überleben von VSMCs und somit der Stabilisierung etwaiger Plaques in atherosklerotischen Läsionen ist ebenfalls eine Interaktion von N-Cadherin mit dem FGF-Rezeptor beschrieben (Lyon et. al. 2009). Hierbei wird eine Aktivierung des FGF-Rezeptors durch ein lösliches N-Cadherin-Peptid postuliert, was wiederum eine Aktivierung der PI 3-Kinase und in der Folge eine Aktivierung von Akt bewirkt. Diese Kaskade hat in den VSMCs einen antiapoptotischen Effekt.

Ein weiterer Akt-abhängiger Mechanismus könnte in VSMCs für die beschriebene Migrationshemmung durch das Anti-N-Cadherin-Peptid verantwortlich sein.

Des Weiteren fanden wir eine geringere Abschwächung der Migration von VSMCs unter Verwendung der Kombination von PDGF-BB und dem Anti-N-Cadherin-Peptid. Die stärkste inhibitorische Wirkung erzielten wir unter Kombination der TGF- β -Isoformen 1-3 mit dem Anti-N-Cadherin-Peptid. Somit könnten hier zwei unterschiedliche Signalwege an der Migrationshemmung der VSMCs *in vitro* beteiligt sein, die synergistisch antimigratorisch wirken.

Um Klarheit zu schaffen über welche molekularen Mechanismen TGF- β und die Blockade von N-Cadherin die Migration von VSMCs beeinflussen, müssen weitere Versuche erfolgen. Potentielle Ziele dieser Versuche könnten der FGF-Rezeptor, die PI 3-Kinase und die Kinase Akt sein.

4.2 Charakterisierung der Genexpression in vaskulären glatten Muskelzellen unter Stimulation *in vitro*

Um auf molekularer Ebene die Effekte der Stimulation von VSMCs durch TGF- β zu untersuchen wurde mittels RT-PCR die Genexpression der VSMCs unter verschiedenen Bedingungen analysiert. Dabei wurden die mRNAs von N-Cadherin sowie des Transkriptionsfaktors Snail1, der zur Gruppe der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren gehört, untersucht.

Mitglieder der Snail-Familie sind bisher vor allem hinsichtlich ihrer Rolle in der epithelialen-mesenchymalen Transition und der Tumorgenese untersucht (Sun et. al. 2008). Aber auch in VSMCs stellt Snail1 einen wichtigen, durch TGF- β 1 regulierten Transkriptionsfaktor dar.

Die Transkription des Snail1-Gens wird durch die Smad-abhängige Signalkaskade des TGF- β -Signalwegs reguliert (Moustakas u. Heldin 2005, Peinado et. al. 2003). Neuere Ergebnisse deuten allerdings auch auf eine Rolle von Ras als Induktor der Snail1-Expression nach Stimulation mit TGF- β 1 hin. In diesen an humanen Krebszellen (Panc-1-Zelllinie) durchgeführten Versuchen zeigte sich eine deutliche Zunahme der Snail1-mRNA nach zwei Stunden, die bis zu 24 Stunden aufrechterhalten wurde. Dieser Zeitverlauf stimmt bezüglich der Expression des Snail1-Gens mit unseren Versuchen überein (s.u.). Diese Expressionssteigerung wird von der durchführenden Arbeitsgruppe auf eine Kooperation von Smad-Proteinen und dem Einfluss von Ras zurückgeführt und steht somit im Gegensatz zur bisher postulierten Smad-abhängigen Stimulation der Snail1-Transkription (Horiguchi et. al. 2009). Horiguchi et. al. zeigten, dass Ras mit der Smad-Signalkaskade interagiert, hierbei aber keine Phosphorylierung von R-Smads für die Induktion von Snail1 nötig ist. Allerdings ist in dieser Signalkaskade der genaue Zusammenhang zwischen Smads und Ras-aktivierten Transkriptionsfaktoren bei der Induktion von Snail1 noch nicht geklärt (Miyazano 2009).

In unseren Versuchen hat TGF- β 1 nach kurzer Stimulationszeit (zwei Stunden) einen positiven Einfluss auf die Genexpression des Transkriptionsfaktors Snail1 in VSMCs.

Snail1 reguliert vor allem grundlegende Zellfunktionen, wie z.B. Änderungen der Zellmorphologie, Zellbewegung und Invasivität entarteter Zellen.

Bisher sind bezüglich der Cadherine nur Gene für E- und VE-Cadherin als Zielgene für Transkriptionsfaktoren der Snail-Familie beschrieben (Barrallo-Gimeno u. Nieto 2005, Thuault et. al. 2008). Snail1 bindet dabei an die Promotor-Region von E-Cadherin und sorgt für eine Repression des Gens für E-Cadherin (De Crane et. al. 2005). Auch Gene für Claudin und Occludin, die Proteine für Zell-Zell-Kontakte codieren, werden durch Snail reprimiert. Auch bei diesen beiden Zielgenen von Snail1 wird die Genexpression durch direkte Bindung von Snail1 an die Promotorregion gehemmt (Ikenouchi et. al. 2003).

In Mäusen fungiert Snail1 beispielsweise als Repressor der E-Cadherin-Expression im Zuge der Haarfollikelgenese (Jamora et. al. 2005).

In Tumorzellen kommt es bei der epithelialen-mesenchymalen Transition während der E-Cadherin-Repression zu einer Expressionssteigerung von N-Cadherin. Snail1 zeichnet auch hier für die E-Cadherin-Repression verantwortlich (Vincent et. al. 2009). Unser Interesse galt dem möglichen Zusammenhang zwischen Snail1 und N-Cadherin. Für den Einfluss von Snail1 auf die Expression von N-Cadherin liegen bisher keine gesicherten Daten vor.

Um jedoch diesen möglichen Signalweg in VSMCs näher zu beleuchten wurde in unseren Versuchen auch die Genexpression von N-Cadherin nach Stimulation mit TGF- β 1 analysiert. Unsere Ergebnisse zeigen in VSMCs nach einer Stimulationszeit von zwei Stunden mit TGF- β 1 keine Änderung der N-Cadherin-Expression im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen.

Betrachtet man allerdings die Genexpression nach einer längeren Stimulation mit TGF- β 1 (18 Stunden), so zeigt sich eine deutliche Steigerung der Expression des N-Cadherin-Gens. Auch die bereits nach zwei Stunden sichtbare Steigerung der Snail1-Genexpression findet sich noch nach 18 Stunden.

Der positive Effekt von TGF- β 1 auf die Expression des Snail1-Gens ist auch in der Literatur beschrieben (Peinado et. al. 2003, Sun et. al. 2008, Miyazano 2009).

Dies ist für verschiedene Zelltypen belegt, vor allem im Kontext der epithelialen-mesenchymalen Transition. Unser Augenmerk galt dieser durch TGF- β 1 induzierten Signaltransduktion in VSMCs.

Durch Einsatz von SB505124, einem Inhibitor der TGF- β Typ I-Rezeptorkinase, konnten die beschriebenen mRNA-Konzentrationserhöhungen von Snail1 und N-Cadherin rückgängig gemacht werden. Somit konnte ausgeschlossen werden,

dass ein anderer Signalweg als über den TGF- β -Rezeptor für den erhöhten Gehalt an Snail1-mRNA und N-Cadherin-mRNA verantwortlich ist.

Die Expressionssteigerungen der Gene für Snail1 und N-Cadherin sind jeweils abhängig von der Funktion der TGF- β Typ I-Rezeptorkinase und sind somit ein direkter Effekt der Stimulation von VSMCs mit TGF- β 1 und seiner nachfolgenden Signalkaskade.

Allerdings kann neben der in anderen Zelllinien gesicherten Induktion der Transkription des Snail1-Gens auch eine verringerte Degradation der Snail1-mRNA in VSMCs für den erhöhten mRNA-Gehalt nach TGF- β -Stimulation verantwortlich sein. Gleiches gilt für den nach 18 Stunden nachgewiesenen erhöhten Gehalt an N-Cadherin-mRNA.

Dennoch erscheint es möglich, dass es durch TGF- β 1-Stimulation von VSMCs über eine Induktion von Snail1 zu einer gesteigerten Genexpression von N-Cadherin kommt. Diesbezüglich müssen weitere Versuche erfolgen um diese Hypothese zu verifizieren.

Um unspezifische Expressionssteigerungen weitgehend auszuschließen wurden auch Gene anderer Proteine analysiert, die zum Aufbau von Cadherin-Komplexen beitragen. Unter anderem gehören hierzu α - und β -Catenin und p120ctn. Bei keinem der genannten Proteine wurde nach zwei oder 18 Stunden eine Änderung in der Genexpression beobachtet.

Außerdem wurde in unseren Versuchen auch die Genexpression von Integrin- β 1 analysiert. Integrin- β 1 dient zum einen der Verbindung von Zellen mit der extrazellulären Matrix. Zum anderen spielen Integrine auch eine Rolle bei der Signaltransduktion. Dabei können sie das Zellwachstum, die Zellteilung, die Zelldifferenzierung und auch den Zelltod (Apoptose) regulieren.

Der mRNA-Gehalt von Integrin- β 1 in mit TGF- β 1 stimulierten VSMCs zeigte nach zwei und 18 Stunden keine Änderung im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen.

4.3 Effekt von TGF- β 1 auf Proteine in vaskulären glatten Muskelzellen

in vitro

Um die Effekte von TGF- β 1 auf der Proteinebene darzustellen wurde mittels Western Blot der spezifische Proteingehalt in VSMCs nach Stimulation untersucht.

Da ein erhöhter Snail1-mRNA-Gehalt nach zweistündiger Stimulation der VSMCs mit TGF- β 1 nachgewiesen wurde, wählten wir für die Analyse des Snail1-Proteingehalts eine Dauer der TGF- β 1-Stimulation von sechs Stunden.

Für Snail1 zeigt sich nach sechsständiger Stimulation der VSMCs mit TGF- β 1 ein erhöhter Proteingehalt in den Zellen. Diese Steigerung an Snail1-Protein ist auch nach 18-stündiger Stimulation mit TGF- β 1 nachweisbar. Die Zugabe von SB505124 inhibiert den Anstieg an Snail1 am Gesamtprotein in den Zellen, was die Abhängigkeit dieses Vorgangs vom TGF- β -Signalweg zeigt.

Für N-Cadherin ist ebenfalls eine Steigerung des Proteingehalts nach Stimulation der Zellen mit TGF- β 1 für 18 Stunden zu sehen. Ebenso wie im Fall von Snail1, führt eine Hemmung der TGF- β Typ I-Rezeptorkinase (mit SB505124) zum Verschwinden des Anstiegs an N-Cadherin-Protein.

Eine simultane Expressionssteigerung von Snail1 und N-Cadherin konnte – in Einklang mit unseren Ergebnissen – in Krebszellen (Magenkarzinom vom diffusen Typ, Klassifikation nach Lauren) gefunden werden (Rosivatz et al. 2002). In den entsprechenden Versuchen fand sich zwar eine Repression von E-Cadherin, die vermutlich durch Snail unterstützt wird, allerdings konnte ebenso eine gesteigerte Expression von N-Cadherin nachgewiesen werden, deren molekulare Ursache nicht bekannt ist.

Des Weiteren konnte im Western Blot ein mit dem N-Cadherin-Anstieg einhergehender Anstieg an β -Catenin nachgewiesen werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine Komplexbildung von N-Cadherin und β -Catenin stattfindet und die Proteine somit einen Adhäsionskomplex aufbauen. Auch die Expressionssteigerung von β -Catenin ist auf den Einsatz des ALK5-Inhibitors SB505124 sensibel und zeigt dementsprechend einen Abfall auf annähernd Ausgangsniveau bei Blockade des ALK5 TGF- β -Rezeptors. Der Einfluss von TGF- β auf Proteine, die neben Cadherinen für Adhäsion und Motilität notwendig sind, wie z.B. β -Catenin, ist in anderen Versuchen belegt (Giordano et. al. 2008) und deckt sich mit unseren Ergebnissen. β -Catenin wird eine Rolle in der Entstehung der neointimalen Hyperplasie zugeschrieben, es ist am Wnt-Signalweg beteiligt und reguliert über die Gene für Cyclin D1 und p21 den Zellzyklus in VSMCs (Quasnichka et. al. 2006).

Im Zeitverlauf der Stimulation von VSMCs mit TGF- β 1 von zehn Minuten bis 48 Stunden ist ein deutlicher Anstieg von N-Cadherin-Protein ab einer Stimulationsdauer von zwei Stunden erkennbar. Dieser Anstieg an N-Cadherin in VSMCs ist auch nach 48 Stunden noch sichtbar. Der Zeitverlauf korreliert mit einem Anstieg an phosphoryliertem und damit aktiviertem Akt (P-Akt). Akt wird häufig auch als Proteinkinase B bezeichnet.

Akt, ein Substrat der PI 3-Kinase, spielt eine Rolle in der epithelialen-mesenchymalen Transition. Zudem ist für endotheliale Zellen nachgewiesen, dass durch konstitutiv aktives Akt die mesenchymalen Marker N-Cadherin und Snail einen erhöhten Proteingehalt im Vergleich zu Zellen aufweisen, die Akt nicht exprimieren. Diese Daten belegen, dass Akt in diesen Zellen mit für eine endotheliale-mesenchymale Transition verantwortlich sein kann (Meadows et. al. 2009).

Zur Differenzierung der Abhängigkeit des N-Cadherin-Anstiegs in VSMCs von bestimmten Kinasen wurden verschiedene Inhibitoren der Signalkaskade im TGF- β -Signalweg während der Stimulation der VSMCs mit TGF- β 1 eingesetzt. Anschließend erfolgte zur Analyse des Proteingehalts von N-Cadherin ein Western Blot.

Nach sechsständiger Stimulation der Zellen mit TGF- β 1 und dem Zusatz jeweils eines bestimmten Inhibitors (siehe 3.3, Abbildung 15) zeigt sich in unseren Versuchen eine Abhängigkeit des N-Cadherin-Anstiegs in VSMCs von der Phosphoinositid 3-Kinase (PI 3-Kinase). SB505124 hemmt die ALK5 und somit alle folgenden Vorgänge in der TGF- β -Signalkette. Der Proteingehalt an N-Cadherin und P-Akt zeigt daher keinen Anstieg unter diesen Versuchsbedingungen.

Ähnlich verhält es sich unter Verwendung von LY294002, einem Hemmstoff der PI 3-Kinase. Wird den Zellen zu TGF- β 1 zusätzlich PD98059, ein Inhibitor der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinase (MEK1) zugesetzt, so zeigt sich weiterhin die von TGF- β 1 hervorgerufene Erhöhung des Proteingehalts von N-Cadherin und P-Akt. Auf den Gesamtgehalt von Akt in VSMCs haben die genannten Inhibitoren keinen Einfluss.

Durch die Blockade der genannten Kinasen konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung der PI 3-Kinase für eine Erhöhung des N-Cadherin-Proteingehalts in VSMCs nötig ist. Der gleichzeitig nachgewiesene Anstieg im Gehalt an P-Akt,

der über einen Zeitraum von 48 Stunden mit dem N-Cadherin-Anstieg korreliert, könnte ursächlich für den erhöhten N-Cadherin-Proteingehalt sein. Dies zeigen Meadows et. al. für endotheliale Zellen. Um diesen möglichen Zusammenhang in VSMCs zu verifizieren müssen weitere Versuche, z.B. unter Ausschaltung von Akt, erfolgen.

Für einen Smad- und auch PI 3-Kinase-abhängigen Anstieg von Snail1 auf Transkriptionsebene gibt es für epitheliale Zelllinien im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition Belege, die unsere Ergebnisse stützen (Peinado et. al. 2003, Moustakas u. Heldin 2005).

Versuche mittels Affinitäts-Präzipitation (in Zusammenarbeit mit K. Giehl u. C. Längle durchgeführt) zeigen eine TGF- β 1 induzierte Steigerung der RhoA-Aktivität, die sich durch einen vermehrten Gehalt an RhoA-GTP (aktive Form) ausdrückt (siehe 3.3, Abbildung 16). Der Gehalt an RhoA – in seiner inaktiven Form – wird durch Stimulation mit TGF- β 1 nicht beeinflusst. Die Rolle von RhoA bei der epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung ist beschrieben (Bhowmick et. al. 2001). In den Versuchen von Bhowmick et. al. wurde an epithelialen Brustdrüsenzellen von Mäusen neben der Aktivierung von RhoA durch TGF- β 1 auch eine durch TGF- β 1 hervorgerufene Steigerung an N-Cadherin nachgewiesen. SB505124 als Inhibitor der ALK5 verhindert auch in diesen Versuchen effektiv die vermehrte Aktivierung der Rho-GTPasen durch TGF- β 1.

RhoA-GTP sorgt in den Zellen durch Einfluss auf nachgeschaltete Zellproteine für vielfältige Änderungen des Aktin-Zytoskeletts. Hierzu gehören u.a. die Polymerisation von Aktin, die Quervernetzung von Aktin und Myosin sowie die Stabilisierung des filamentösen Aktins (F-Aktin). Außerdem sind auch stabilisierende Einflüsse auf das Mikrotubulussystem nachgewiesen (Raftopolou u. Hall 2004). Rho-GTPasen kommt somit eine Schlüsselrolle bei migratorischen Vorgängen zu, was vor allem bei der Untersuchung von Tumorzellen von Interesse ist. Die Smad-unabhängige Aktivierung von Rho-GTPasen wurde beschrieben (Moustakas u. Heldin 2005, Giehl et. al. 2007). Aber auch Smad-abhängige Aktivierungsvorgänge von RhoA erscheinen möglich. Hierfür wurde mit NET1 ein möglicher Schlüsselfaktor gefunden, der Smad-abhängig in der TGF- β -Signalkaskade als Bindeglied zwischen TGF- β -Rezeptoren und RhoA fungieren

könnte (Shen et. al. 2001). NET1 ist ein sog. Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) und ist als Aktivator von RhoA von Bedeutung.

Des Weiteren führte die Blockade der Adhäsionsfunktion von N-Cadherin an VSMCs zu einem geringen Anstieg an RhoA-GTP im Vergleich zur Kontrolle. Die Erhöhung an RhoA-GTP durch TGF- β 1 ist jedoch deutlich stärker (siehe 3.3, Abbildung 17).

In Versuchen an Myoblasten konnte von Charrasse et. al. eine N-Cadherin-induzierte Aktivierung von RhoA nachgewiesen werden (Charrasse et. al. 2002). Diese Daten decken sich mit den hier erzielten Ergebnissen. Der genaue Mechanismus auf dem diese Aktivierung von RhoA abläuft bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

4.4 Schlussfolgerungen

Die Stimulation von VSMCs mit TGF- β 1 *in vitro* zeigt in den vorgelegten Versuchen eine geringe Hemmung der Migration, die allerdings nicht signifikant ist. Überraschenderweise führt der Einsatz eines inhibitorischen Peptids, das die Adhäsionsfunktion von N-Cadherin unterbindet, zu einer signifikanten Hemmung der Migration von VSMCs. Diese Minderung der Migration ist nicht durch die Funktion von N-Cadherin als Adhäsionsmolekül zwischen benachbarten Zellen zu deuten, da aufgrund der Behinderung eines Aufbaus stabiler Zell-Zell-Adhäsion die promigratorischen Effekte überwiegen müssten. Somit könnten intrazellulär ablaufende Vorgänge nach extrazellulärer Blockade von N-Cadherin die Ursache für das verminderte Migrationsverhalten der Zellen sein. Vereinbar mit aktueller Forschung könnte der FGF-Rezeptor bei der Signaltransduktion von N-Cadherin eine wichtige Rolle spielen.

Da bisher die intrazellulären Cadherin-assoziierten Proteine vorwiegend als Verankerungsproteine betrachtet wurden, bestehen auch hier noch Ansatzmöglichkeiten für weitere Versuche um deren Rolle in der Signaltransduktion über N-Cadherin zu untersuchen.

TGF- β sorgt in seinen drei Isoformen für eine Steigerung der Expression von N-Cadherin, die mit einer gesteigerten Expression des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Snail1 korreliert. Diese Regulation der Genexpression ist

abhängig von der Aktivität der PI 3-Kinase, die als Bestandteil des Smad-unabhängigen Signalwegs der TGF- β -Kaskade identifiziert werden konnte. Die Rolle von Akt, einem Substrat der PI 3-Kinase, bei der Regulation von Snail1 und N-Cadherin in VSMCs muss weiter untersucht werden. In Endothelzellen ist bereits der stimulatorische Einfluss von Akt auf die Genexpression von N-Cadherin und Snail nachgewiesen. Dies könnte auch in VSMCs ein möglicher Signalweg der TGF- β -Kaskade sein.

Des Weiteren erhöht TGF- β 1 den Anteil an RhoA-GTP und hat somit Einfluss auf den zytoskelettalen Umbau in den Zellen. Allerdings ist der molekulare Mechanismus des Einflusses von TGF- β auf RhoA in VSMCs nicht genau geklärt. Für die intrazelluläre Bedeutung einer extrazellulären Blockade von N-Cadherin spricht auch die Tatsache, dass durch dieses Vorgehen eine leichte RhoA-Aktivierung nachweisbar ist. Der Aktivierungsweg durch den dies verursacht wird bedarf noch dem Nachweis.

Da unsere Versuche an VSMCs *in vitro* durchgeführt wurden, muss man Einschränkungen in der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation in Kauf nehmen. Die für sämtliche Versuche verwendeten VSMCs befanden sich in den Passagen 6 bis 8 und liegen somit deutlich unter der durch die Firma Lonza angegebenen Verwendbarkeitsgrenze (bis Passage 15). Dennoch können auch diese Zellen unter Umständen nur eingeschränkt die Vorgänge *in vivo* simulieren. Für das Verständnis grundlegender molekularer Vorgänge in VSMCs, die an der Entstehung und Aufrechterhaltung atherosklerotischer Veränderungen und der neointimalen Hyperplasie – wie sie in stenotischen Läsionen von Hämodialyse-Shunts vorkommt – beteiligt sind, stellen die beschriebenen Ergebnisse einen weiteren Ansatzpunkt für mögliche Versuche dar. Diese sind nötig um neben dem Verständnis der pathologischen Vorgänge auch eine effektive Therapie für betroffene Patienten zu gewährleisten und somit die Mortalität der Atherosklerose, ihrer Begleit- und Folgeerkrankungen und der Shuntstenose zu senken.

5. Zusammenfassung

Shuntstenosen sind ein gefürchteter und häufiger Grund für spätes Therapieversagen von Dialysezugängen bei dialysepflichtigen Patienten. Auch die Atherosklerose stellt eine äußerst wichtige Erkrankung dar, mehr als die Hälfte aller Todesfälle geht in den westlichen Industrienationen auf Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen zurück. Unter der Vielzahl der an beiden Pathologien beteiligten Zelltypen kommt besonders vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung zu. Ein wichtiger Vertreter der beteiligten Signalmoleküle bei der neointimalen Hyperplasie ist der Transformierende Wachstumsfaktor-beta (TGF- β).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von TGF- β im Migrationsverhalten von VSMCs und sein Einfluss auf die N-Cadherin-Expression in diesen Zellen untersucht werden. Außerdem war Ziel, die intrazelluläre Kaskade des TGF- β -Signalwegs in VSMCs näher zu untersuchen und die Effekte dieses Wachstumsfaktors auf die Zellen zu charakterisieren. Durch Migrationsversuche mit einer modifizierten Boyden-Kammer konnte gezeigt werden, dass TGF- β (in seinen Isoformen 1-3) einen nicht signifikanten, geringen inhibitorischen Einfluss auf das Migrationsverhalten primärer vaskulärer glatter Muskelzellen hat. Die Blockade des Adhäsionsmoleküls N-Cadherin durch ein inhibitorisches Peptid *in vitro* hat einen signifikanten negativen Effekt auf die Migration der Zellen. In Kombination zeigen TGF- β und das Anti-N-Cadherin-Peptid den stärksten antimigratorischen Effekt auf VSMCs. Dieser antimigratorische Effekt durch Blockade von N-Cadherin ist nicht auf die Zelladhäsionsfunktion dieses Moleküls zurückzuführen, sondern könnte in intrazellulär ablaufenden Signalwegen begründet sein, die in Zusammenhang mit N-Cadherin gebracht werden können. Ein potentiell dabei beteiligtes Protein könnte der FGF-Rezeptor sein, für den in anderen Zelltypen eine Interaktion mit N-Cadherin nachgewiesen wurde. Dies könnte auch in VSMCs der Fall sein.

Um den Einfluss von TGF- β auf die Differenzierung der VSMCs zu analysieren wurde der mesenchymale Differenzierungsmarker N-Cadherin untersucht. Sowohl auf mRNA- (Boten-Ribonukleinsäure) als auch auf Proteinebene konnte in VSMCs eine Erhöhung des Gehalts an N-Cadherin nach TGF- β -Stimulation nachgewiesen

werden. In der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) ist neben einer verminderten Genexpression von E-Cadherin eine gesteigerte Genexpression von N-Cadherin beschrieben. Dabei könnte der Transkriptionsfaktor Snail1, ein Transkriptionsfaktor der Zink-Finger-Familie, eine entscheidende Rolle spielen. Dies ist in endothelialen Zellen belegt und bedarf in VSMCs noch der Klärung.

Zur Beurteilung der intrazellulären Signalvorgänge wurde deshalb mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) die Genexpression von VSMCs analysiert. Hierbei konnte bei mit TGF- β 1 stimulierten Zellen eine frühzeitige (d.h. nach zwei Stunden nachweisbare) Steigerung von Snail1-Boten-Ribonukleinsäure (Snail1-mRNA) festgestellt werden. Diese Steigerung war auch nach 18 Stunden noch nachweisbar. Nach 18 Stunden Stimulation wurde auch für das N-Cadherin-Gen eine Expressionssteigerung nachgewiesen. Beide Effekte konnten durch Inhibitoren der TGF- β Typ I-Rezeptorkinase aufgehoben werden. Auf Proteinebene wurden im Western Blot verschiedene Zellproteine in VSMCs auf Veränderungen im Expressionsmuster nach Stimulation durch TGF- β 1 untersucht. Die Ergebnisse zeigten einen erhöhten Anteil an N-Cadherin und Snail1 bei konstantem Gesamtproteingehalt. Snail1 kann somit als positiver Effektor auf die Expression von N-Cadherin in VSMCs gesehen werden.

Eine Korrelation besteht zudem zwischen dem Anstieg des N-Cadherin-Gehalts und einem Anstieg der Proteinkinase B-Aktivität (Aktive Form = P-Akt). Diese Kinase stellt ein Substrat der Phosphoinositid 3-Kinase (PI 3-Kinase) dar. Durch spezifische Hemmung der PI 3-Kinase lässt sich die gesteigerte Expression von N-Cadherin inhibieren. Damit zeigt sich eine Abhängigkeit des durch TGF- β 1 induzierten Anstiegs an N-Cadherin in VSMCs vom PI 3-Kinase-Signalweg. Inwiefern Akt dabei die entscheidende Rolle spielt muss noch geklärt werden.

Ein weiteres Protein, das mit der Regulation zellmigratorischer Vorgänge in Zusammenhang gebracht wird, die GTPase RhoA (*Ras homolog gene family, member A*), erweist sich in ihrer Aktivität als abhängig von TGF- β 1. Dies konnte durch Affinitäts-Präzipitation nachgewiesen werden. Inwieweit ein Zusammenhang zwischen gesteigerter RhoA-Aktivität und der Expressionssteigerung von Snail1 besteht ist nicht bekannt und bedarf weiterer Forschung. Die vorgelegte Arbeit weist TGF- β 1 eine wichtige Rolle bei der Entstehung der intimalen Fibrogenese und der Bildung atherosklerotischer Plaques durch Differenzierung vaskulärer glatter Muskelzellen und der Induktion Myofibroblasten-abhängiger Prozesse zu.

6. Literaturverzeichnis

1. Abe K, Takeichi M: EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13-19 (2008)
2. Abedi H, Zachary I: Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovasc Res* 30: 544-556 (1995)
3. Alattia JR, Kurokawa H, Ikura M: Structural view of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Cell Mol Life Sci* 55: 359-367 (1999)
4. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL: Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* 275: 36803-36810
5. Barcellos-Hoff MH, Akhurst RJ: Transforming growth factor-beta in breast cancer: too much, too late. *Breast Cancer Res* 11: 202 (2009)
6. Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P: Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest* 128: 585-590 (2005)
7. Besarab A, Ravani P, Spergel LM, Roy-Chaudhury P, Asif A: The native arteriovenous fistula in 2007. Research needs. *J Nephrol* 20: 668-673 (2007)
8. Bhowmick NA, Giassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL: Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12: 27-36 (2001)

-
9. Blindt R, Bosserhoff AK, Dammers J, Krott N, Demircan L, Hoffmann R, Hanrath P, Weber C, Vogt F: Downregulation of N-Cadherin in the neointima stimulates migration of smooth muscle cells by RhoA deactivation. *Cardiovasc Res* 62: 212-222 (2004)
 10. Castañares C, Redondo-Horcajo M, Magán-Marchal N, ten Dijke P, Lamas S, Rodríguez-Pascual F: Signaling by ALK5 mediates TGF-beta-induced ET-1 expression in endothelial cells: a role for migration and proliferation. *J Cell Sci* 120: 1256-1266 (2007)
 11. Charrasse S, Meriane M, Comunale F, Blangy A, Gauthier-Rouvière C: N-Cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. *J Cell Biol* 158: 953-965 (2002)
 12. Chung CH, Lin KT, Chang CH, Peng HC, Huang TF: The integrin alpha2beta1 agonist, aggrexin, promotes proliferation and migration of VSMC through NF-kB translocation and PDGF production. *Br J Pharmacol* 156: 846-856 (2009)
 13. De Crane B, Gilbert B, Stove C, Bruyneel E, van Roy F, Berx G: The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res* 65: 6237-6244 (2005)
 14. De Wever O, Westbroek W, Verloes A, Bloemen N, Bracke M, Gespach C, Bruyneel E, Mareel M: Critical role of N-cadherin in myofibroblast invasion and migration in vitro stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF-beta or wounding. *J Cell Sci* 117: 4691-4703 (2004)
 15. Doran AC, Meller N, McNamara CA: Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 812-819 (2008)

-
16. Engel L, Ryan U: TGF-beta1 reverses PDGF-stimulated migration of human aortic muscle cells in vitro. *Cell Dev Biol Anim* 33: 443-451 (1997)
 17. Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G, Gress TM: Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 61: 4222-4228 (2001)
 18. Friedl R, Li J, Schumacher B, Hanke H, Waltenberger J, Hannekum A, Stracke S: Intimal hyperplasia and expression of transforming growth factor-beta1 in saphenous veins and internal mammary arteries before coronary artery surgery. *Ann Thorac Surg* 78: 1312-1318 (2004)
 19. George SJ, Beeching CA: Cadherin:catenin complex: A novel regulator of vascular smooth muscle cell behaviour. *Atherosclerosis* 188: 1-11 (2006)
 20. Giehl K, Imamichi Y, Menke A: Smad4-independent TGF- β signaling in tumor cell migration. *Cells Tissues Organs* 185: 123-130 (2007)
 21. Giordano A, Romano S, Mallardo M, D'Angelillo A, Cali G, Corcione N, Ferraro P, Romano MF: FK506 can activate transforming growth factor-beta signalling in vascular smooth muscle cells and promote proliferation. *Cardiovasc Res* 79: 519-526 (2008)
 22. Grainger DJ: Transforming growth factor β and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 399-404 (2004)
 23. Horiguchi K, Shirakihara T, Nakano A, Imamura T, Miyazono K, Saitoh M: Role of Ras signaling in the induction of snail by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 284: 245-253 (2009)

-
24. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S: Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* 116: 1959-1967 (2003)
 25. Jamora C, Lee P, Kocieniewski P, Azhar M, Hosokawa R, Chai Y, Fuchs E: A signaling pathway involving TGF-beta2 and snail in hair follicle morphogenesis. *PLoS Biol* 3: e11 (2005)
 26. Jones M, Sabutini PJB, Lee FSH, Bendeck MP, Langille BL: N-Cadherin upregulation and function in response of smooth muscle cells to arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1972-1977 (2002)
 27. Kojima S, Harpel RC, Rifkin DB: Lipoprotein (a) inhibits the generation of transforming growth factor beta: an endogenous inhibitor of smooth muscle cell migration. *J Cell Biol* 113: 1439-1445 (1991)
 28. Koutsouki E, Aguilera-Garcia CM, Sala-Newby GB, Newby AC, George SJ: Cell-cell contact by cadherins provides an essential survival signal to migrating smooth muscle cells. *Eur Heart J* 24: 1838 (2003)
 29. Kreuzer J, Tiefenbacher C: Atherosklerose Taschenatlas spezial. Thieme, Stuttgart, S. 2-4 (2003)
 30. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN: Robbins Basic Pathology. Saunders, Philadelphia, S. 342-344 (2007)
 31. Lee RT: Atherosclerotic lesion mechanics versus biology. *Z Kardiol* 89: 80-84 (2000)
 32. Lee T, Roy-Chaudhury P: Advances and new frontiers in the pathophysiology of venous neointimal hyperplasia and dialysis access stenosis. *Adv Chronic Kidney Dis* 16: 329-338 (2009)

-
33. Lin SJ, Lerch TF, Cook RW, Jardeky TS, Woodruff TK: The structural basis of TGF-beta, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. *Reproduction* 132: 179-190 (2006)
 34. Lusis AJ: Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-241 (2000)
 35. Lyon CA, Johnson JL, Williams H, Sala-Newby GB, George SJ: Soluble N-Cadherin overexpression reduces features of atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 195-201 (2009)
 36. Ma J, Wang Q, Fei T, Han JD, Chen YG: MCP-1 mediates TGF- β -induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood* 109: 987-994 (2007)
 37. Meadows KN, Iyer S, Stevens MV, Wang D, Shechter S, Perruzzi C, Camenisch TD, Benjamin LE: Akt promotes Endocardial-Mesenchyme Transition. *J Angiogenesis Res* 1:2 (2009)
 38. Mercado C, Salman L, Krishnamurthy G, Choi K, Artikov S, Thomas I, Merrill D, Asif A: Early and late fistula failure. *Clin Nephrol* 69: 77-83 (2008)
 39. Michon IN, Penning LC, Molenaar TJ, Berkel TJ, Biessen EA, Kuiper J: The effect of TGF-beta receptor binding peptides on smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 1279-1286 (2002)
 40. Mitchell ME, Sidawy AN: The pathophysiology of atherosclerosis. *Semin Vas Surg* 11: 131-141 (1998)
 41. Miyazano K: Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85: 314-323 (2009)
 42. Moustakas A, Heldin CH: Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 118: 3573-3584 (2005)

-
43. Newby AC, Zaltsman AB: Fibrous cap formation or destruction – the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res* 41: 345-360 (1999)
 44. Newby AC: Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 69: 614-624 (2006)
 45. Niessen CM, Gottardi CJ: Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta* 1778: 562-571 (2008)
 46. Peinado H, Quintanilla M, Cano A: Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 278: 21113-21123 (2003)
 47. Pukac L, Huangpu J, Karnovsky MJ: Platelet-derived growth factor-BB, insulin-like growth factor-I, and phorbol ester activate different signaling pathways for stimulation of vascular smooth muscle cell migration. *Exp Cell Res* 242: 548-560 (1998)
 48. Quasnicka H, Slater SC, Beeching CA, Boehm M, Sala-Newby GB, George SJ: Regulation of smooth muscle cell proliferation by beta-catenin/T-cell-factor signaling involves modulation of cyclin D1 and p21 expression. *Circ Res* 99: 1329-1337 (2006)
 49. Raftopoulou M, Hall A: Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*. 265: 23-32 (2004)
 50. Raines EW, Ross R: Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 69: 30-37 (1993)
 51. Ravani P, Spergel LM, Asif A, Roy-Chaudhury P, Besarab A: Clinical epidemiology of arteriovenous fistula in 2007. *J Nephrol* 20: 141-149 (2007)

-
52. Resink TJ, Philippova M, Joshi MB, Kyriakakis E, Erne P: Cadherins in cardiovascular disease. *Swiss Med Wkly* 139: 122-134 (2009)
 53. Roberts AB: Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab* 24: 111-119 (1998)
 54. Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Luber B, Busch R, Höfler H, Becker KF: Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol* 161: 1881-1891 (2002)
 55. Roy-Chaudhury P, Sukhatme VP, Cheung AK: Hemodialysis vascular access dysfunction: a cellular and molecular viewpoint. *J Am Soc Nephrol* 17: 1112-1127 (2006)
 56. Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J: TGF- β signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res* 74: 196-206 (2007)
 57. Samarakoon R, Higgins PJ: Integration of non-SMAD and SMAD signaling in TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression in vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 100: 976-983 (2008)
 58. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA: Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* 9: 447-453 (2009)
 59. Santos MG, Pegoraro M, Sandrini F, Macuco EC: Risk Factors for the Development of Atherosclerosis in Childhood and Adolescence. *Arg Bras Cardiol* 90: 276-283 (2007)
 60. Shen X, Li J, Hu PP, Waddell D, Zhang J, Wang XF: The activity of guanine exchange factor NET1 is essential for transforming growth factor-beta-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* 276: 15362-15368 (2001)

-
61. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 14: 840-856 (1994)
 62. Stoll G, Bendszus M: Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke* 37: 1923-1932 (2006)
 63. Stoneman VE, Bennett MR: Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications. *Clin Sci (Lond.)* 107: 343-354 (2004)
 64. Stracke S, Konner K, Köstlin I, Friedl R, Jehle PM, Hombach V, Keller F, Waltenberger J: Increased expression of TGF-beta1 and IGF-I in inflammatory stenotic lesions of hemodialysis fistulas. *Kidney Int* 61: 1011-1019 (2002)
 65. Sun L, Diamond ME, Ottaviano AJ, Joseph MJ, Ananthanarayan V, Munshi HG: Transforming growth factor-beta 1 promotes matrix metalloproteinase-9-mediated oral cancer invasion through snail expression. *Mol Cancer Res* 6: 10-20 (2008)
 66. Thuault S, Tan EJ, Peinado H, Cano A, Heldin CH, Moustakas A: HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 283: 33437-33446 (2008)
 67. Teicher BA: Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor-beta. *Cancer Metastasis Rev* 20: 133-143 (2001)
 68. Teicher BA: Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res* 13: 6247-6251 (2007)

-
69. Ten Dijke P, Hill CS: New insights into TGF-beta-Smad signaling. *Trends Biochem Sci* 29: 265-273 (2004)
 70. Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Dryjski M: Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res* 281: 421-433 (1995)
 71. Verrecchia F, Mauviel A: Transforming growth factor- β and fibrosis. *World J Gastroenterol* 13: 3056-3062 (2007)
 72. Vincent T, Neve EP, Johnson JR, Kukalev A, Rojo F, Albanell J, Pietras K, Virtanen I, Philipson L, Leopold PL, Crystal RG, de Herreros AG, Moustakas A, Petterson RF, Fuxe J: A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 11: 943-950 (2009)
 73. Weis WI, Nelson WJ: Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J Biol Chem* 281: 35593-35597 (2006)
 74. Williams EJ, Williams G, Howell FV, Skaper SD, Walsh FS, Doherty P: Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. *J Biol Chem* 276: 43879-43886 (2001)

Danksagung

Hiermit möchte ich allen Personen danken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Doktormutter, PD Dr. med. Sylvia Stracke, für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Auch über eine Entfernung von fast 1.000 km konnten wir in Kontakt bleiben und ich somit meine Arbeit im Labor und am Schreibtisch voranbringen.

Hier sei auch in besonderem Maße Rosi Herzog gedankt, die mich in die Laborarbeit eingeführt, jederzeit bei Problemen beraten und fortwährend unterstützt hat.

Ein weiterer besonderer Dank gilt der AG um Prof. Dr. rer. nat. Andre Menke. Bei ihm und seinen Mitarbeitern Prof. Dr. rer. nat. Klaudia Giehl, Iris Baum und Claudia Längle möchte ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme, die Unterstützung im Labor und die Überlassung der Ergebnisse bedanken.

Andre Menke sei im Speziellen gedankt. Ohne seine Geduld, Motivation, Expertise, konstruktive Kritik und eine immer offene Tür wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meiner Schwester Sigrun Nüßle und meiner Kommilitonin Agathe Paczulla möchte ich herzlich für das Korrekturlesen und die Ratschläge zur Verbesserung meiner Arbeit danken.

Abschließend möchte ich ganz besonders meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist, danken. Ohne Ihre bedingungslose Unterstützung in allen Belangen wären weder mein sorgenfreies Studium noch diese Arbeit möglich gewesen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 17. Januar 1985
 Geburtsort: Ulm
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig
 Eltern: Johannes Peter Nüßle, Maurermeister
 Marlene Nüßle, geb. Keller, Arzthelferin
 Geschwister: Sigrun Nüßle

Ausbildung:

1991 – 1995: Grundschule Finningen / Grundschule Reutti
 1995 – 2004: Lessing-Gymnasium Neu-Ulm
 2004: Allgemeine Hochschulreife, Note 1,6
 2004 – 2005: Grundwehrdienst (Gebirgssanitätsregiment Kempten
 und Bundeswehrkrankenhaus Ulm)
 seit 2005: Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
 2007: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 1,5
 seit 2008: Doktorarbeit in der Abteilung Innere Medizin I, Sektion
 Nephrologie des Universitätsklinikums Ulm
 Famulaturen: Innere Medizin Ambulanz, Bundeswehrkrankenhaus
 Ulm
 Abteilung Chirurgie, Stiftungsklinik Weißenhorn
 Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A,
 Universitätsklinikum Greifswald
 Innere Medizin I, Kreiskrankenhaus Blaubeuren
 2011: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 1,5

Veröffentlichungen, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind:**1. Artikel:**

Nüßle J, Giehl K, Herzog R, Stracke S, Menke A: TGF-beta1 suppresses vascular smooth muscle cell motility by expression of N-Cadherin. Biol Chem 392: 461-74 (2011)

2. Poster:

Stracke S, Herzog R, Nüßle J, Keller F, Menke A: N-Cadherin upregulation and antimigratory effect of TGF-beta in vascular smooth muscle cells in vitro.

27. – 30.09.2008 Kongress für Nephrologie, Tübingen

Nüßle J, Menke A, Herzog R, Keller F, Stracke S: TGF-beta induces N-Cadherin upregulation via Snail1 and Smad2/3 and inhibits migration in vascular smooth muscle cells in vitro.

26. – 29.09.2009 Kongress für Nephrologie, Göttingen

Stracke S, Nüßle J, Herzog R, Menke A: Pharmacological modulation of TGF-beta1 signalling identifies pathways involved in N-cadherin upregulation in vascular smooth muscle cells.

27. – 30.09.2009 International Meeting on Signal Transduction and Disease, Aachen

