

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen  
Interdisziplinäre Intensivstation und Intermediate Care Unit  
Leitender Oberarzt Professor Dr. R. Riessen**

**Effekte von all-trans Retinsäure auf  
Metalloproteinasen und extrazelluläre Matrix  
in humanen glatten Muskelzellen:  
Eine in-vitro Studie**

INAUGURAL-DISSERTATION  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
**Jasmin Dittmann**

aus  
Sindelfingen

2008

Dekan :

Professor Dr. med. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Riessen

2. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Tepe

Meinen Eltern Bärbel und Horst Dittmann  
In Liebe und Dankbarkeit gewidmet



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Arteriosklerose und Restenose nach Angioplastie	1
1.2	Therapeutische Ansätze	3
1.3	Extrazelluläre Matrix (EZM)	5
1.3.1	Proteoglykane	6
1.3.2	Glykoproteine	6
1.3.3	Kollagene	7
1.4	Matrix Metalloproteinasen	8
1.4.1	MMP-2 oder Gelatinase A	11
1.4.2	MMP-9 oder Gelatinase B	12
1.5	Retinoide	12
1.5.1	Effekte auf MMPs und TIMPs	14
1.6	Zielsetzung	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Testsubstanzen	16
2.1.1	All-trans Retinsäure	16
2.2	Zellausgangsgewebe	16
2.3	Gewinnung von haSMC aus Mediastücken	17
2.4	Kultivierung	18
2.5	Proteinbestimmung	19
2.6	SDS-PAGE	20
2.6.1	Zymographie	21
2.6.2	Westernblot Analyse	21
2.7	Northernblot Analyse	22
2.8	Auswertung	23

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1	MMP-2 und MMP-9 in nicht-stimulierten haSMC	24
3.2	Effekte von TNF $\alpha$ /PMA auf die MMP-2 und MMP-9 Synthese	26
3.3	Effekte von atRA auf die MMP-2 und MMP-9 Synthese	28
3.3.1	Retinsäurestimulation über 12 Stunden	30
3.3.2	Retinsäurestimulation über 24 Stunden	31
3.3.3	Retinsäurestimulation über 48 Stunden	32
3.3.4	Retinsäurestimulation über 72 Stunden	33
3.4	Effekte von atRA auf die mRNA-Expression verschiedener EZM-Proteine	34
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>36</b>
4.1	MMP-2 und MMP-9 in nicht-stimulierten haSMC	36
4.2	Effekte von TNF $\alpha$ /PMA auf die MMP-2 und MMP-9 Synthese	37
4.3	Effekte von atRA auf die MMP-2 und MMP-9 Synthese	38
4.4	Effekte von AtRA auf die mRNA-Expression verschiedener EZM-Proteine	39
4.5	Ausblick	40
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>53</b>



# 1 Einleitung

An der Spitze aller Todesursachen in den westlichen Industrienationen stehen die Herz-Kreislauf-erkrankungen.<sup>27</sup> Die Arteriosklerose mit ihren ischämischen Erkrankungen an Extremitäten, Herz und anderen Organen, sowie zerebralen Veränderungen steht dabei an vorderster Stelle.<sup>75</sup>

Eine Autopsiestudie<sup>89</sup> aus den USA lässt eine Verschiebung der Prävalenz zu den älteren Jahrgängen erkennen: nicht nur die Mortalität an der koronaren Herzkrankheit (KHK) zeigte bei den 20-59jährigen im Zeitraum von 1979-1994 eine abnehmende Tendenz, sondern auch die Intensität der Koronarsklerose. Trotzdem bleibt nach *Roger*<sup>89</sup> die KHK ein bedeutendes Problem, vorrangig bei den über 60 jährigen. Mit der Zunahme des älteren Bevölkerungsanteils wird die Prävalenz der KHK in den nächsten 30 Jahren sogar wieder ansteigen.<sup>7</sup>

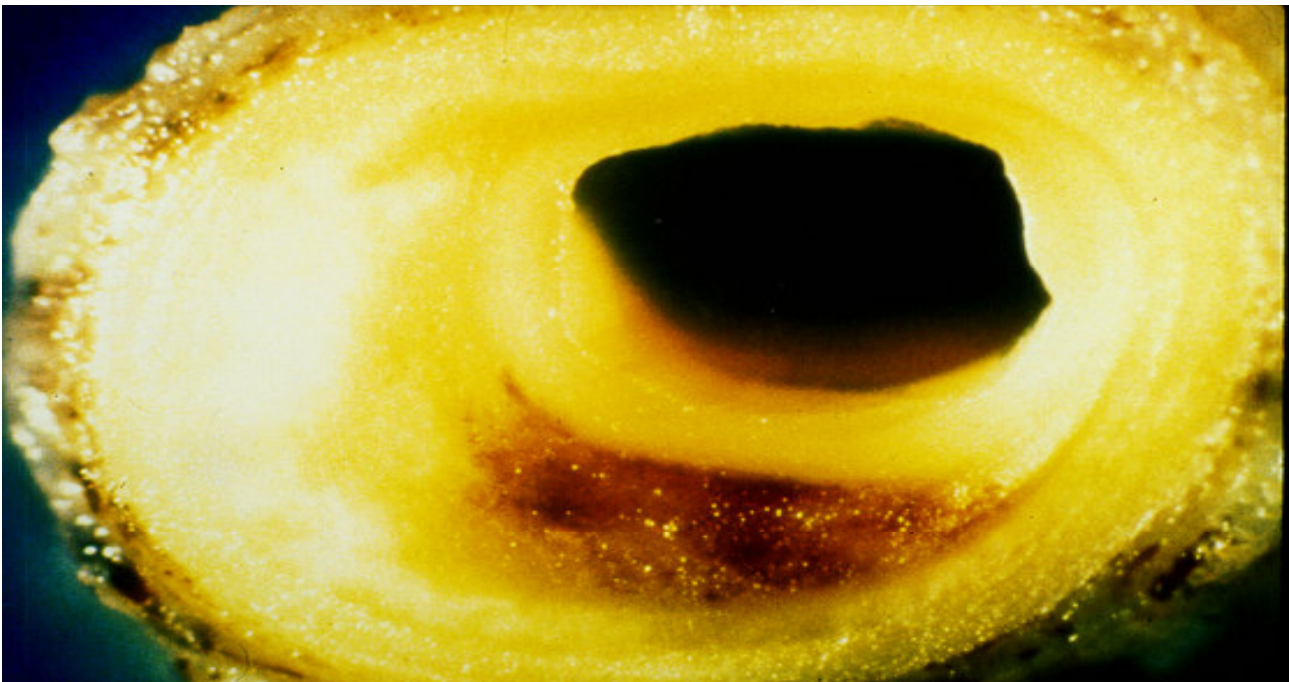


Abbildung 1: Querschnitt durch ein atherosklerotisch verändertes Gefäß (Stary)

## 1.1 Arteriosklerose und Restenose nach Angioplastie

Die Arteriosklerose ist ein Sammelbegriff für primär nicht entzündliche Arterienerkrankungen, bei denen ein fibröser Umbau zu einer Verdickung, Verhärtung und zu einem Elastizitätsverlust der Gefäßwand führt. Dazu gehören die Atherosklerose, die



Mönckebergsche verkalkende Mediasklerose, die Arteriosklerose sowie andere Manifestationen der hypertonen Vaskulopathie.

Die Atherosklerose ist die von der World Health Organisation (WHO) vorgeschlagene Bezeichnung der Arterienverkalkung. Sie ist definiert als variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Calciumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia. Mit Fortschreiten der Atherosklerose kommt es zu einer zunehmenden Stenose des Arterienquerschnittes bis hin zum vollständigen Verschluss des Gefäßes. Distal der Verengung kann dies zu einer Ischämie in dem von dieser Arterie versorgten Gewebe führen. Sofern das Gewebe nicht durch andere Arterien ausreichen mitversorgt wird, kann die Stenose so den Untergang des Funktionsgewebes verursachen. Ein häufiges Beispiel hierfür ist der Myokardinfarkt bei koronarer Herzkrankheit. Eines der ersten Ereignisse in der Formation von atherosklerotischen Plaques ist die Adhäsion von zirkulierenden Monozyten am Gefäßendothel. In das subendotheliale Gewebe übertretene Monozyten/Makrophagen leiten eine Serie von komplexen Zell-Interaktionen ein. Hierzu gehört die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie tumornecrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1) und platelet-derived growth factor (PDGF), welche die Synthese von Metalloproteinasen (MMP) in humanen arteriellen smooth muscle cells (haSMC) und Gefäßendothelzellen (EC) stimulieren.<sup>42</sup> Die Matrix der Gefäßwand wird mit der Zeit durch Migration und Proliferation von Zellen und der Ablagerung von extrazellulärer Matrix zu einem Plaque modifiziert.<sup>25</sup> Der typische atherosklerotische Plaque ist charakterisiert durch eine Verdickung und eine asymmetrische Läsion, welche in das Gefäßlumen reicht. Die Läsion selbst kann Fibrinogen oder von einer Kappe umschlossene Lipide enthalten. Die Kappe setzt sich aus glatten Muskelzellen und einer kompakten EZM zusammen, die vorwiegend aus Kollagenfasern und Proteoglykanen besteht. Zudem können Thrombozyten an den exponierten Kollagenfasern der nichtendothelialisierten Gefäßoberflächen adhären und aggregieren. Sie setzen dort eine Reihe von Substanzen wie Thrombospondin (TSP), Thromboxan, PDGF und TGF- $\beta$  frei, welche eine migrations- und proliferationsfördernde Wirkung auf glatte Muskelzellen haben.<sup>34</sup> Auch MMP sind an der Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen sowie an den atherosklerotischen Umbauvorgängen in der Gefäßwand beteiligt. *Brown et al.*<sup>14</sup> zeigten, daß die Aktivität von MMP und eine progrediente Gefäßverengung mit einer Zunahme der Produktion von intrazellulärer Gelatinase B bei Patienten mit instabiler Angina Pectoris

korreliert. MMP werden unter anderem von haSMC in atherosklerotischen Plaques exprimiert.<sup>45,36</sup> Man geht davon aus, daß die Balance zwischen MMP und ihren Inhibitoren gestört ist.<sup>13</sup> Zytokine wie TNF $\alpha$  induzieren eine erhöhte Produktion von MMP in einem lokalen Bereich von mechanischem Streß und aktivieren eine proteolytische Kaskade mit dem Ergebnis der Plaqueruptur und Gefäßokklusion.

Bei der Restenose handelt es sich um einen Wiederverschluß oder um eine Wiederverengung einer durch ein Angioplastieverfahren eröffneten bzw. erweiterten Koronarstenose. Die Restenose nach Angioplastie stellt im Grunde eine nicht einheitliche Krankheitsidentität dar, nicht zuletzt aufgrund differenter Betrachtungsebenen und Definitionskriterien: zellbiologisch/histologisch kann die Rezidivläsion als segmental umschriebene Wundheilungsantwort auf eine interventionsassoziierte Traumatisierung der Gefäßwand aufgefasst werden. Ein wesentliches morphologisches Merkmal der Restenose ist die Entwicklung von Granulationsgewebe, das in Arterien als intimale Hyperplasie bezeichnet wird. Zusätzlich beinhaltet sie auch im Rahmen des Ersteingriffs intraluminal verbliebene bzw. erneut prolabierte Plaqueanteile. Studien zeigten jedoch, daß die intimale Hyperplasie nur zu etwa 1/3 zur Lumeneinengung beiträgt.<sup>72,24</sup> Die restlichen 2/3 sind bedingt durch eine Schrumpfung des gesamten Gefäßdurchmessers; dies bezeichnet man als arterielles Gefäßremodeling.<sup>93,30</sup> Klinisch kündigt sich die Restenose häufig durch das Wiederauftreten typischer Beschwerden an. Beweisend oder ausschließend ist jedoch nur der angiographische Befund, der sich im allgemeinen in einem Zeitraum von sechs Monaten nach Angioplastie manifestiert. Serielle angiographische Verlaufskontrollen nach Ballondilatation haben gezeigt, daß die Restenoserate tatsächlich ein zeitbezogenes Phänomen, mit einer maximalen Inzidenz nach 2-3 Monaten, darstellt .

## 1.2 Therapeutische Ansätze

Zu den wichtigsten Risikofaktoren der Arterioskleroseentstehung gehören Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, chronische Niereninsuffizienz, CRP-Erhöhung, Zigarettenrauchen, Bewegungsmangel, Streß, Adipositas, genetische Faktoren, Alter und Geschlecht. Die große Anzahl an epidemiologisch definierten Risikofaktoren und die daraus resultierenden Kombinationsmöglichkeiten von biologischen und biochemischen Interaktionen erschwert die Identifizierung von primär schädigenden

Ursachen. Der chronisch degenerative Charakter und die häufig erst im Alter zu beobachtende klinische Manifestation erschweren zudem die Umsetzung von Erkenntnissen aus der molekularen Grundlagenforschung und aus tierexperimentellen Untersuchungen. Aus diesem Grund gibt es bisher keine kausale Therapie der manifesten Atherosklerose. Aus den epidemiologischen Daten wurde jedoch ein Konzept der primären und sekundären Prävention der Herz-Kreislauf-erkrankungen entwickelt. Die Umsetzung der primären Präventionsmaßnahmen in großen Populationen ist aufgrund historisch gewachsener Traditionen ein schwieriger und langjähriger Prozess. Erkenntnisse aus der molekularbiologischen Grundlagenforschung sind daher eine entscheidende Voraussetzung, um erfolgreiche Strategien zur primären Prävention und zur kausalen Therapie der beginnenden und manifesten Atherosklerose zu entwickeln.

Zur Therapie bereits bestehender atherosklerotischer Gefäßveränderungen werden neben medikamentösen Therapien insbesondere bei fortgeschrittenen Läsionen operative und interventionelle Verfahren angewendet. Es haben sich neben der Bypasschirurgie in den letzten zwei Jahrzehnten verschiedene Angioplastietechniken zur Erweiterung oder Wiedereröffnung von atherosklerotischen Gefäßabschnitten durchgesetzt. Nachdem Stenosen großer Arterien schon früher mittels eines im Gefäßlumen vorgeschobenen, an der Stenose lokalisierten und dann aufgeblasenen Ballon aufgeweitet wurden, etablierte Grüntzig<sup>40</sup> dieses Verfahren zur Therapie von koronaren Stenosen. Die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) hat sich als sichere und komplikationsarme Methode mit hoher primärer Erfolgsrate bewährt. In den letzten Jahren hat sie eine immer größere Verbreitung gefunden und wird weltweit als Standard zur Therapie der meisten Koronarstenosen angewendet. Der langfristige Erfolg wird in erster Linie durch die Ausbildung von Restenosen limitiert. Da neben der Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen auch der Umbau extrazellulärer Matrix entscheidende Ereignisse sowohl der Atherogenese als auch der Restenose darstellen, besteht großes Interesse, diese Prozesse medikamentös zu hemmen. Seitdem die technischen Voraussetzungen für ein kontrolliertes Freisetzen definierter Mengen einer wirksamen Substanz von einem Stent gegeben sind, erfährt die Entwicklung medikamentenbeschichteter Stents größte Aufmerksamkeit in Forschung und Klinik. Es ist eine Vielzahl unterschiedlicher immunsuppressiver und bzw. antiproliferativer Wirkstoffe in klinischer Erprobung, darunter Paclitaxel, Actinomycin D, Sirolimus, Tacrolimus, Everolimus und Dexamethason. Daneben liegt ein weiterer Schwerpunkt der Entwicklung

auf der Erforschung unterschiedlicher Techniken zur Beladung eines Koronarstents sowie der Bestimmung optimaler Freisetzungskinetiken. Wenn sich die in klinischen Studien beobachteten „einstelligen“ Restenoseraten im klinischen Alltag ohne Zunahme von Komplikationen, speziell von Stentthrombosen bei Einsatz mehrerer und/oder längerer Stents, bestätigen, darf erwartet werden, daß durch vermehrten Einsatz medikamentenbeschichteter Stents in Zukunft weniger Patienten einer operativen Revaskularisation zugeführt werden.<sup>77</sup> Der bisherige Einsatz medikamentenbeschichteter Stents (DES drug eluting stents) ergab eine signifikante Reduktion der Restenoseentwicklung. Die erste verfügbare Substanz war Sirolimus (Rapamycin). Die ersten Langzeitergebnisse konnten in der FIM (First in Man)-Studie dokumentiert werden.<sup>98</sup> In weiteren Studien (RAVEL, SIRIUS, der europäischen E-SIRIUS und der kanadischen C-SIRIUS) konnte im randomisierten Vergleich eine hochsignifikante Reduktion der Restenose- und Reinterventionsrate von 20-30% auf 5-10% nachgewiesen werden.<sup>95</sup> Eine zweite wichtige Substanz zur Verhinderung der Restenoseentwicklung ist Paclitaxel, welches ebenfalls in den verschiedenen TAXUS-Studien zu einer hochsignifikanten Reduktion der Restenoserate führte.

Ein weiterer bisher nur in Tiermodellen getesteter Ansatz besteht in der Hemmung der Matrix Metalloproteinasen entweder durch Einsatz pharmakologischer Metalloprotease-Antagonisten<sup>8,115</sup> oder durch Gentransfer der physiologischen Metalloproteinasen-Inhibitoren (TIMP).<sup>39</sup> In diesen Studien konnte eine Hemmung der Zellmigration erreicht werden, die jedoch nicht zu einer anhaltenden Verminderung der Neointima führte.

### 1.3 Extrazelluläre Matrix (EZM)

Jede Arterienwand enthält extrazelluläre Matrix, auch vaskuläre extrazelluläre Matrix (EZM) genannt. Diese besteht aus einem 3-dimensionalen Netzwerk, in dem Proteoglykane, Glykoproteine und Kollagenfibrillen eine hochorganisierte Struktur bilden. Die mechanische Belastbarkeit und elastischen Eigenschaften der normalen arteriellen Gefäßwand wird im wesentlichen bestimmt durch die Interaktionen dieser Moleküle.<sup>112</sup> Quantitative Änderungen der Komponenten, Interaktionen untereinander mit den Zelloberflächen und Interaktionen mit Zytokinen spielen in verschiedenen Stadien der Atherosklerose und der Restenose eine große Rolle. Die für die Plaquebildung entscheidende Substanzzunahme resultiert aus der metabolischen Bilanz, d.h. aus dem

Wechselspiel von Synthese- und Abbauprozessen. Letztere werden u.a. von Matrix Metalloproteinasen und deren Inhibitoren TIMPs katalysiert. Besonders Makrophagen, jedoch auch glatte Muskelzellen, sind in der Lage, eine Reihe von matrixdegradierenden Proteinasen zu produzieren.<sup>61</sup> Zu dieser Gruppe gehören tissue-type-Plasminogen-Aktivator (t-PA), Urokinase-Plasminogen-Aktivator (u-PA) und MMP.<sup>71,52,35</sup> Kollagen stellt mengenmäßig den Hauptanteil der vaskulären extrazellulären Matrix dar.<sup>56</sup> Durch die Aktivierung oben genannter Enzyme in arteriosklerotischen Plaques kann es zu einem Abbau der wesentlichen Bestandteile der vaskulären EZM kommen und dadurch zu Plaquestabilität, Plaqueruptur und Symptomen wie instabiler Angina pectoris bis hin zum Myokardinfarkt führen.

### 1.3.1 Proteoglykane

Proteoglykane sind Makromoleküle, die aus einem Proteinkern mit anhängenden Glykosaminglycan-Seitenketten aufgebaut sind. Sie sind in verschiedenen Gewebekompartimenten lokalisiert<sup>110</sup>: in der EZM, in Basalmembranen, an Zellmembranoberflächen und intrazellulär. Dort können Proteoglykane die Zelladhäsion, Migration und Proliferation vaskulärer Zellen modulieren<sup>109</sup> und an der Regulation von Gefäßpermeabilität, Thrombose, Hämostase und Lipidmetabolismus mitwirken.<sup>55,16,111</sup> Biglycan kann mit dem Kernprotein transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) binden und TGF- $\beta$ 1 kann dadurch die Expression von Biglykan in glatten Muskelzellen stimulieren. In normalen Arterien findet sich Biglycan in der Intima, der Media und in der Adventitia. Für die Pathogenese der Atherosklerose ist bedeutsam, dass Proteoglykane wie Biglycan Lipoproteine in der vaskulären EZM binden können und dadurch mit dem Fortschreiten der Arteriosklerose und Restenose assoziiert sind.<sup>82</sup>

### 1.3.2 Glykoproteine

Glykoproteine besitzen eine modulare Struktur und spezifische Bindungsstellen, die es ihnen erlauben, Kontakte untereinander, mit anderen EZM-Makromolekülen und mit Integrinrezeptoren an Zelloberflächen einzugehen.<sup>63</sup> Die wichtigsten Glykoproteine sind Fibronectin, Thrombospondin, Tenascin, Osteopontin und Laminin.

Fibronectine sind eine Klasse von Glykoproteinen, die sowohl im Blutplasma wie auch in der normalen vaskulären EZM zu finden sind.<sup>67</sup> Viele Zelltypen, einschließlich glatter Muskelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen, können Fibronectin synthetisieren. Fibronectin ist ein aus zwei ähnlichen Peptidketten bestehendes Dimer mit

einem Molekulargewicht von 220 kD. Es ist Teil eines Fibrinthrombus und fördert seine Organisation. Proliferierende und migrierende glatte Muskelzellen können selbst Fibronectin bilden. Mehrere Studien haben eine vermehrte Expression nach experimentellen Gefäßverletzungen<sup>49,88,19,6</sup> und in humanen restenotischen Koronararterien<sup>21</sup> nachweisen können.

Die Thrombospondine (TSP) sind eine Familie von fünf strukturell verwandten Glykoproteinen.<sup>12,59</sup> TSP-1, ein trimeres 450-kD-Glykoprotein, kann von Thrombozyten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Makrophagen produziert werden.<sup>58</sup> Funktionell ist gezeigt worden, daß TSP-1 die Zelladhäsion, Proliferation und Migration von Zellen fördert<sup>86,46</sup>, die Angiogenese moduliert<sup>104,96</sup> und Plasminogen wie auch TGF- $\beta$ 1 aktiviert.<sup>23</sup> In ballondenudierten Rattenkarotiden wird die TSP-1 mRNA-Expression innerhalb von Stunden hochreguliert.<sup>70</sup> Im gleichen Tiermodell konnte durch eine Gabe von TSP-1 Antikörpern die Neointima-Bildung signifikant vermindert werden.<sup>108</sup> TSP-1 ist bereits in einer früheren Studie in arteriosklerotischen humanen Arterien immunhistologisch nachgewiesen worden.<sup>47</sup>

### 1.3.3 Kollagene

Es sind mindestens 19 genetisch differenzierte Typen<sup>64</sup> bekannt, sechs dieser Typen (I, III, IV, V, VI und VIII) sind die Hauptformen im normalen vaskulären Gewebe, wobei Kollagen Typ I mit ca.70% und Kollagen Typ III mit ca. 20% den größten Anteil bilden.<sup>65</sup> Kollagen Typ I und III sind prolin- und glyzinreiche Proteine, die bereits intrazellulär eine Tripelhelix bilden. Nachdem diese Moleküle als Prokollagen aus der Zelle ausgeschleust werden, werden enzymatisch die C- und N-terminalen Enden entfernt und die Moleküle vernetzen sich zu Kollagenfibrillen. Diese Fibrillen können wiederum zu Kollagenfasern aggregieren. Kollagenfasern dieser Art sind extrem reißfeste, aber wenig elastische Moleküle, die für die Steifheit der Gefäßwand mitverantwortlich sind.<sup>60</sup> Verschiedene immunhistochemische und biochemische Studien haben eine Zunahme des Kollagengehaltes in arteriosklerotischen Gefäßen darstellen können. Kollagene repräsentieren sogar insgesamt den Hauptbestandteil des fibrotischen arteriosklerotischen Plaque-Materials. Auch hier dominieren die interstitiellen Kollagentypen I und III.<sup>66,51,74,78</sup>

## 1.4 Matrix Metalloproteinasen

MMP	Herkömmlicher Name	Substrate
MMP-1	Interstitielle Kollagenase	Kollagene I, II, III, VII, VIII, X, Gelatine, Aggrecan, Myelinbase-Protein, proTNF, MMP-2, MMP-9
MMP-2	Gelatinase A	Kollagene I, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatine, Elastin, Fibronektin, Aggrecan, Myelinbaseprotein, B Amyloid, proTNF, MMP-9, MMP-2
MMP-3	Stromelysin 1	Kollagene I, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatine, Perlecan, Fibronektin, Laminin, Elastin, Myelinbase-Protein, proTNF, MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13
MMP-7	Matrilysin	Kollagene IV, X, Gelatine, Aggrecan, Fibronektin, Laminin, Elastin, Myelinbase-Protein, pro-TNF, MMP-1, MMP-2, MMP-9
MMP-8	Neutrophile Kollagenase	Kollagene I, II, III, V, VII, VIII, X, Gelatine, Aggrecan, Fibronektin
MMP-9	Gelatinase B	Kollagene IV, V, VII, X, XIV, Gelatine, Elastin, Aggrecan, Versican, Proteoglykan-Link-Protein, Fibronektin, Nidogen, Myelinbase-Protein, pro TNF, $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor
MMP-10	Stromelysin 2	Kollagene III, IV, V, Gelatine, Aggrecan, Elastin, Fibronektin, MMP-1, MMP-8
MMP-11	Stromelysin 3	$\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor
MMP-12	Metalloelastase	Kollagen IV, Gelatine, Elastin, Fibronektin, Laminin, proTNF, Myelinbase-Protein
MMP-13	Kollagenase 3	Kollagene I, II, III, IV, Gelatine, Aggrecan
MMP-14	MT1-MMP	Kollagen I, II, III, Gelatine, Elastin, Fibronektin, Aggrecan, MMP-2, MMP-13, proTNF
MMP-15	MT2-MMP	MMP-2, Gelatine, Fibronektin, Laminin
MMP-16	MT3-MMP	MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	Fibrinogen, Fibrin, proTNF
MMP-18	Kollagenase 4 (Xenopus, kein humanes Homologes bekannt)	
MMP-19	RASI-1	Aggrecan, cartilage oligometric matrix protein (COMP)
MMP-20	Enamelysin	Aggrecan, cartilage oligometric matrix protein (COMP)
MMP-21	Humanes Homologes der Xenopus XMMP	
MMP-22	CMMP (Hünchen, kein humanes Homologes bekannt)	
MMP 23	CA-MMP	
MMP-24	MT5-MMP	ProMMP-2
MMP-25	MT6-MMP	
MMP-26	Endometase	
MMP-27		
MMP-28	Epilysin	

Abbildung 2: Familie der Metalloproteinasen

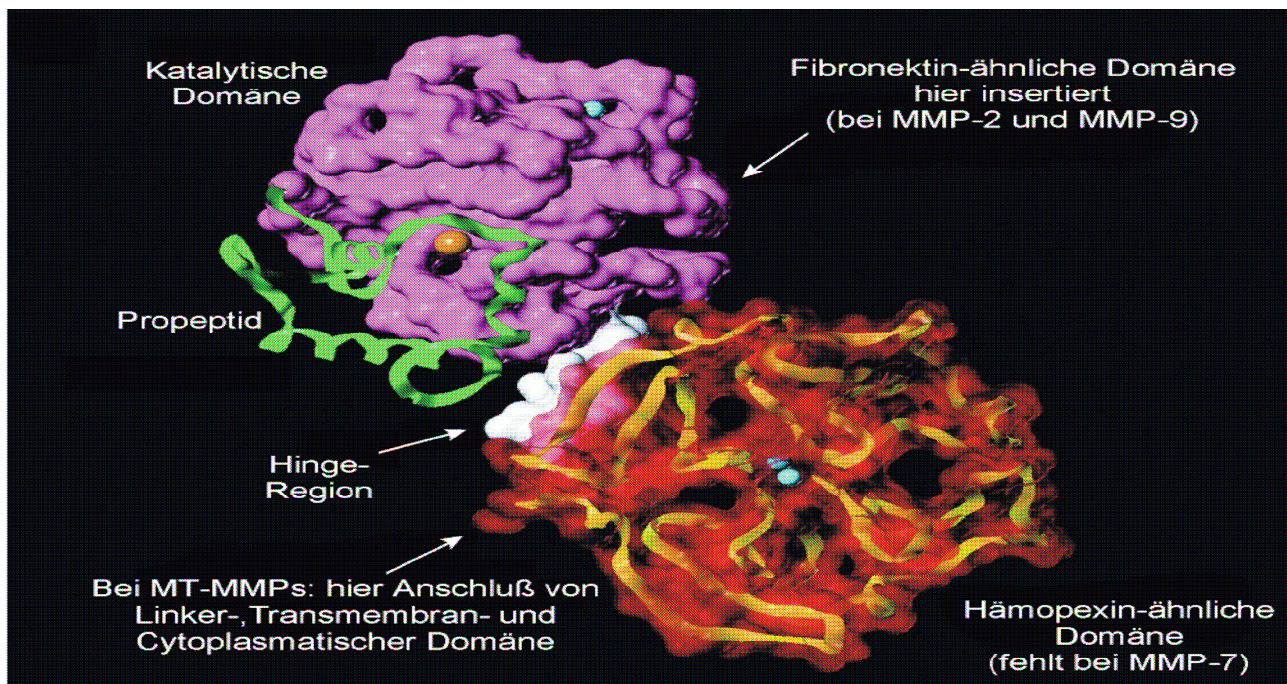
Seit *Gross und Lapiere 1962* beobachteten, daß diffusionsfähige Enzyme aus Kaulquappenschwänzen Gele aus nativem tripelhelikalem Kollagen zerstören konnten, wurden verschiedene Mitglieder einer Enzymfamilie entdeckt, die aufgrund ihrer Fähigkeit zum Abbau extrazellulärer Proteine und zur Unterscheidung von anderen verwandten Metalloproteasen, Matrix Metalloproteinasen genannt wurden (*Stöcker et al. 1995*). Die Matrix Metalloproteinasen (MMP) bilden eine Enzymfamilie von strukturverwandten, zinkabhängigen Endopeptidasen, die in Kombination fast alle Proteine der EZM degradieren können. Somit kommt ihnen eine entscheidende Rolle in physiologischen und pathologischen Prozessen zu. Da MMP nach Aktivierung alle extrazellulären Matrixkomponenten komplett abbauen können, ist es wichtig, dass die Aktivität dieser Enzyme streng reguliert wird. Dies geschieht auf mehreren Ebenen <sup>25</sup>.

1. durch Regulation der Transkription: IL-1, PDGF und TNF $\alpha$  induzieren oder stimulieren die Synthese von MMP, während TGF $\beta$ , Heparin und Kortikosteroide einen inhibitorischen Effekt ausüben. Studien über Kollagenase- und Stromelysingenpromotoren haben eine Anzahl von gemeinsamen Sequenzen für nukleäre Bindungsproteine, einschließlich 12-O—tetradecanoyl-phorbol-13-acetate reagierende Elemente und Protein-1 Aktivatoren ergeben.<sup>10</sup>
2. durch Proenzymaktivierung: Plasmin ist ein potenter Aktivator, er fördert die Spaltung der latenten Propeptide in aktive Moleküle.<sup>99,79</sup> Es wird angenommen, dass die Bindung und Aktivierung von uPA an seinen spezifischen Rezeptor uPA-r die proteolytische Aktivität der Zelle steuern kann. UPA und uPA-r werden von vielen Zellen exprimiert; es konnte gezeigt werden, daß Antikörper und Inhibitoren von uPA eine Matrixverminderung verhindern können.<sup>28</sup> Die membran-type Metalloproteinase (MT-MMP) ist ein integriertes Membranprotein und Aktivator der Progelatinase A.<sup>91</sup>
3. durch Inhibition der proteolytischen Aktivität
4. durch MMP-Inhibitoren: MMP werden gehemmt durch eine Familie von natürlich vorkommenden spezifischen Inhibitoren, tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP, und weniger spezifisch von  $\alpha_2$ -Makroglobulin und exogenen Substanzen wie Heparin. TIMP sind sezernierte multifunktionale Proteine, welche essentiell für die Regulation des Zellmetabolismus sind. Es sind drei Mitglieder dieser Familie identifiziert worden: TIMP-1, -2 und -3.
5. durch Zytokinaktivierung: TNF $\alpha$ , ein Wachstumsfaktor, reguliert MMP auf transkriptionaler Ebene und wird auch selbst von MMP reguliert. TNF $\alpha$  ist ein potentes



proinflammatorisches und immunregulatorisches Zytokin. Es wird als Präkursor synthetisiert und in die aktive Form gespalten. Es konnte gezeigt werden, dass TIMP diese posttranslationale Aktivierung verhindern können und dass durch Hinzufügen von Kollagenase, Stromelysin, Matrilysin und Gelatinase die Aktivität wieder gesteigert werden kann.<sup>68,37</sup>

Bis jetzt sind mehr als 20 verschiedene MMP identifiziert worden, diese Enzyme werden von verschiedenen menschlichen Zellen als inaktive Proenzyme produziert und im Gewebe proteolytisch aktiviert. Sie funktionieren als Endoproteinasen bei neutralem pH und bauen die meisten Proteine der EZM ab. Man unterteilt sie in 3 große Gruppen: interstitielle Kollagenasen, Typ IV Kollagenasen oder Gelatinasen und Stromelysine.



**Abbildung 3: molekulare Struktur der Metalloproteinasen**

MMP bestehen aus zahlreichen strukturellen Domänen, deren Funktionen wenig bekannt sind. Auf das aminoternale Propeptid folgt die katalytische Domäne, in der eine fibronektinartige Sequenz eingebettet ist. Der zweite Teil der katalytischen Domäne enthält die Zink-Bindungsstelle des aktiven Zentrums. Auf die katalytische Domäne folgt die C-terminale hämopexinartige Domäne. Die fibronektinartige Domäne ist für die Bindung des Kollagens erforderlich, während die hämopexinartige Domäne die Komplexbildung des Proenzym mit TIMP vermittelt. Wegen ihrer spezifischen Fähigkeit, Typ IV Kollagen als

Hauptbestandteil der Basalmembran zu  $\frac{1}{4}$  N-terminalen und  $\frac{3}{4}$  C-terminalen Fragmenten abzubauen, wird vermutet, dass die Gelatinasen eine Rolle im Turnover der Basalmembran und der EZM spielen. Ein kontrollierter Abbau der Basalmembran oder der EZM sind Schlüsselschritte bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen.

Die Gelatinasen A und B (MMP-2 und MMP-9) tragen im Gegensatz zu anderen MMP innerhalb ihrer katalytischen Domäne die dreifache Wiederholung einer 58 Aminosäure großen Fibronectin Typ II ähnlichen Sequenz. Dieser direkt vor dem Zinkbindungsmotiv positionierte Sequenzabschnitt ist für die Substratspezifität der Gelatinasen verantwortlich. MMP-2 oder Gelatinase A (72 kD), kann viele Komponenten der extrazellulären Matrix wie Elastin, Fibronectin, Kollagene Typ IV, VII und X in helikalen Domänen sowie Gelatine und, im Gegensatz zu MMP-9 oder Gelatinase B (92 kD), intakte Kollagenfibrillen Typ I abbauen.<sup>1</sup> Somit sind sie ein wichtiger Faktor in der Arteriosklerose- und Restenoseentstehung. *Bendeck et al.*<sup>9,114</sup> zeigte eine Produktion von Gelatinase A in der A. carotis bei Ratten und eine Induktion von Gelatinase B nach PTCA während der Periode der Migration von glatten Muskelzellen von der Media in die Intima. *Webb et al.*<sup>105</sup> wiesen bei nicht gefäßverletzten Ratten MMP-2 und nach Gefäßverletzung einen Anstieg von MMP-9 nach.

#### 1.4.1 MMP-2 oder Gelatinase A

Die vermeintliche Entdeckung der Gelatinase A (MMP-2; EC 3.4.24.24) gelang 1972 *Harris und Krane*<sup>43</sup>, als sie eine Gelatinaseaktivität in rheumatoidem Synovialgewebe beobachteten. Allerdings erkannten sie nicht, daß es sich hierbei um ein noch unbekanntes Enzym handelte. 1978 konnten *Sellers et al.*<sup>94</sup> eine Gelatinaseaktivität im Kulturmedium von Kaninchenknochen nachweisen und zeigen, daß dieses Enzym nicht mit der Kollagenase-1 oder Stromelysin-1 identisch war. Im folgenden Jahr entdeckten *Liotta et al.*<sup>62</sup> ein ähnliches Enzym, welches in einem Mäusetumor das Typ IV Kollagen der Basalmembran abbaute. 1988 veröffentlichten *Collier et al.*<sup>22</sup> dann die Sequenz der proGelatinase A. Das Gen der Gelatinase A ist auf dem Chromosom 16q13 lokalisiert und wird in verschiedenen Zellen, wie z.B. Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, Chondrozyten, Osteoblasten und Monozyten exprimiert. Das latente Protein hat ein Molekulargewicht von 72 kD und besteht aus 631 Aminosäuren. Nach der Veröffentlichung der Strukturen von Hämapexin-ähnlicher und katalytischer Domäne, gelang es 1999 *Morgunova et al.*<sup>73</sup>, die gesamte Struktur der proGelatinase A aufzuklären. MMP-2 wird

gewöhnlich konsekutiv exprimiert, wird also nur gering durch Wachstumsfaktoren etc. beeinflusst.<sup>10</sup>

#### 1.4.2 MMP-9 oder Gelatinase B

1974 entdeckten *Soparta und Dancewicz*<sup>97</sup> eine Gelatinaseaktivität in polymorphkernigen Leukozyten. Ein ähnliches Enzym, das Typ V Kollagen spalten konnte, wurde später in Kaninchen-Makrophagen gefunden. 1983 konnten *Rantala-Ryhänen et al.*<sup>87</sup> erstmals die Gelatinase B (MMP-9, EC 3.4.24.35) aus polymorphkernigen Leukozyten isolieren und charakterisieren. Sechs Jahre später gelang *Wilhelm et al.*<sup>113</sup> die Aufklärung der cDNA-Sequenz. Das Gen der Gelatinase B ist auf dem Chromosom 20q12-q13 lokalisiert und wird u.a. in Makrophagen, polymorphkernigen Leukozyten, Keratinozyten, Trophoblasten und Osteoclasten exprimiert. Im Gegensatz zur Gelatinase A wird sie aber nicht konstitutiv synthetisiert, sondern wird Zelltyp-abhängig durch unterschiedliche Stimuli induziert. So wird z.B. die Gelatinase B für eine schnelle Immunantwort in den Granula der Neutrophilen gespeichert, während z.B. Monozyten die MMP-9 de novo synthetisieren. Die latente Form besteht aus 688 Aminosäuren und hat eine Molmasse von 92 kD. *Rowell et al.*<sup>90</sup> konnten 2002 die Struktur eines Komplexes der katalytischen Domäne der MMP-9 mit einem peptidischen reversen Hydroxamat-inhibitor aufklären. Diese Struktur zeigt eine sehr große Homologie zu den anderen bereits bekannten Strukturen der katalytischen Domänen der Matrix Metalloproteinasen.

#### 1.5 Retinoide

Die Wirkung von Vitamin A zur Behebung der Nachtblindheit ist schon sehr lange bekannt. Bereits in China vor 1500 Jahren und im ägyptischen Papyrus Eber wurde auf die Bedeutung von Leber zur Behandlung der Nachtblindheit hingewiesen. 1913 konnte Vit. A identifiziert werden und in den darauffolgenden Jahrzehnten wurde der genaue Mechanismus des Vit. A beim Sehvorgang aufgeklärt. Eine ganz neue Ära der Vit. A-Forschung begann Anfang der 80er Jahre mit der Entdeckung, dass Vit. A eine zentrale Rolle bei Vorgängen von Zellwachstum und Differenzierung spielt und damit Einfluss auf eine Vielzahl von Erkrankungen hat. Seit der Erkenntnis, dass es unter einer systemischen Therapie mit all-trans retinoic acid (atRA) zu einer Vollremission der Promyelozytenleukämie kommen kann, ohne die beträchtlichen Nebenwirkungen einer

systemischen Chemotherapie in Kauf nehmen zu müssen, nimmt das Interesse an Retinsäurederivaten in der Therapie von verschiedenen Erkrankungen zu.

Retinoide modulieren das Wachstum und die Differenzierung von normalen, prä-malignen und malignen epithelialen und mesenchymalen Zellen. Ihre physiologische Wirkung umfasst die Regulierung von morphogenetischen Entwicklungsprozessen, die Verhinderung der Keratinisierung in nicht-verhornendem Epithel, die Kontrolle der Differenzierung mesenchymaler Gewebe und die Regulation der Immunantwort. Retinoide üben pleiotrope Effekte aus und wirken bereits in sehr geringen Dosen. Alle bisher bekannten Retinoide, einschließlich Vitamin A, sind teratogen. Retinoide sind natürlich vorkommende oder synthetisch gewonnene Derivate des Diterpenalkohols Vitamin A (Retinol), die biologisch ebenfalls Vitamin A-Aktivität entfalten. Diese lipophilen Substanzen wirken, wie ihre Muttersubstanz, eher hormonartig. Die drei wichtigsten Derivate sind:

1. 13-cis-Retinsäure (Isotretinoin), das in der Therapie des Zervixkarzinoms in Kombination mit Interferon  $\alpha$  und zur Aknetherapie verwendet wird.
2. All-trans-Retinsäure (Tretinoin), das in der Therapie der akuten Promyelozytenleukämie verwendet wird.
3. rein synthetische Retinoide (Etretinat, Acitretin), die zur Therapie der Psoriasis verwendet werden.

Die physiologische und therapeutische Wirkung der Retinoide wird über die zytoplasmatischen Bindungsproteine (CRBPI/II, CRABPI/II) und die kernständigen Retinsäurerezeptoren (RAR/RXR) vermittelt. Die Retinoide gelangen dabei durch die Zellmembran in das Zytoplasma, werden dort von CRABP gebunden und in den Zellkern transportiert, um an die verschiedenen Retinsäurerezeptoren zu binden. Hierdurch wird der Rezeptor aktiviert, der durch Bindung an die Retinsäure-reponsiven Elemente (RARE) die Transkription von Genen positiv oder negativ reguliert <sup>11</sup>.

CRBP I/II sind zytoplasmatische retinolbindende Proteine und CRABP I/II sind zytoplasmatische retinsäurebindende Proteine.<sup>83</sup> Sie sind verantwortlich für die Konzentration, den Metabolismus und den Transport von Retinol und Retinsäure vom Zytoplasma in den Kern.<sup>18</sup> Die sechs bislang identifizierten Retinoidrezeptorgene kodieren zwei Klassen nukleärer Rezeptorproteine, die Retinsäurerezeptoren RAR  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  und die retinoid-X-Rezeptoren RXR  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Strukturell zeichnen sich die Rezeptoren durch

fünf verschiedene Domänen A-F aus. Die A/B-Domäne kann Transaktivierungsfaktoren binden, die eine Bindung der C-Domäne an die RARE der Desoxyribonucleinsäure (DNA) erleichtern oder erst ermöglichen.<sup>26</sup> Die C-Domäne ist für die Bindung der Rezeptoren an bestimmte DNA-Sequenzen des Kerns verantwortlich. Der D-Domäne kommt hinsichtlich der Rezeptorwirkung keine große Bedeutung zu. Die E/F-Domäne ist die Dimerisationsdomäne für die einzelnen Liganden, wie Liganden Bindungsdomäne 8 (LBD-8) und Aktivationsfaktor 2 (AF-2). Der AF-2 kann durch sogenannte „Transkriptionale intermediäre Faktoren“ eine Verbindung zu anderen transkriptionalen Proteinen, wie Aktivator-Protein-1 (AP-1), herstellen. Studien zeigten, dass atRA in der Lage ist, das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen zu hemmen.<sup>69</sup> *Chen et al.*<sup>17</sup> und *Wiegman et al.*<sup>107</sup> konnten zeigen, daß atRA bei Kaninchen die Restenoserate nach Angioplastie vermindern kann. *Frankenberger et al.*<sup>33</sup> zeigten eine selektive Down-Regulation von MMP-9 und eine gleichzeitige Up-Regulation von TIMP-1 in menschlichen bronchoalveolären Zellen durch atRA.

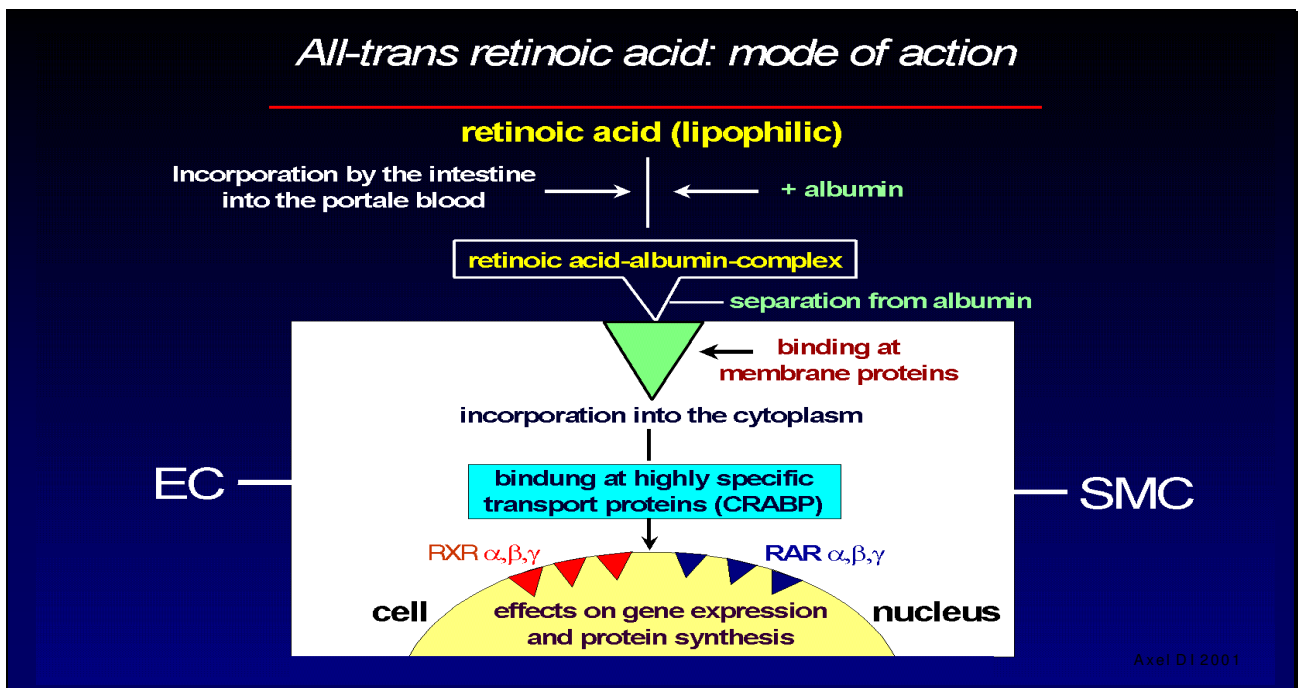


Abbildung 4: Retinsäuremechanismus (Siegel-Axel DI)

### 1.5.1 Effekte von Retinsäure auf MMP und TIMP

Die Expression von MMP-2 und MMP-9 ist oft koordinativ reguliert: beide werden von tissue-type Plasminogen Aktivator (t-PA) und Interleukin-1 induziert und von Retinsäure

(RA), Dexamethason und TGF- $\beta$ <sup>106,80</sup> gehemmt. RA hemmt laut *Hendrix et al.*<sup>44</sup> die 72 kD MMP-2. Retinoide supprimieren den steady-state Level der mRNA über einen Transkriptionsmechanismus, dem eine Antagonisierung am AP-1 nachfolgt. Diese negative Regulation ist abhängig von RAR. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass RAR- $\gamma$  selektiv die basale Gentranskription reguliert und RAR- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  die Expression von t-PA-induzierter MMP-2 hemmen.<sup>84</sup> In menschlichen Melanomzellen supprimiert RA die Expression der MMP-2 und interferiert mit der Fähigkeit der Zellen die Basalmembran zu überwinden.<sup>44</sup> Eine andere Studie zeigte, daß atRA die Expression von Kollagenase in menschlichen Intimazellen und Aorten-SMC in Kaninchen reduziert und gleichzeitig eine Inhibition der Migration auftritt.<sup>50,48</sup> Retinoide beeinflussen die Expression von TIMP umgekehrt zu MMP, indem sie den steady-state Level der mRNA der TIMP erhöhen.<sup>20</sup>

## 1.6 Zielsetzung

Für die Pathogenese der Atherosklerose und auch der Restenose nach Angioplastie spielt die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie der Abbau von extrazellulärer Matrix eine zentrale Rolle. Da all-trans-Retinsäure über eine Bindung an zytoplasmatische und nukleäre Rezeptoren und über eine Beeinflussung der Genexpression die Proliferation, Migration und Matrixproduktion humaner arterieller glatter Gefäßmuskelzellen inhibiert, stellt sich die Frage, ob es zur Behandlung der Atherosklerose- und Restenose eingesetzt werden kann.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte von all-trans-Retinsäure auf die Matrix Metalloproteinasen und die vaskuläre extrazelluläre Matrix, im Besonderen auf die Expression der matrixabbauenden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sowie die mRNA-Expression von TSP-1, TGF- $\beta$ 1, Biglycan,  $\alpha$ -glattmuskulärem-Aktin und Kollagen-1 in glatten Gefäßmuskelzellen des Menschen in in-vitro Untersuchungen zu prüfen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Testsubstanzen

#### 2.1.1 All-trans Retinsäure

All-trans Retinsäure (Sigma, Deisenhofen) wurde in 100 % igem Ethanol als Stocklösung zu 10 mM/l gelöst und sterilfiltriert. Alle Schritte wurden unter Lichtschutz vorgenommen und wurden für jede Applikation frisch hergestellt. Von dieser Stocklösung ausgehend sind mit dem Kulturmedium verschiedene Verdünnungen von 100 µM/l bis 0,01 µM/l hergestellt worden.

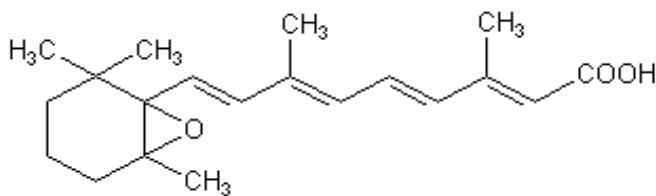


Abbildung 5: Strukturformel von atRA

### 2.2 Zellausgangsgewebe

Die Isolierung glatter Muskelzellen des Menschen erfolgte aus Gefäßreststücken, die im Rahmen von Organtransplantationen nicht weiterverwendet werden konnten, und uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H.D. Becker, Chirurgische Universitätsklinik Tübingen, zur Verfügung gestellt wurden. Die Verwendung dieser Gefäßstücke war von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt worden. Es handelte sich hier um Gefäßwandstücke der Aorta descendens, Arteria hepatis communis, Arteria iliaca communis und der Arteria renalis. HaSMC wurden durch eine Explantationstechnik aus den Gefäßen gewonnen. Die Subkultivierung erfolgte in Plastikkulturflaschen mit Waymouth Medium MB 752/1 (Gibco-BRL, Eggenstein Cat.No.: 31220-023) und Nutrient Mixture F-12 (HAM) (Gibco-BRL, Eggenstein Cat.No.: 21765-029) im Verhältnis 1:1. Hinzugefügt wurde 10 % fetales Kälberserum (PAA, Cölbe), 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin (Gibco-BRL, Eggenstein Cat.No.: 043-05070 H). Immunzytochemische



Färbungen wurden mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -glattmuskuläres Aktin (Progen, Heidelberg) zur sicheren Identifizierung der haSMC und mit 4',6-diamidine-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI) (Boehringer, Mannheim Cat.No.: 236276) zum Ausschluß von Mykoplasmen-Kontaminationen durchgeführt.

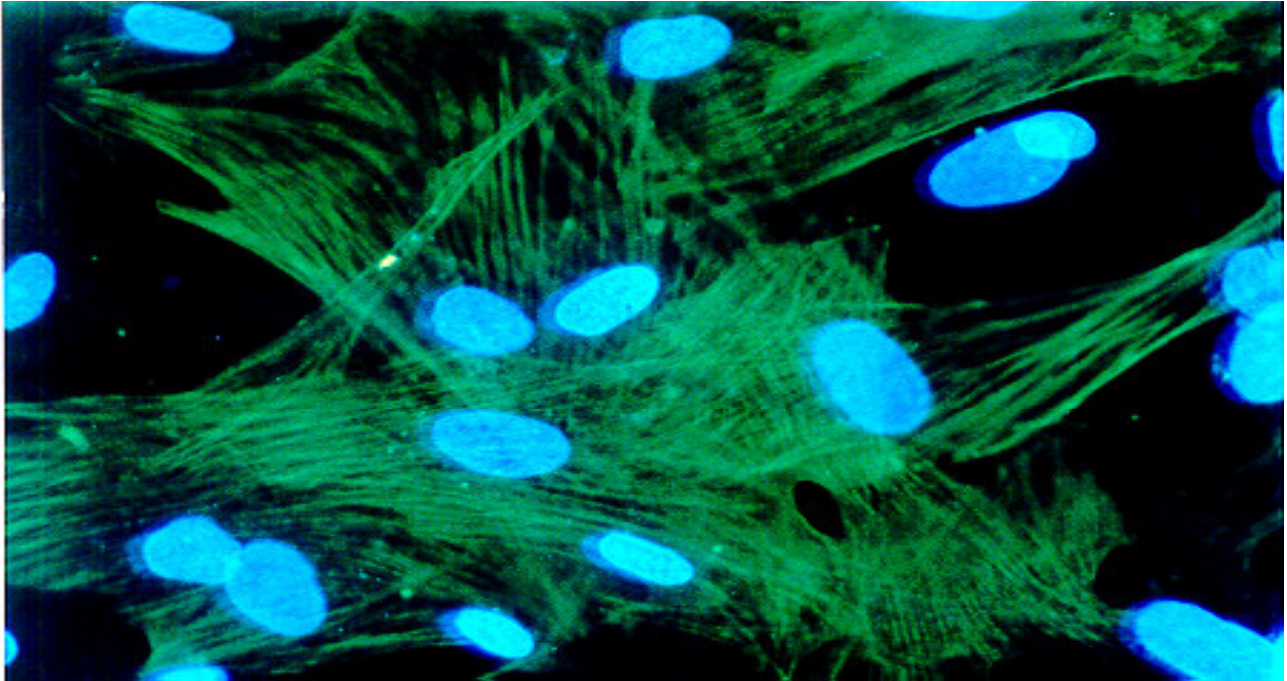


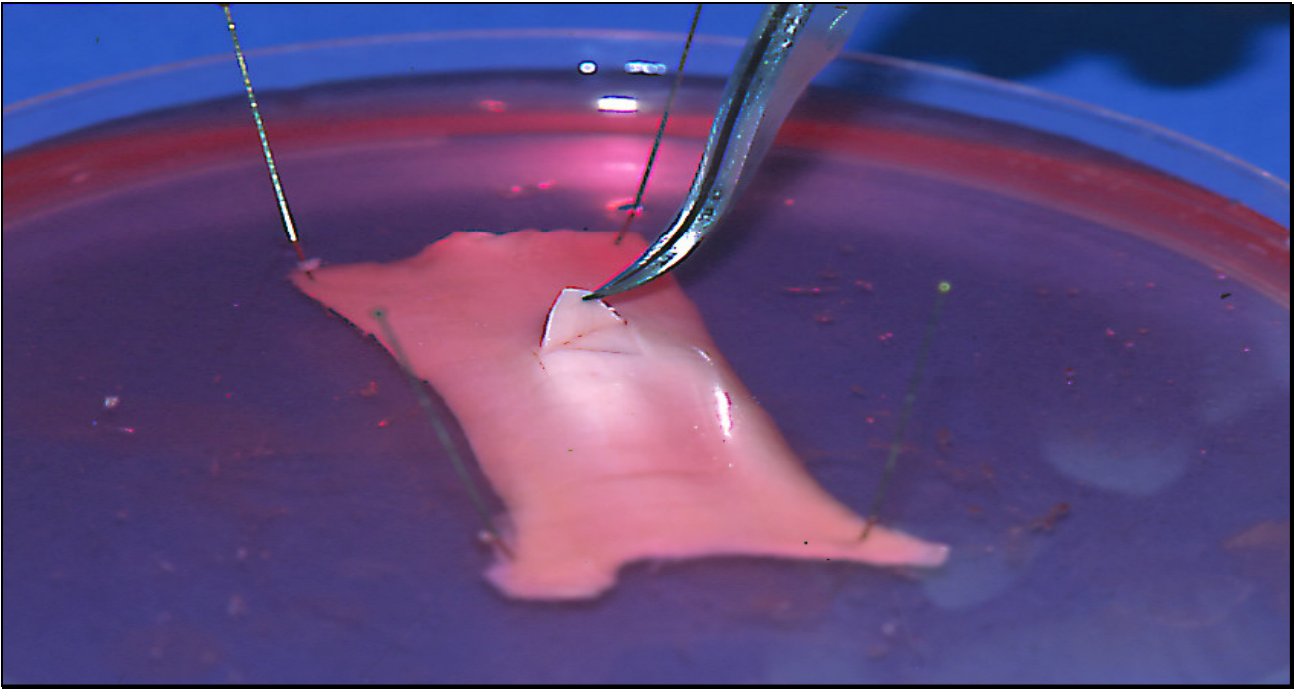
Abbildung 6: Kombinierte Färbung mit DAPI und AK gegen  $\alpha$ -glattmuskuläres Aktin

### 2.3 Gewinnung von haSMC aus Mediastücken

Die Gefäßstücke, die in HEPES-gepuffertem Transportmedium (4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure) 2-3 Tage nach Transplantation zur Verfügung standen, wurden in silikonbeschichtete und unter UV-Licht sterilisierte Präparationsschalen überführt. Nach mehrmaligem Abspülen mit dem Transportmedium wurden sie mit Präparationsnadeln aufgespannt und das perivaskuläre Fett- und Bindegewebe mit einer Präparationsschere entfernt. Das Gefäß wurde längs aufgeschnitten und mit der Lumenseite nach oben fixiert. Mit einem sterilen Skalpell wurde die Media streifenweise bis auf die Adventitia angeritzt und mit einer sterilen Pinzette die Adventitia entfernt. Die Mediastreifen wurden in möglichst kleine Stückchen mit einer sterilen Schere zerteilt, als Explantate in Kulturschälchen ausgelegt und 30 min. ohne Medium bei 37°C angetrocknet. Die fest anhafteten Transplantatstückchen wurden vorsichtig mit Medium überschichtet



und erstmals nach einer Woche, danach alle 2-3 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 1-2 Wochen bildeten sich um die Explantatstückchen extrazelluläre Matrix, in die glatte Muskelzellen nach 4-6 Wochen auswanderten. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus) bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.



**Abbildung 7: Gefäßpräparation (Siegel-Axel DI)**

## **2.4 Kultivierung**

Nach Isolierung der glatten Muskelzellen mit der Explantationstechnik wurden routinemäßig Massenkulturen angelegt. Dazu wurden die Zellen durch 2-3 minütige Inkubation mit Trypsin vom Kulturschalenboden abgelöst, in Kulturmedium aufgenommen und in Kulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden in der 4. Passage nach Gefäßisolation, wenn sie gerade subkonfluent waren, verwendet. Um für spätere Experimente gleiches Zellausgangsmaterial zur Verfügung zu haben, wurden die nicht direkt in Experimente eingesetzten Zellen in der 2. Passage in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert. Dafür mussten die Zellen ein charakteristisches Wachstumsmuster zeigen und konfluent sein. Die Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA-Behandlung vom Kulturgefäßboden abgelöst und die Zellsuspension 5 min. bei 250 g

zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, die sedimentierten Zellen in eisgekühltes Einfriermedium resuspendiert, in auf Trockeneis gelagerte Kryoröhrchen zu je 1,5 ml überführt und einen Tag bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Erst dann erfolgte die Einlagerung der Kryoröhrchen in den Flüssigstickstofftank ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), in dem die Zellen mehrere Jahre gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut werden konnten. Zum Auftauen der Zellen wurden Kulturflaschen mit 10 ml entsprechendem Kulturmedium vorbereitet und die Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstofftank auf Eis in das Labor transportiert, der Inhalt umgehend durch fraktionierte Zugabe von 10 ml vorgewärmtem Medium aufgetaut, resuspendiert und in Kulturflaschen (Costar,  $75\text{ cm}^2$  Wachstumsfläche) überführt. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um abgestorbene Zellen zu entfernen. HaSMC wurden aus menschlichen Gefäßen wie oben beschrieben gewonnen und kultiviert. Wenn sie subkonfluent waren, wurden sie 24 Std. serumfrei kultiviert.

Für den Zeitversuch  $\text{TNF}\alpha/\text{PMA}$  wurden die Hälfte der Zellkulturen mit  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  phorbol myristate acetate (PMA, Sigma, Deisenhofen), die andere Hälfte mit  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  tumor necrosis factor ( $\text{TNF}\alpha$ , R&D Systems, Wiesbaden) stimuliert. Überstände wurden nach 6, 12, 24, 48 und 72 Std. gesammelt. Für die Retinsäureversuche wurden die Zellen ebenso 24 Std. serumfrei gehalten, dann mit  $\text{atRA}$ -Konzentrationen zwischen  $100\text{ }\mu\text{M/l}$  und  $0,01\text{ }\mu\text{M/l}$  stimuliert und nach weiteren 6 Std. mit  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  PMA inkubiert. Je nach Ansatz wurden die Überstände nach 12, 24, 48 und 72 Std. gewonnen. Alle gewonnenen Überstände wurden in Centriscart-C 30 Säulen ankonzentriert, dann erfolgte eine Proteinbestimmung mittels Bradford Assay, um jeweils äquivalente Proteinmengen für Zymographien und Westernblot Analysen berechnen zu können. Für die RNA-Gewinnung erfolgte eine Zentrifugation der Zellen über 8 min. bei  $1500\text{ U/min.}$ , das Zell-Lysat wurde mit Hilfe einer QIAshredders<sup>®</sup> (Qiagen) homogenisiert und die RNA mit dem RNeasy Kit<sup>®</sup> (Qiagen) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

## 2.5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels eines Bradford Assay mit bovinem Serumalbumin BSA als Standard. Dies ist eine kolorimetrische Proteinbestimmung mit dem Prinzip, daß der blaue Säurefarbstoff Coomassie brilliant blue G-250 nach Bindung an Seitenketten der zu messenden Proteine eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von  $465\text{ nm}$  nach  $595\text{ nm}$  aufweist. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde die Extinktionsänderung bei  $595\text{ nm}$  gemessen. Um den Proteingehalt einer Probe zu bestimmen, wurde es

notwendig, mit Hilfe verschiedener bekannter Proteinmengen, hier BSA, eine Eichkurve zu erstellen. Aus dieser Eichkurve konnten die gesuchten Proteinkonzentrationen abgelesen oder berechnet werden. Andere Proteinbestimmungsmethoden, wie z.B. die Methode nach Lowry, weisen Wechselwirkungen mit Kalium- und Magnesiumionen, EDTA, Tris sowie anderen Puffern auf, die das Absorptionsverhalten dieser Farbstoffe verändern, so daß der reale Proteingehalt nicht genau bestimmt werden kann. Ein weiterer Vorteil der Bradfordmethode bestand darin, daß das Absorptionsmaximum des Proteinfarbstoffkomplexes bereits nach ca. 2 min. erreicht wurde und für etwa eine Stunde konstant blieb.

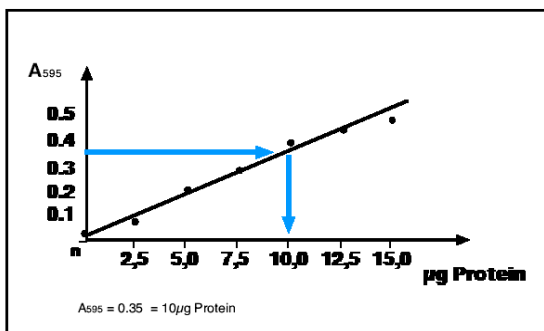


Abbildung 8: Eichkurve bovines Serumalbumin BSA

## 2.6 SDS-PAGE

Durch die Zugabe von sodium dodecyl sulfate (SDS) erfolgte die Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nicht nach ihrer Ladung, sondern nach ihrem Molekulargewicht, d.h. durch Gelfiltrationseffekte. SDS bindet dabei mit seinem hydrophoben Alkylrest in einer konstanten Rate an Proteine, so daß die intrinsische Proteinladung durch die Sulfatgruppe des SDS maskiert wird. Zusätzlich wurde die Methode der disc-Elektrophorese angewendet. Hierbei wurde mit zwei unterschiedlichen pH-Werten gearbeitet. Nach der Beschleunigung und Konzentrierung der Proteine im Sammelgel erfolgte ein „Auflaufen“ an der Grenzschicht Sammelgel-Trenngel. Dies hatte zur Folge, dass die Banden schärfer begrenzt waren und besser aufgetrennt werden konnten. Der Laufpuffer enthielt Glycin, das bei einem pH-Wert von 8,3 im Gleichgewicht mit Glycinat vorlag. Beim Einschalten des Stroms wanderten die Laufpufferionen in das Sammelgel ein, wo ein pH-Wert von 6,8 vorlag. Daraus folgte, dass Glycin quantitativ in die Zwitterform überging und solange immobilisiert wurde, bis der pH-Wert durch den

Laufpuffer wieder angehoben wurde. Durch diese Immobilisierung entstand ein Ladungsdefizit und somit ein hoher Widerstand, der durch ein starkes lokales elektrisches Feld ausgeglichen wurde. In diesem Feld wurden die durch SDS anionischen Proteine beschleunigt. Da das Sammelgel wesentlich großporiger als das Trenngel war, liefen die Proteine an der Grenzschicht auf und wurden dann im Trenngel bei einem pH-Wert von 8,8 sauber getrennt.

### 2.6.1 SDS-PAGE Zymographie

MMP konnten aufgrund ihrer Fähigkeit, Gelatine abzubauen, mittels Zymographie nach *Kleinert et al.*<sup>53</sup> detektiert werden. Bei dieser Methode wurden die Eluate zu 40 µg Protein/Lane und 20 µl Marker/Lane Protein Molekular Weight Standards (Gibco-BRL, Eggenstein) auf 7,5 %igen Polyacrylamidgelen, die zusätzlich 2 mg/ml Gelatine Typ A (Sigma, Deisenhofen) enthielten, unter denaturierenden aber nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach abgeschlossener Elektrophorese bei 100 V ca. 1 Std. wurden die Proteine durch Waschen mit 2,5 % Triton X-100 (Sigma, Deisenhofen) wieder renaturiert und über Nacht in einem  $\text{Ca}^{2+}$  - und  $\text{Zn}^{2+}$  -haltigen Enzympuffer bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wurden an den Stellen, an denen MMP anwesend waren, die Gelatine verdaut. Bei nachfolgender Färbung der Gele mit Coomassie brilliant blue (Sigma, Deisenhofen) wurden diese Zonen als weiße Banden sichtbar.

### 2.6.2 Westernblot Analyse

Bei der Westernblot Analyse nach der modifizierten Methode nach *Laemmli*<sup>57</sup> wurden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische, Proteinproben zu 15 µg/Lane und 10 µl Marker/Lane, aus der 15 %igen Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond C<sup>®</sup>, Amersham) transferiert. Dabei blieb das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Außerdem wurde bei dem Vorgang das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Die Proteine konnten renaturieren und dabei teilweise ihre Sekundär- oder Tertiärstruktur wieder einnehmen, jedoch nicht ihre Quartärstruktur. Sie konnten somit von Antikörpern erkannt werden. Nach dem elektrophoretischen Transfer von Protein auf Nitrocellulose mussten zunächst die freien Bindungsstellen der Membran blockiert werden. Da Antikörper selber Proteine sind, würden sie sich sonst an jeder freien Bindungsstelle der Membran anheften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unterbinden.

Dieses Blockieren freier Bindungsstellen (blocking) wurde mit einem nicht für die Antikörper erkennbaren Protein, hier BSA, über Nacht bewerkstelligt. Damit blieb den Antikörpern nur die Möglichkeit an das Epitop des Antigens zu binden. Um diese spezifische Bindung sichtbar zu machen, wurden die monoklonalen Sekundärantikörper gegen MMP-2 als auch gegen MMP-9 (R&D Systems) mit einem Enzym, hier horseradish peroxidase-linked anti-rabbit (R&D Systems), markiert. In Kombination mit Detektionslösung ECL Chemilumineszenzreagenz (Amersham) wurde Licht emittiert und dadurch Röntgenfilme geschwärzt.

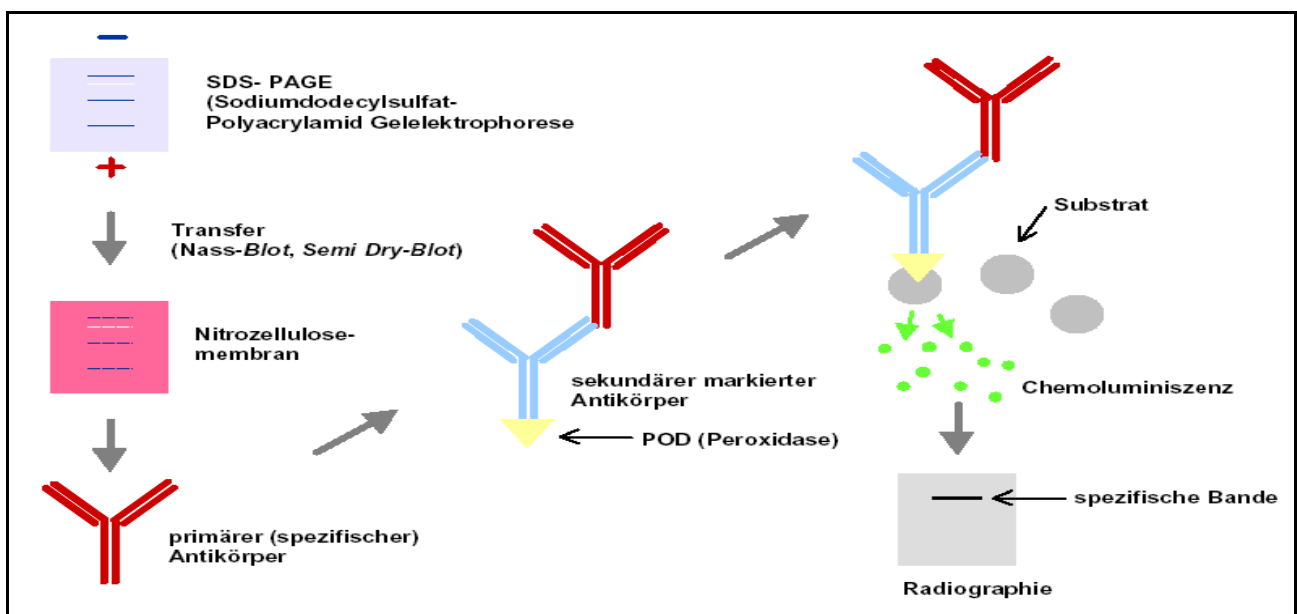


Abbildung 9: Westernblot

## 2.7 Northernblot Analyse

Nach 48 Std. Kultivierung, wenn die Zellen subkonfluent waren, wurde die Gesamt-RNA mit Rneasy-Säulen (Qiagen) isoliert und zu je 10 µg/Lane auf 0,8 % Agarose und 1 % Formaldehydgele (Ultra Pure, Electrophoresis Grade, Gibco) geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (HYBOND-N<sup>+</sup>, Amersham) erfolgte über Nacht mit einem Kapillarblot unter Verwendung einer 20x SSC-Lösung. Die Membran wurde anschließend getrocknet und UV-fixiert. In einem Hybridisationsofen (Amersham) wurde die Membran bei 65°C prähybridisiert und über Nacht mit Digoxigenin-markierten komplementären Desoxyribonucleinsäure (cDNA)-Sonden hybridisiert. Folgende cDNA-Sonden wurden verwendet: humanes Prokollagen

Typ I (Klon Hf 677, ATCC), humanes Biglycan (Dr. Larry Fischer, Bethesda), humanes TSP-1 (Dr. Jack Lawler, Boston), humanes Fibronectin (ATCC), humanes TGF- $\beta$ 1 (ATCC) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) (Clontech) als Kontrollgen.

Nach dem Waschen erfolgten Inkubationen zu 5 min. in Puffer-1 und 2 Std. in Puffer-2 (Blocking-Reagent-Solution 1:10 in Puffer-1) . Vor Inkubation in Puffer-3 mit Zusatz von Chemilumineszenz CSPD (1:100, Boehringer Mannheim) erfolgte eine Inkubation mit einem an alkalische Phosphatase gebundenen Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment (Boehringer Mannheim, 1:15000 in Puffer2). Zur Detektion wurde die Membran in eine durchsichtige Plastiktüte eingeschlossen, mit Hyperfilm-ECL (Amersham) in eine lichtdurchlässige Röntgenkassette gelegt und nach 30 min. entwickelt.

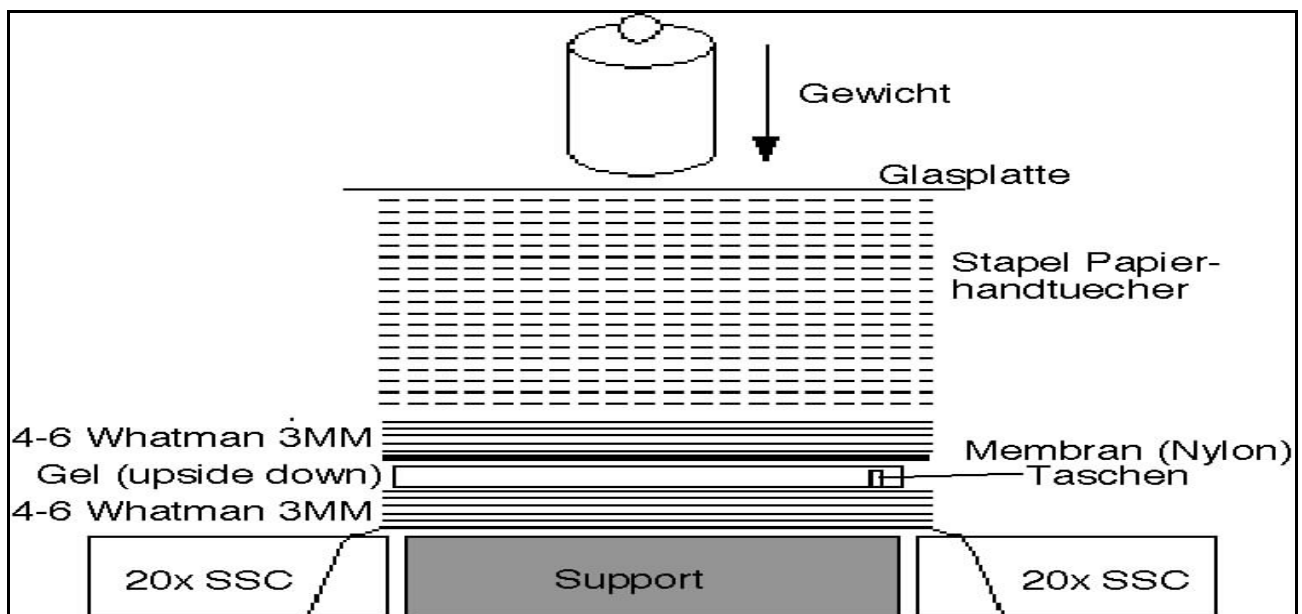


Abbildung 10: Northernblot

## 2.8 Auswertung

Sowohl die Intensität der Hybridisationbanden der Northernblots als auch der Proteinbanden der Westernblots und Zymographien wurde durch densitometrische Messung der entwickelten Röntgenfilme mittels eines optischen Scanners (Agfa) quantifiziert. Spezifische cDNA-banden wurden in Beziehung zum korrespondierenden humanen GAPDH cDNA-Signal mittels der MDS ImageMaster Software (Gibco/Kodak) gesetzt.

### 3 Ergebnisse

Die Isolierung von haSMC aus Mediatransplantaten führte nahezu immer zu Reinkulturen. Da hier keine Kontaktinhibition vorlag, zeigten sie im postkonfluenten Zustand das für sie typische „hill and valley“ Wachstumsmuster mit Bildung nodaler Strukturen,. Sie wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und über Nacht kultiviert. Für die Versuche wurden nach 24 Std. Kultivierung in FCS-freiem Medium die Zellkulturen mit 100 ng/ml PMA oder mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert. PMA als ein potenter Proteinkinase-C Aktivator mit zentraler Bedeutung bei der Signaltransduktion und Regulierung des zellulären Wachstums sowie TNF $\alpha$  als ein proinflammatorisches Zytokin mit verschiedenen Effekten wie z.B. Proliferationsstimulation, sollten die Synthese der MMP stimulieren. Die Zellkulturen für Retinsäureversuche wurden nach 24 Std. Kultivierung in FCS-freiem Medium mit atRA-Konzentrationen von 100  $\mu$ mol/l – 0,01  $\mu$ mol/l stimuliert. Nach 6 Std. wurde 100  $\mu$ g/ml PMA hinzugegeben. Nach weiteren 6 Std., 12 Std., 24 Std., 48 Std., und 72 Std. wurden jeweils die Überstände gewonnen und mittels Centrisart C 30 Röhrchen ankonzentriert. Der Proteingehalt der gewonnenen Proben wurde mittels Bradford Assay ermittelt. SDS-PAGE Zymographien wurden durchgeführt um anhand der gelatinolytischen Aktivität die Synthese von MMP-2 und MMP-9 zu identifizieren. Als zweite Methode diente der Westernblot zur Identifikation der Proteinsynthese. Die Intensität der Proteinbanden wurde mittels eines optischen Farbscanners quantifiziert. Zudem wurde eine Kontrolle mit Ethanol unter ansonsten identischen Bedingungen angelegt, da die Retinsäure später in Ethanol gelöst werden musste. Diese wurde nach der Maximalzeit von 72 Std. gewonnen.

#### 3.1 MMP-2 und MMP-9 in nicht-stimulierten haSMC

Es wurden SDS-PAGE Zymographien durchgeführt um anhand der gelatinolytischen Aktivität die Synthese von MMP-2 und MMP-9 zu identifizieren (**Dia. 1**). Als zweite Methode diente die Westernblot Analyse zur Identifikation der Proteinsynthese (**Dia. 2**). Überstände wurden nach 12, 24, 48. und 72 Std. Kultivierungszeit gewonnen. Zudem wurde eine Kontrolle mit Ethanol unter ansonsten identischen Bedingungen angelegt, da die Retinsäure später in Ethanol gelöst werden musste. Diese wurde nach der Maximalzeit von 72 Std. gewonnen. (**Dia. 1 und 2**).

Sowohl in der Zymographie als auch durch die Westernblot Analyse konnte gezeigt werden, daß unstimulierte haSMC MMP-2, jedoch nur sehr wenig MMP-9 produzieren. Der Westernblot erscheint bezüglich der Detektion der Proteinexpression von MMP-9 sensitiver als die Zymographie. Nebenbefundlich scheint Ethanol zu einer Stimulation von MMP-9 Expression zu führen.

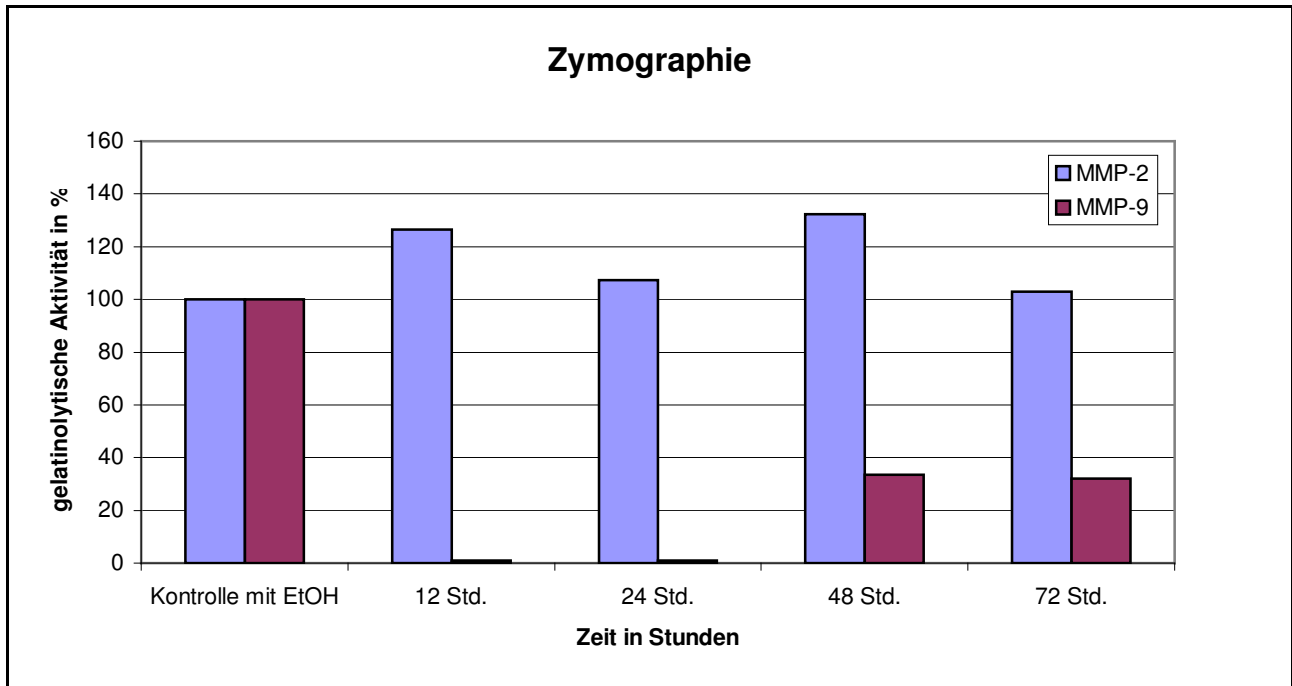


Diagramm 1: gemessene gelatinolytische Aktivität in SDS-PAGE Zymographien unstimulierter haSMC.

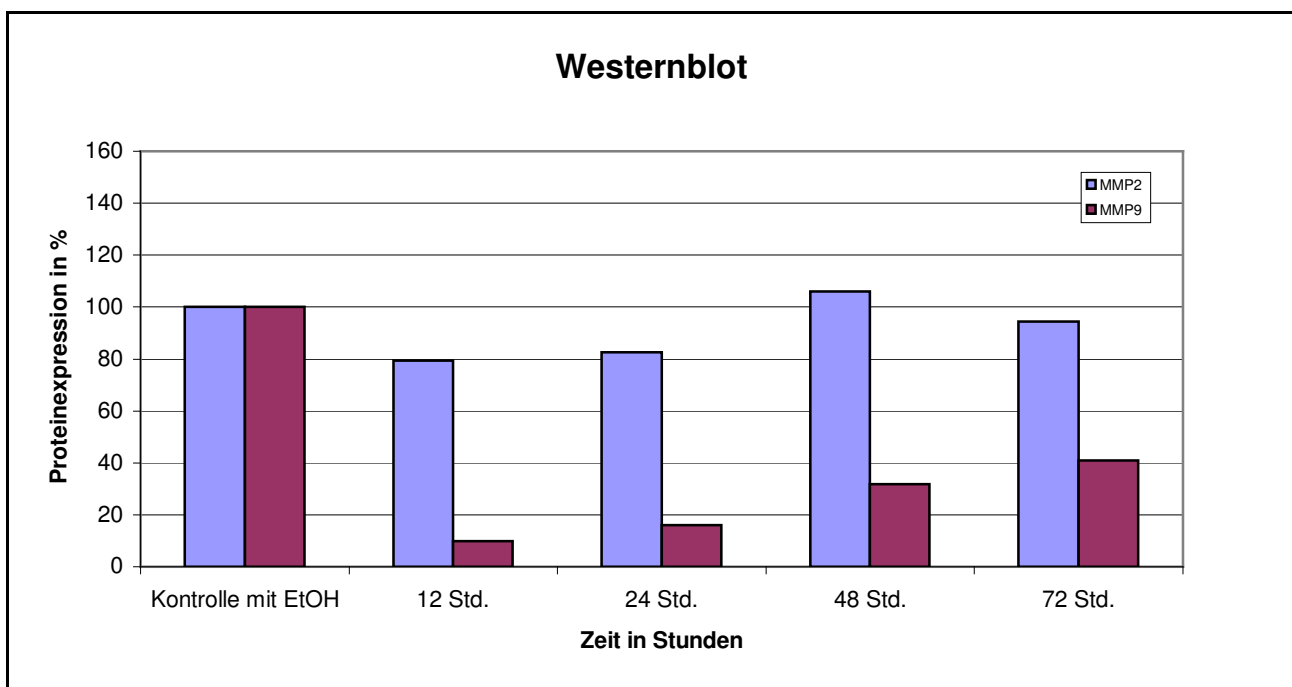
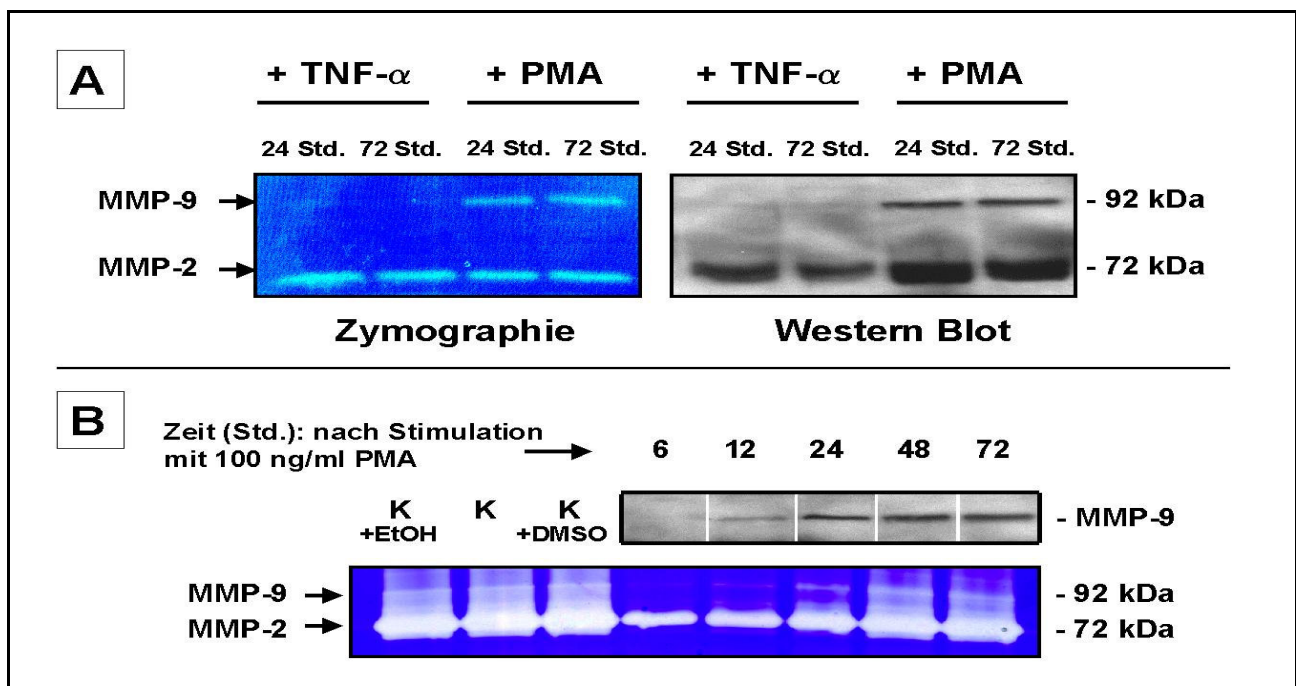


Diagramm 2: gemessene Proteinexpression in Westernblot Analysen unstimulierter haSMC.



### 3.2 Effekte von $\text{TNF}\alpha$ /PMA auf MMP-2 und MMP-9

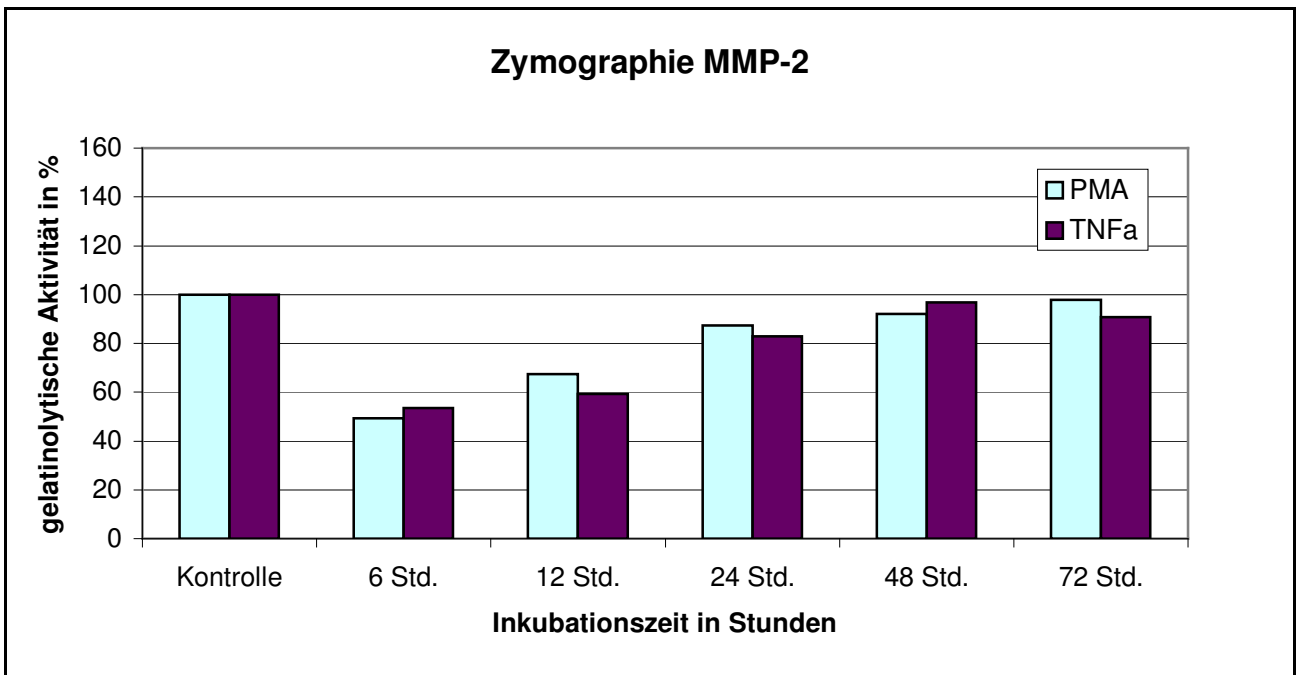
HaSMC wurden in  $75 \text{ cm}^2$  Kulturflaschen in einer Dichte von  $20.000 \text{ Zellen/cm}^2$  ausgesät und über Nacht kultiviert. Nach 24 Std. Kultivierung in FCS-freien Medium wurden die Zellkulturen mit  $100 \text{ ng/ml}$  PMA oder mit  $10 \text{ ng/ml}$   $\text{TNF}\alpha$  stimuliert. Nach 12, 24, 48 und 72 Std. wurden jeweils die Überstände gewonnen und in Centrisart C 30 Röhrchen ankonzentriert. Der Proteingehalt der gewonnenen Proben wurde mittels Bradford Assay ermittelt. SDS-PAGE Zymographien und Westernblot Analysen wurden durchgeführt, um durch die gelatinolytische Aktivität und Proteinexpression die Synthese der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 nach Stimulation mit PMA oder  $\text{TNF}\alpha$  von haSMC über 12, 24, 48 und 72 Std. in Überständen nachweisen zu können. Die Intensität der Proteinbanden wurde mittels eines optischen Farbscanners quantifiziert und in Relation zu einer Nativkontrolle ohne PMA oder  $\text{TNF}\alpha$  gesetzt. Die Intensität der Synthese von MMP-2 und MMP-9 in den Nativkontrollen wurde als 100% definiert.



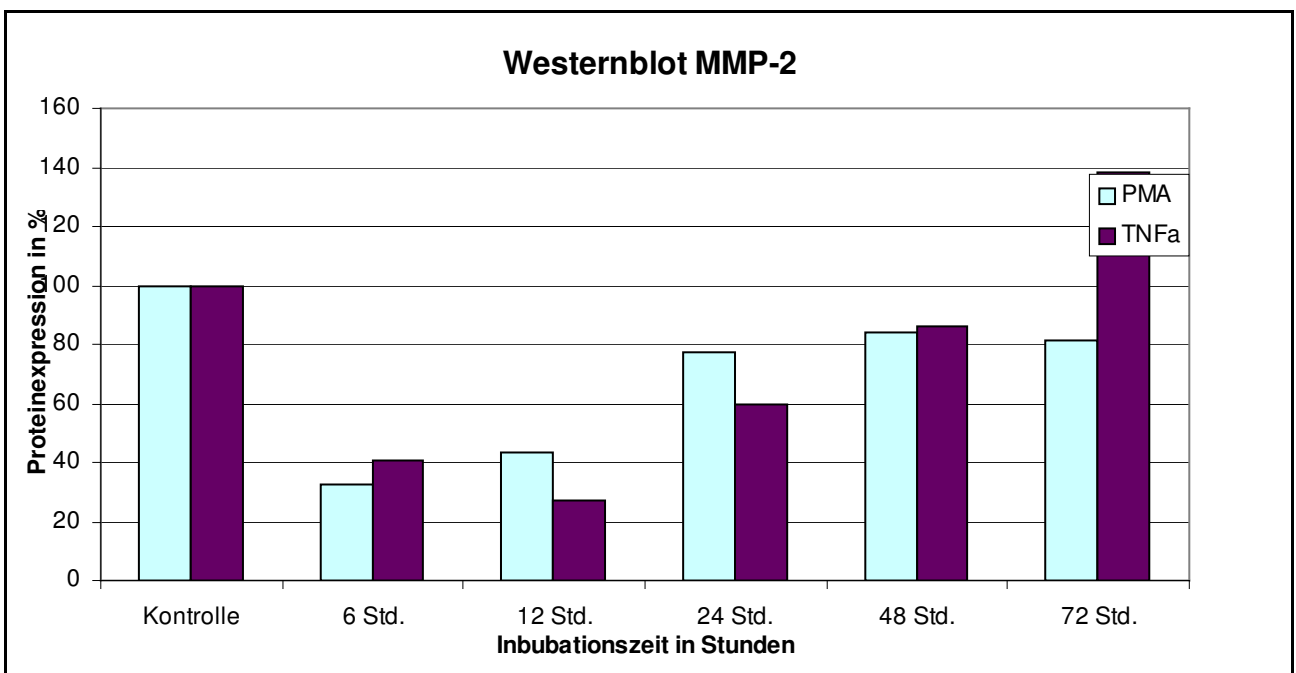
**Abbildung 11: gemessene gelatinolytische Aktivität und Proteinexpression von MMP-2 und MMP-9 in haSMC**

- A) Keine Aktivität von MMP-9 nach 24 bzw. 72 Std. Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$ , aber Aktivität von MMP-9 nach 24 bzw. 72 Std. Stimulation mit PMA, dargestellt durch Zymographie und Westernblot.
- B) Aktivität von MMP-9 nach 6 bis. 72 Std. Stimulation mit PMA dargestellt, durch Zymographie und Westernblot (verfeinerte Darstellung): Signifikante gelatolytische Aktivität und Proteinexpression erst nach 12 Std.

Nach Stimulation mit PMA konnte nur eine Proteinexpression von MMP-9 durch Westernblot Analyse nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu stimulierte  $\text{TNF}\alpha$  weder die gelatinolytische Aktivität noch die Proteinexpression von MMP-9 in haSMC (**Diagramm 5 u. 6, Abb. 11**). Eine gelatinolytische Aktivität oder Proteinexpression von MMP-2 konnte weder durch eine Inkubation mit  $\text{TNF}\alpha$  noch durch eine Inkubation mit PMA induziert werden (**Diagramm 3 u. 4, Abb. 11**).



**Diagramm 3: gemessene gelatinolytische Aktivität von MMP-2 nach Stimulation mit PMA oder  $\text{TNF}\alpha$**



**Diagramm 4: gemessene Proteinexpression von MMP-2 nach Stimulation mit PMA oder  $\text{TNF}\alpha$**

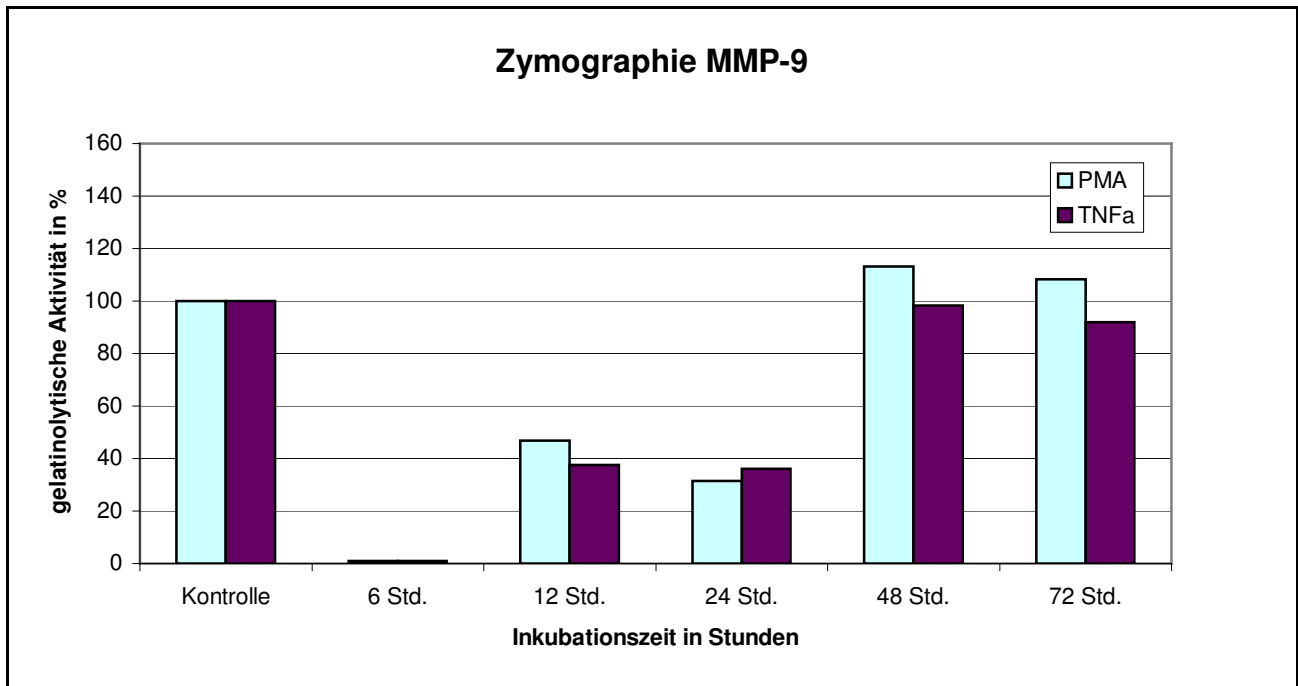


Diagramm 5: gelatinolytische Aktivität von MMP-9 nach Stimulation mit PMA oder TNF $\alpha$

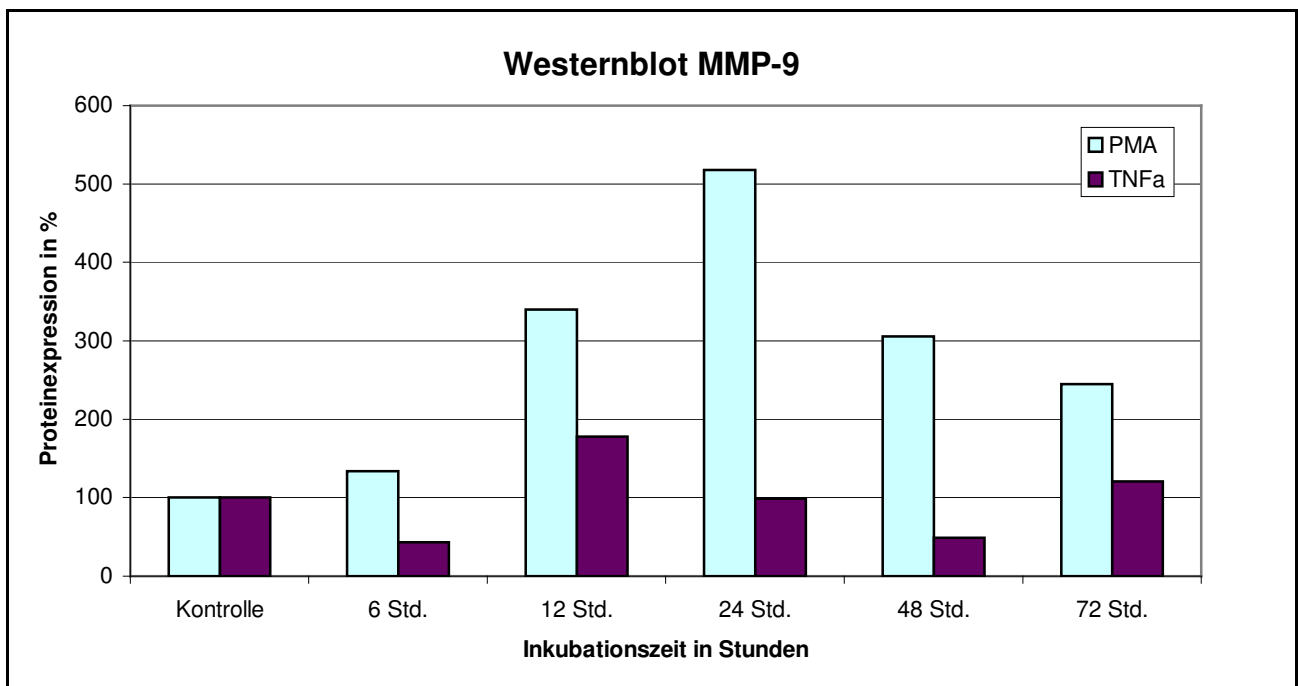


Diagramm 6: Proteinexpression von MMP-9 nach Stimulation mit PMA oder TNF $\alpha$

### 3.3 Effekte von atRA auf die MMP-2 und MMP-9 Synthese

Zellkulturüberstände und Zell-Lysate von haSMC-Kulturen wurden nach 12, 24, 48 und 72 Std. Kultivierung mit Hilfe der SDS-Page Zymographie (weiße Banden auf blauem

Hintergrund) und Western Blotting (schwarze Banden) untersucht. Unstimulierte haSMC exprimierten nur MMP-2 konstitutiv, nicht jedoch MMP-9. Die Präinkubation der haSMC mit atRA 6 Std. vor Stimulation mit PMA zeigte eine dosisabhängige Inhibition der gelatinolytischen Aktivität und auch der Proteinexpression von MMP-9 in einem Konzentrationsbereich von 0,01-100,0  $\mu\text{mol/l}$ . Diese trat erstmals 12 Std. nach Stimulation mit PMA auf und persistierte auch nach 72 Std. Westernblot Analysen zeigten auch eine partielle Hemmung der MMP-2 Synthese bei hohen atRA-Konzentrationen zwischen 10,0-100,0  $\mu\text{mol/l}$ , insbesondere nach 24, 48 und 72 Std. Dagegen zeigten Zymographien schon eine Hemmung der gelatinolytischen Aktivität bei niedrigeren atRA-Konzentrationen  $\geq 1,0 \mu\text{mol/l}$  (Diagramme 7-14).

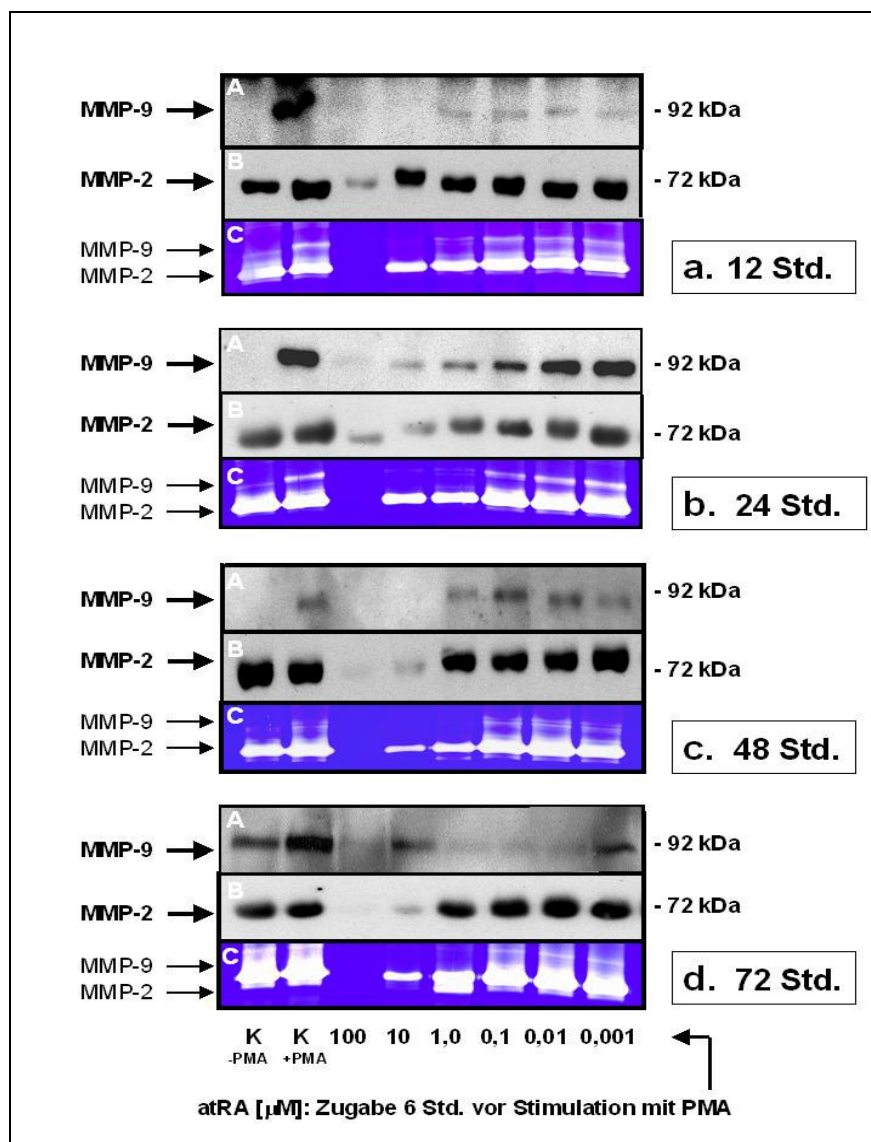


Abbildung 12: Gelatinolytische Aktivität und Proteinexpression von MMP-2 und MMP-9.

### 3.3.1 Retinsäurestimulation über 12 Stunden

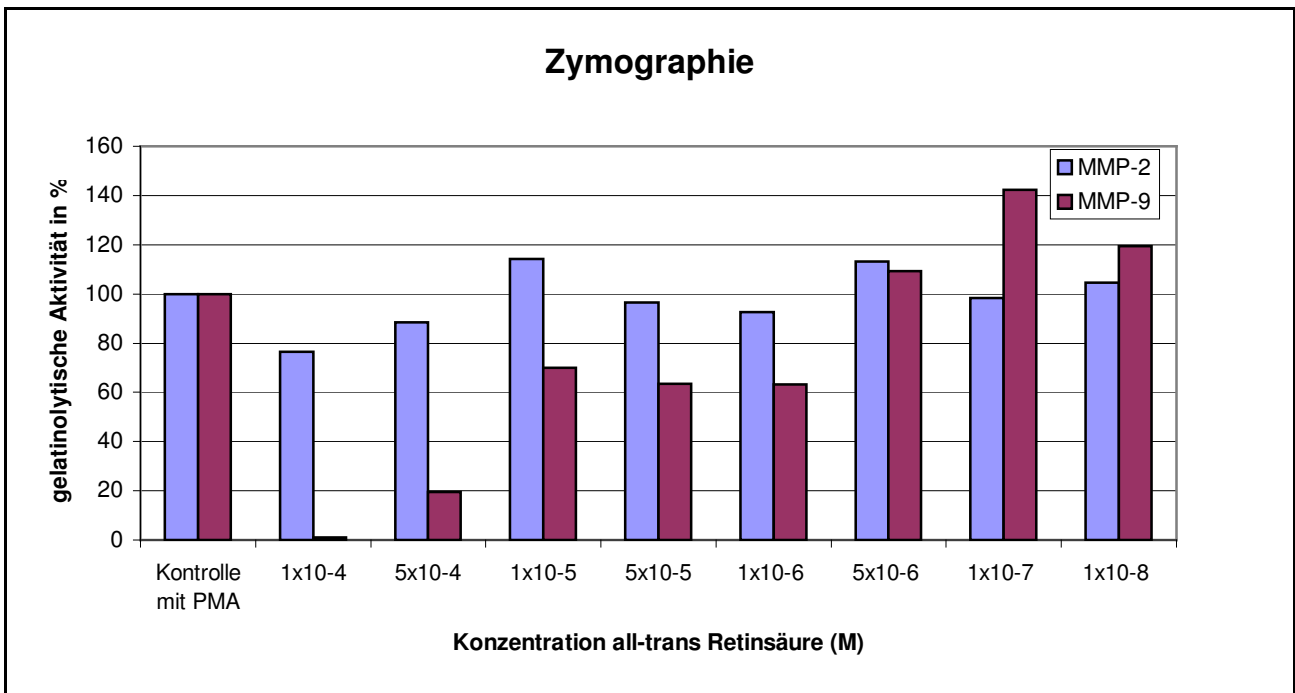


Diagramm 7: gelatinolytische Aktivität in einer SDS-PAGE Zymographie nach 12 Std. Retinsäurestimulation in verschiedenen Konzentrationen.

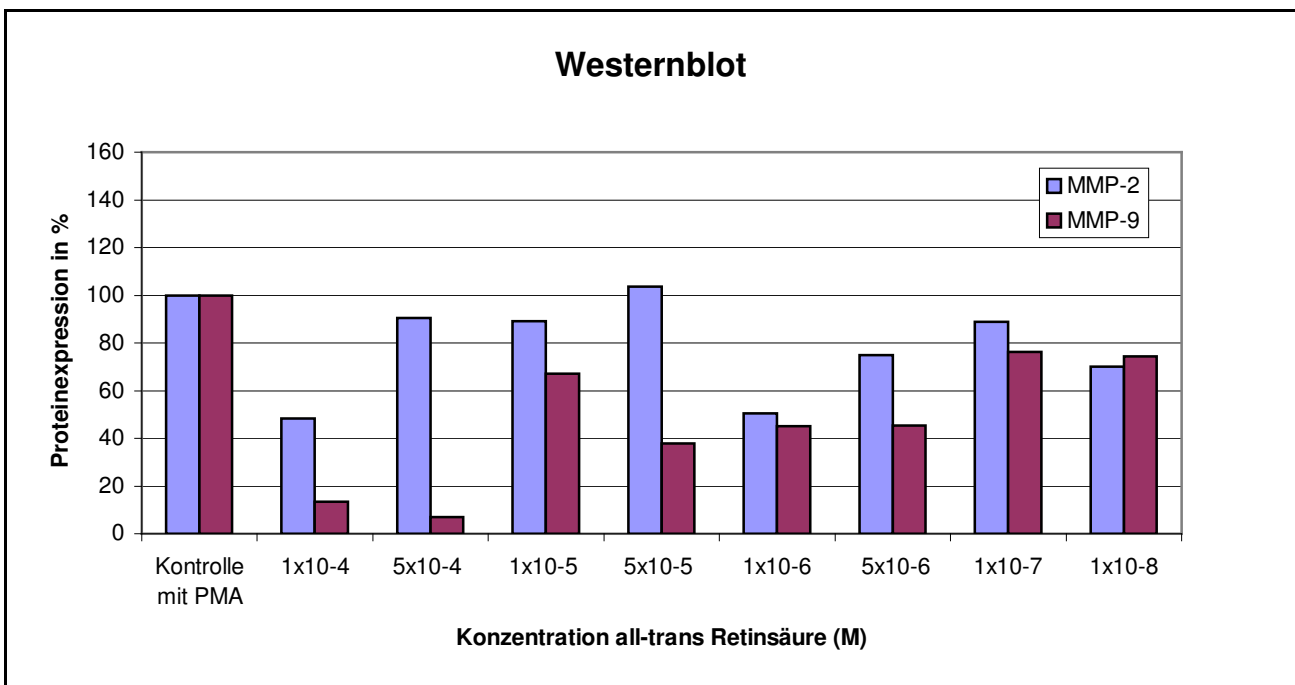


Diagramm 8: Proteinexpression in einer Westernblot Analyse nach 12 Std. Retinsäurestimulation in verschiedenen Konzentrationen. .

### 3.3.2 Retinsäurestimulation über 24 Stunden

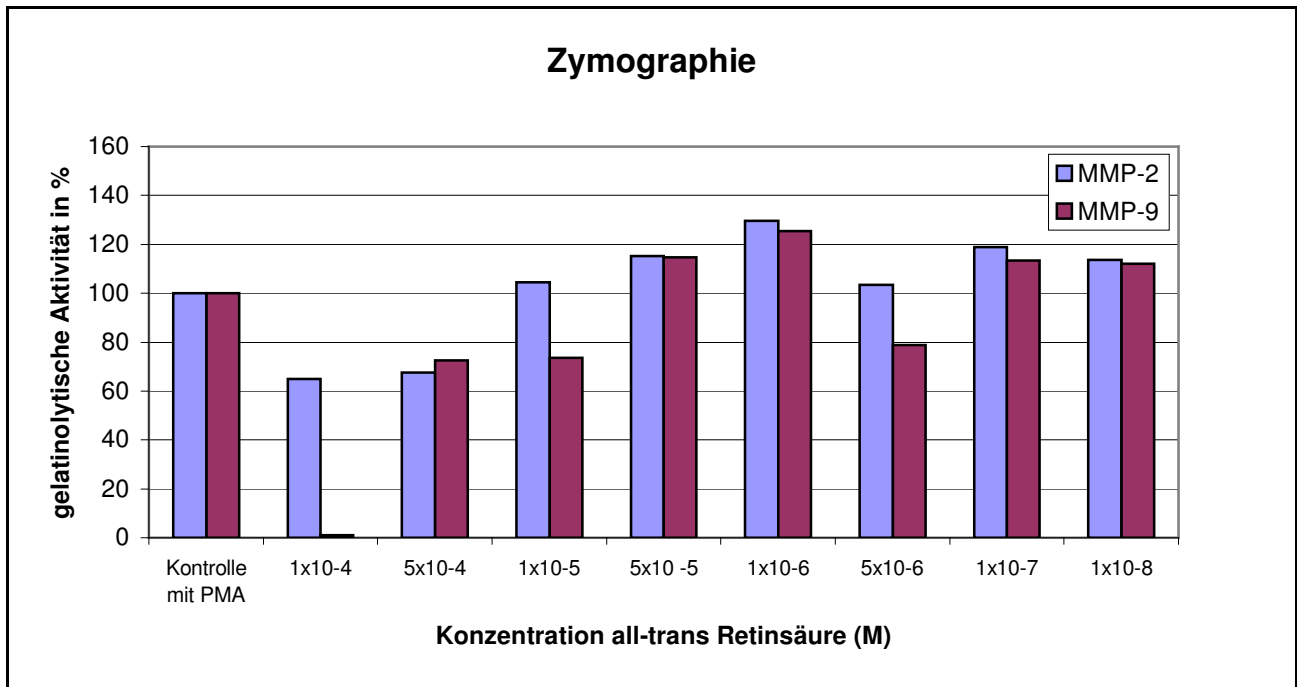


Diagramm 9: gelatinolytische Aktivität in einer SDS-PAGE Zymographie nach 24 Std. Retinsäurestimulation in verschiedenen Konzentrationen.

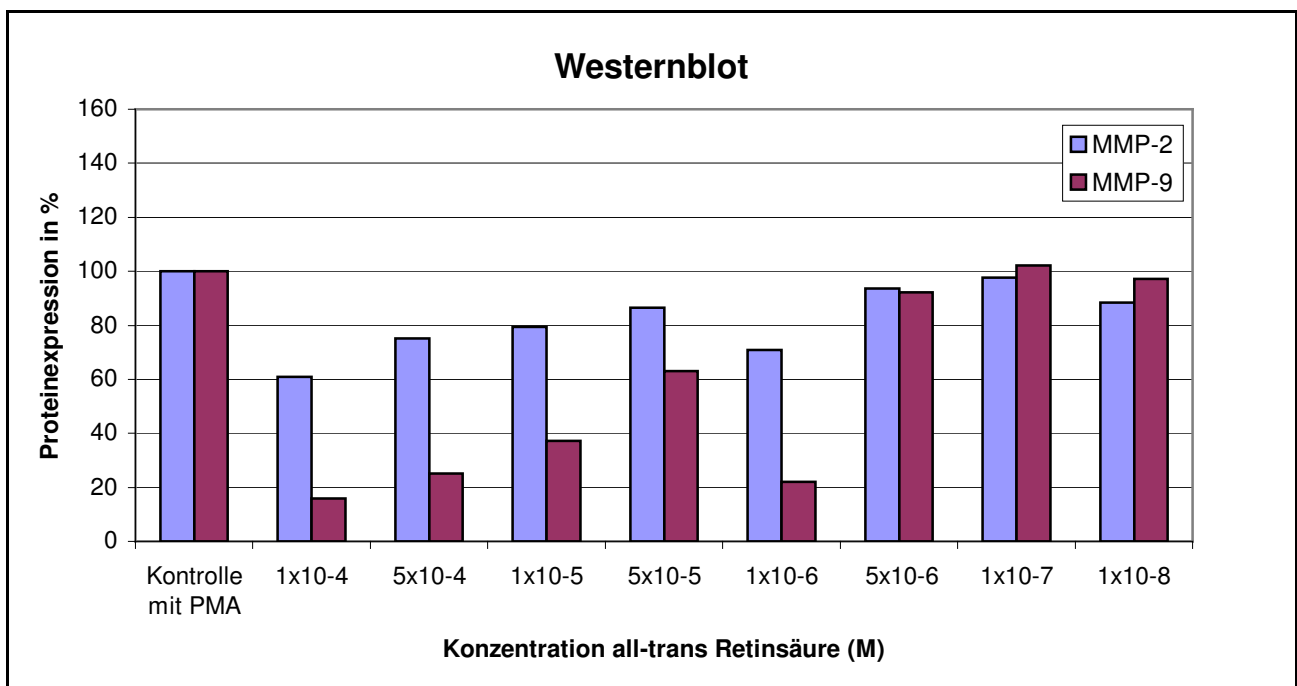


Diagramm 10: Proteinexpression in einer Westernblot Analyse nach 24 Std. Retinsäurestimulation in verschiedenen Konzentrationen

### 3.3.3 Retinsäurestimulation über 48 Stunden

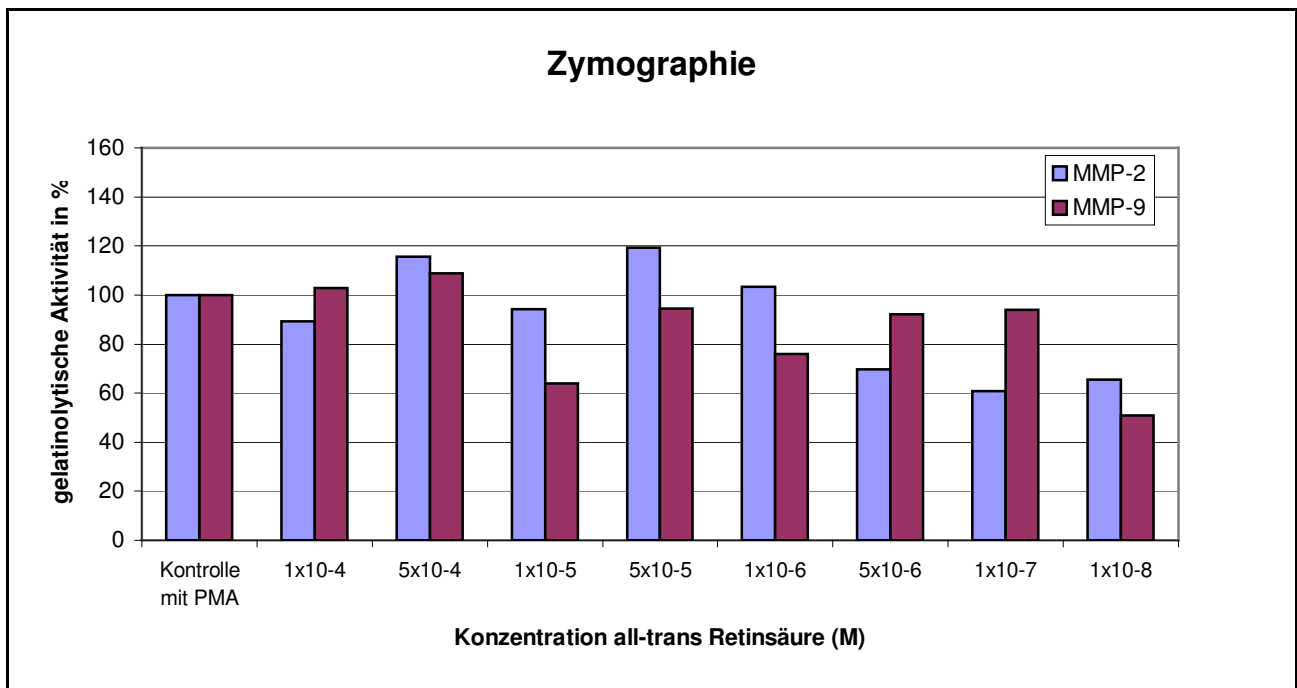


Diagramm 11: gelatinolytische Aktivität in einer SDS-PAGE Zymographie nach 24 Std. Retinsäurestimulation in verschiedenen Konzentrationen.

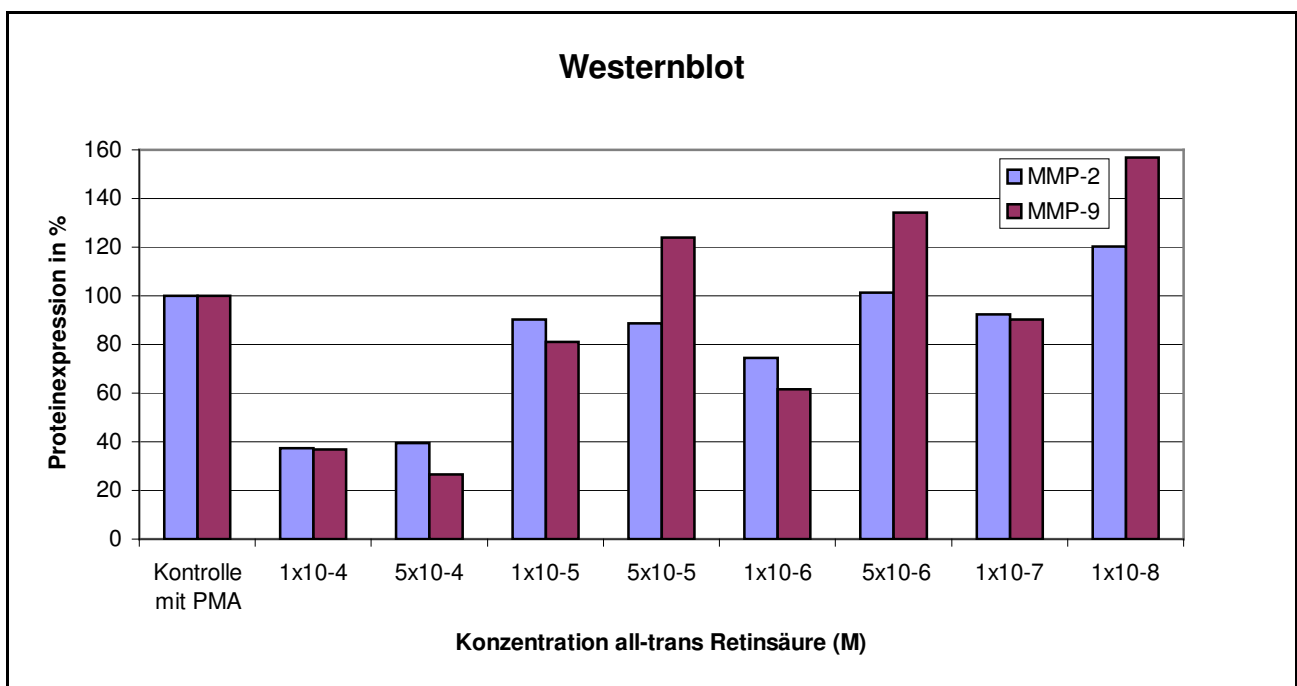


Diagramm 12: Proteinexpression in einer Westernblot Analyse nach 48Std. Retinsäurestimulation in verschiedenen Konzentrationen.

### 3.3.4 Retinsäurestimulation über 72 Std.

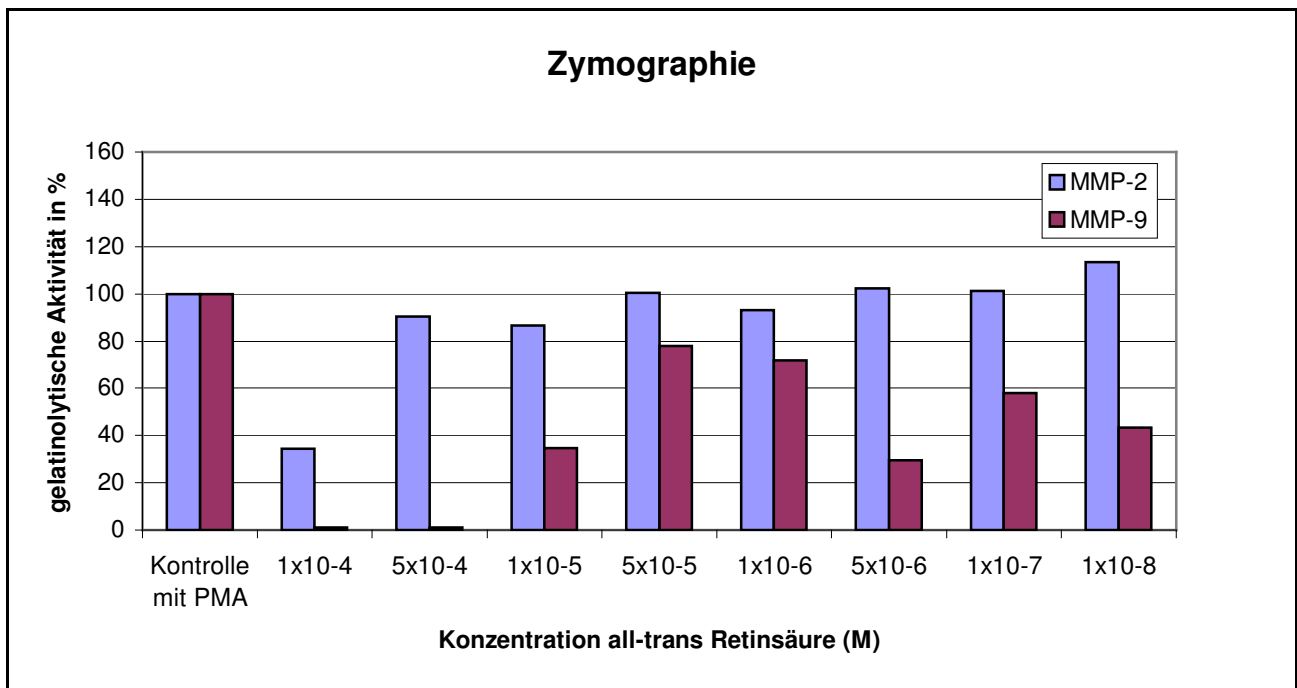


Diagramm 13: gelatinolytische Aktivität in einer SDS-PAGE Zymographie nach 72 Std. Retinsäurestimulation in verschiedenen Konzentrationen.

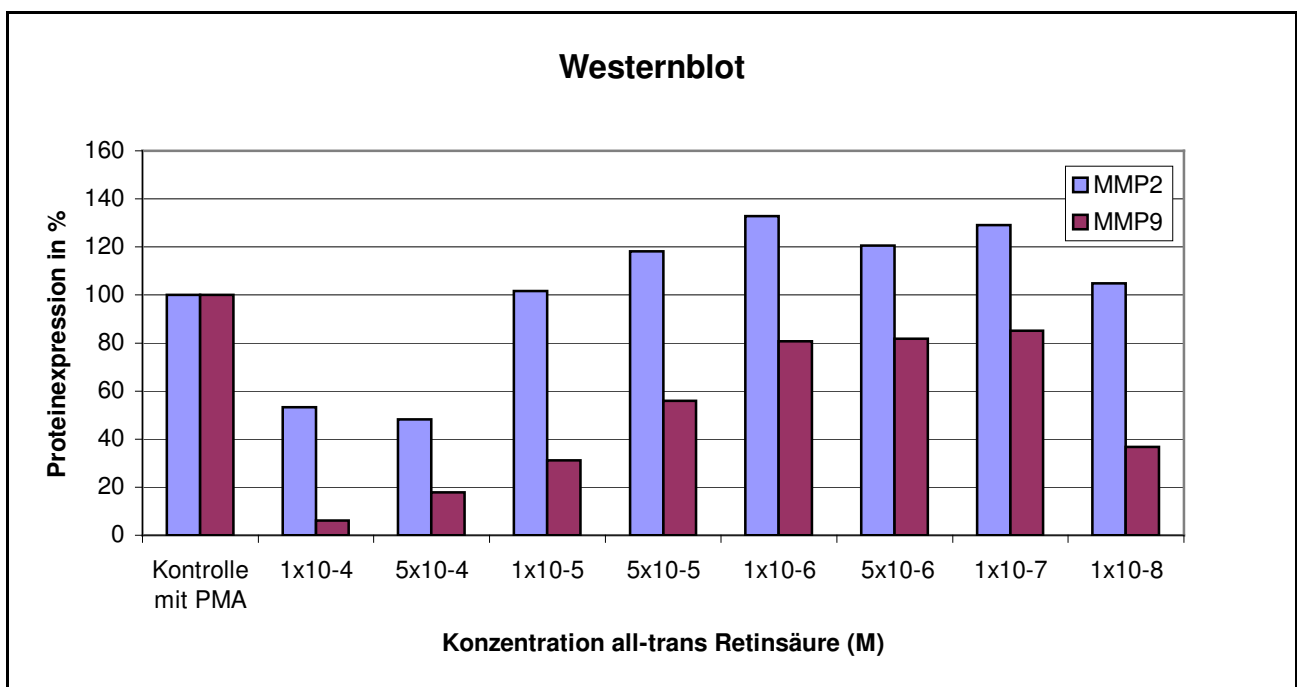


Diagramm 14: Proteinexpression in einer Westernblot Analyse nach 72 Std. Retinsäurestimulation in verschiedenen Konzentrationen.



### 3.4 Effekte von atRA auf die mRNA-Expression verschiedener EZM-Proteine

Eine Inkubation von subkonfluenten haSMC mit atRA in steigender Konzentration über 48 Std. führte zu einer dosisabhängigen Hemmung der TSP-1 mRNA-Expression bei atRA-Konzentrationen  $\geq 0,1 \mu\text{M}$ . Die mRNA-Expression von Fibronectin war ebenso gehemmt, aber der Effekt war geringer als bei TSP-1. Die TGF- $\beta$ 1 und Biglycan mRNA-Expression war unverändert. Kollagen-1 wurde besonders bei sehr hohen atRA-Dosen zwischen  $10 \mu\text{M}$  und  $100 \mu\text{M}$  gehemmt. Im Gegensatz zu TSP-1 und Fibronectin, fand sich ein kleiner stimulatorischer Effekt auf die mRNA-Expression von Kollagen-1 bei niedrigen atRA-Dosen von  $0,01 \mu\text{M}$  und  $0,1 \mu\text{M}$ .

Diese Northernblotanalyse zeigte einen Anstieg der Expression von  $\alpha$ -sm-Aktin mRNA nach 48 Std. bei niedrigen atRA-Konzentrationen von  $0,0001$ - $0,1 \mu\text{M}$  (Diagramme 15 und 16).

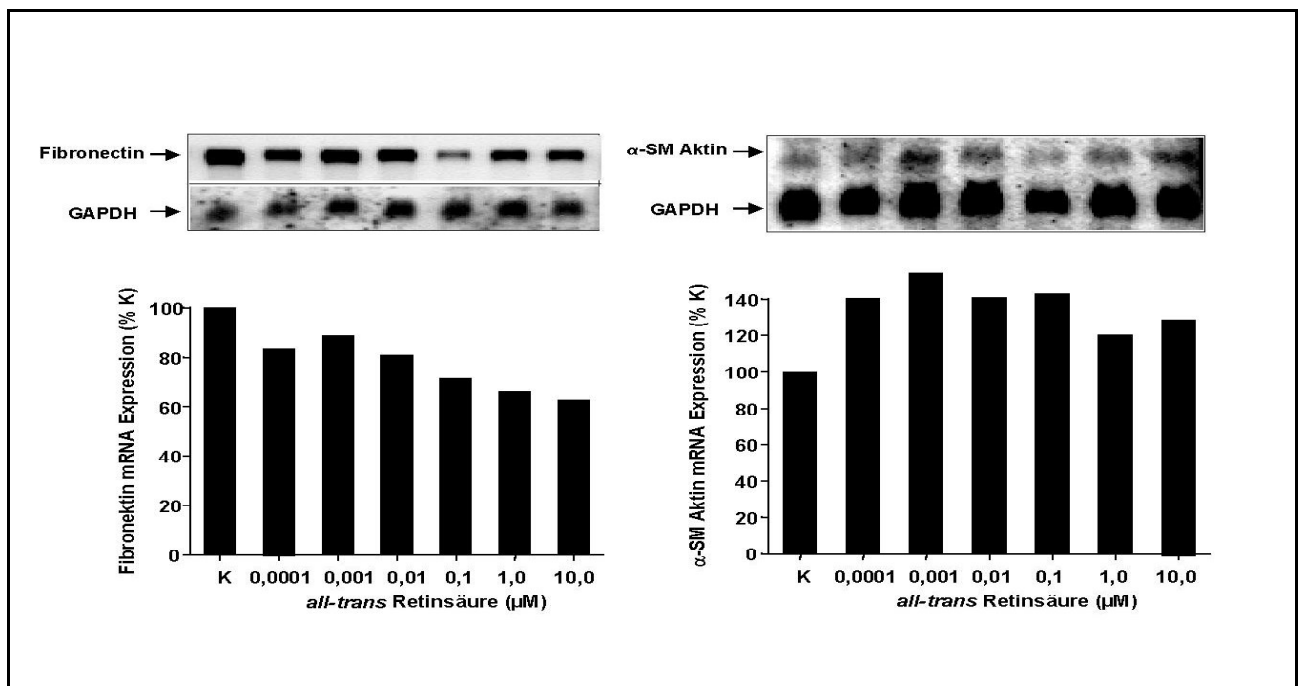


Diagramm 15: Effekte von atRA auf Fibronectin mRNA (links) und  $\alpha$ -sm-Aktin mRNA (rechts) nach 48 Std. in einer Northernblot Analyse

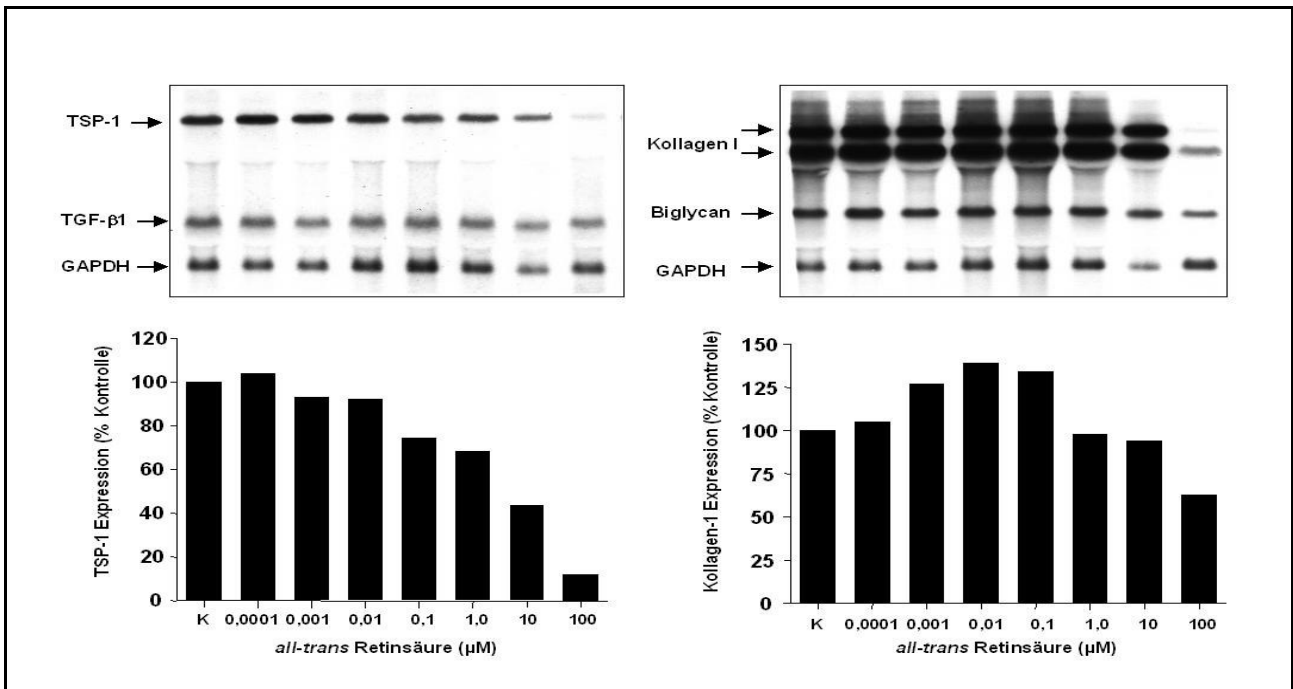


Diagramm 16: Effekte von atRA auf TSP-1 mRNA und TGF- $\beta$ 1 mRNA (links) sowie Effekte von atRA auf Kollagen-1 mRNA und Biglykan mRNA (rechts) nach 48 Std. in einer Northernblot Analyse.

## 4 Diskussion

All-trans Retinsäure ist eine Substanz mit zahlreichen pleiotropen Effekten, die bisher hauptsächlich wegen ihrer wachstumsmodulierenden Eigenschaften bei der Behandlung bestimmter Tumorarten eingesetzt wurde. Die zelldifferenzierenden Eigenschaften von all-trans-Retinsäure machen die Substanz jedoch auch in Hinblick auf eine therapeutische Anwendung in der arteriellen Gefäßwand interessant. Zur potentiellen Inhibition von Intimaverdickungen oder zur Beeinflussung der Plaquezusammensetzung sollten in dieser Arbeit speziell die Effekte von all-trans Retinsäure auf die Expression verschiedener extrazellulärer Matrixproteine und deren Abbau durch Matrix Metalloproteinasen untersucht werden.

### 4.1 MMP-2 und MMP-9 in nicht-stimulierten haSMC

Nicht stimulierte haSMC zeigten in unseren Versuchen zu allen Zeitpunkten eine nahezu konstante MMP-2 Aktivität, jedoch keine oder geringe MMP-9 Aktivität. Die normale Aktivität von MMP-2 und MMP-9 in nicht stimulierten haSMC war als Ausgangswert für Vergleiche mit stimulierten haSMC angenommen worden. Analog dazu beobachtete *Pasterkamp et al.* im Vergleich zur normalen Aktivität von MMP-2 und MMP-9 in nicht stimulierten haSMC eine erhöhte Aktivität von MMP-2 und MMP-9 in Plaques bei positivem Remodeling in menschlichen Koronararterien<sup>85</sup>. Obwohl positives Remodeling primär das Lumen erhält, erhöht es durch Um- und Abbau der EZM die Gefahr der Destabilisation und Plaqueruptur mit der Folge eines Gefäßverschlusses. Ein erhöhter Matrixabbau kann bei positivem Remodeling in einer Schwächung der Gefäßwand resultieren und als Extremform Aneurysmen darstellen. In Aneurysmen der menschlichen Aorta abdominalis wurde eine erhöhte Expressionen von MMP-2 und MMP-9 gefunden.<sup>102,54</sup> MMP sind am Vorgang der reaktiven Umgestaltung arteriosklerotischer Gefäße wesentlich beteiligt. Die Matrixanhäufung in der Atherosklerose betrifft zunächst Proteoglykane. Ihre Bildung wird durch neurohumorale Faktoren, erhöhten Blutdruck und chronisch zyklisch-mechanische Belastung in Gang gesetzt<sup>81</sup>. Sie bewirken eine Permeabilitätsänderung, wobei die herabgesetzte Maschendichte der Matrix, einem Molekülsiebeffekt vergleichbar, präzipitationsfördernd wirkt. Fibrinogen und Lipide können sich in der Intima anreichern. Kollagen stellt jedoch mengenmäßig den Hauptanteil. Nach Barnes<sup>5</sup> kommen Kollagen Typ I, III, IV, VIII und XVI in der Arterienwand vor, prädominant

sind Typ I und III. Den Kollagenabbau katalysieren maßgeblich die Metalloproteinasen. Die hier untersuchten MMP-2 und MMP-9 können Kollagene des Typs I, IV, VII und X abbauen und sind dadurch auch an diesem Schritt beteiligt.

Die Aktivität von MMP-2 in haSMC blieb bei Nichtstimulation konstant. MMP-9 zeigte keine oder geringe Aktivität. MMP-2 wird gewöhnlich konsekutiv exprimiert und MMP-9 nach Gefäßverletzung. Dieses diente als Ausgangswert für spätere Versuche.

## 4.2 Effekte von $\text{TNF}\alpha$ /PMA auf die MMP-2 und MMP-9 Synthese

In unseren Versuchen konnte weder durch eine Inkubation mit  $\text{TNF}\alpha$  noch durch eine Inkubation mit PMA eine gelatinolytische Aktivitätszunahme oder Zunahme der Proteinexpression von MMP-2 induziert werden. Eine Zunahme der MMP-9-Synthese zeigte sich erst nach  $\geq 12$  Std. PMA-Stimulation. Nach  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation fand sich keine erhöhte MMP-9 Aktivität in Zymographien. Die angefertigten Westernblot Analysen zum Nachweis der Proteinexpression zeigten vergleichbare Resultate. Aktivatoren wie PMA, konnten, im Gegensatz zu  $\text{TNF}\alpha$ , die MMP-9 Synthese stimulieren.

Analog zu unseren Ergebnissen konnte von *Fabunmi et al.*<sup>29</sup> in Zymographien gezeigt werden, dass PMA die Sekretion der MMP-9 in Kaninchen-SMC erhöht, nicht aber die von MMP-2. In EC der menschlichen Vena femoralis konnte in Zymographien nach PMA-Stimulation MMP-9 und die aktivierte Form der latenten MMP-2 nachgewiesen werden<sup>41</sup>. Dieses wurde auch bei menschlichen Fibrosarkom-Zellen beobachtet<sup>15</sup>. PMA ist ein potenter Proteinkinase-C Aktivator. Die Proteinkinase C besitzt eine zentrale Bedeutung bei der Signaltransduktion und wirkt bei der Regulierung des zellulären Wachstums mit. Die Proteinkinase C fördert die Produktion von extrazellulärer Matrix und Zytokinen, erhöht die Kontraktilität und Permeabilität von Blutgefäßen, steigert des Zellwachstum in Blutgefäßen, aktiviert die Phospholipase A2 und hemmt die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Die Folge sind potentielle Gefäßschäden.

$\text{TNF}\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin mit verschiedenen Effekten, z.B. Stimulation der Immunantwort über Aktivierung von Interleukinen, Proliferationsstimulation verschiedener Zellen und nekrotisierende Wirkung in Tumorgeweben.

In dieser Arbeit führte PMA zu einer Stimulation der MMP-9-Expresison in haSMC,  $\text{TNF}\alpha$  jedoch nicht.

### 4.3 Effekte von atRA auf die MMP-2 und MMP-9 Synthese

Die atRA-Behandlung in unseren Versuchen führte zu einer dosisabhängigen Inhibition der gelatinolytischen Aktivität und Proteinexpression von MMP-9 zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  bei 24, 48 und 72 Std. nach PMA-Stimulation. MMP-2 wurde dagegen nur teilweise in hohen Konzentrationen  $\geq 1 \mu\text{M}$  inhibiert: Insgesamt waren die Ergebnisse bzgl. des Effekts von atRA auf die MMP-2-Expression jedoch uneinheitlich und erlauben keine eindeutigen Aussagen.

Retinoide wurden schon seit langem erfolgreich bei der Behandlung der akuten Promyelozytenleukämie, Akne vulgaris, Basalzellkarzinomen und anderen Erkrankungen eingesetzt und sind dadurch gut untersucht und, in den in dieser Studie verwendeten Dosen, vom Menschen gut tolerabel <sup>76</sup>. Frühere Studien zeigten, dass atRA an zytoplasmatische und nukleäre Rezeptoren bindet, die Genexpression beeinflusst und damit die Migration, Proliferation und Matrixproduktion von haSMC inhibiert. Miano et al. <sup>69</sup> zeigten, dass 5 von 6 nukleären Retinoidrezeptoren in Aorten-SMC von Ratten exprimiert werden, und dass atRA an RAR- $\beta$  binden und dadurch die Transkription für Kollagenasen über AP-1 hemmen kann.<sup>2</sup>

Matrixabbauende Enzyme wie MMP-2 und MMP-9 verursachen eine gesteigerte Instabilität atherosklerotischer Plaques. Der Abbau der die Zelle umgebenden EZM ist eine Voraussetzung für die Migration der Zelle. Gelatinasen, wie MMP-2 und MMP-9, können eine Vielzahl verschiedener EZM-Proteine degradieren, wie beispielsweise nicht-fibrilläre Kollagene, die in den Basalmembranen der Zellen zu finden sind, sowie Proteoglykane und Elastin.

Die Behandlung mit atRA müsste somit auch in vivo zu einem verringerten Matrixabbau und einer Hemmung der Migration glatter Muskelzellen führen, die zur Formation intimaler Verdickungen nach Gefäßverletzung beitragen. Außerdem ist die Hemmung des Abbaus bereits bestehender EZM in der fortgeschrittenen Plaque hinsichtlich einer Stabilitätssteigerung von Bedeutung. Insbesondere die Akkumulation strukturbildender Kollagene, wie das fibrilläre Kollagen-Typ 1, bestimmt die Festigkeit der fibromuskulären Kappe, die den weichen Lipidkern der Plaque umgibt. Entscheidend ist dabei der Nettoeffekt aus der MMP-Aktivierung, der gleichzeitigen Expression oder Repression von MMP-Inhibitoren und der Kollagenbildung. Folglich könnte eine Kontrolle der MMP zu

einer Stabilisierung arteriosklerotischer Plaques und Prävention der klinischen Konsequenzen führen.

#### 4.4 Effekte von atRA auf die Expression verschiedener EZM-Proteine

In dieser Arbeit führte eine Inkubation von subkonfluenten haSMC mit atRA in steigender Konzentration über 48 Std. zu einer dosisabhängigen Hemmung der TSP-1 mRNA-Expression bei atRA-Konzentrationen  $\geq 0,1 \mu\text{M}$ . Die mRNA-Expression von Fibronectin war ebenso gehemmt, aber der Effekt war geringer als bei TSP-1. Die TGF- $\beta$ 1 und Biglycan mRNA-Expression war unverändert. Kollagen-1 wurde besonders bei sehr hohen atRA-Dosen zwischen  $10 \mu\text{M}$  und  $100 \mu\text{M}$  gehemmt. Im Gegensatz zu TSP-1 und Fibronectin, fand sich ein kleiner stimulatorischer Effekt auf die mRNA-Expression von Kollagen-1 bei niedrigen atRA-Dosen von  $0,01 \mu\text{M}$  und  $0,1 \mu\text{M}$ . Die Northernblot Analyse zeigte einen Anstieg der Expression von  $\alpha$ -sm-Aktin mRNA nach 48 Std. bei niedrigen atRA-Konzentrationen von  $0,0001$ - $0,1 \mu\text{M}$ . Zusammenfassend zeigte die Northernblot Analyse, dass spezifische extrazelluläre Matrixproteine entweder durch Hinzufügen von atRA gehemmt oder angeregt werden. Die Expression von Kollagen-1 wurde durch atRA hochreguliert, während TSP-1 und Fibronectin mRNA dosisabhängig gehemmt wurden. Die Hemmung von Fibronectin war weniger stark ausgeprägt als für TSP-1. Die Expression des kleinen Proteoglykans Biglycan wurde nicht durch atRA beeinflusst.

Die Hemmung von TSP-1 ist besonders interessant, weil es ein potentes Mitogen für SMC darstellt und außerdem die Zellmigration fördert. Es ist ein Aktivator für TGF- $\beta$ 1, ein Wachstumsfaktor, der haSMC stimuliert. TSP-1 beeinflusst die Plasmininformation durch eine komplexe Anordnung mit Plasminogen, was zu einer EZM-Degradation und zu SMC-Migration führt. Zusätzlich hemmt TSP-1 die Aktivität von MMP durch Hemmung ihrer Aktivierung. Die Expression von  $\alpha$ -sm-Aktin Expression hängt von der Wachstumsrate und Zelldichte der haSMC ab <sup>103</sup>. Bei der Restenosebildung steht initial ein Gefäßtrauma, das durch die Angioplastie selbst und durch die lokale Plaquebeschaffenheit ausgelöst wird. Hierbei kann es zu einer Deendothelialisierung, direkten Schädigung der SMC und Aktivierung des Gerinnungssystems kommen. <sup>101,31</sup> Dies führt zur Thrombenbildung. Ein Fibrinthrombus stellt die erste primitive Form der EZM bei der Restenosebildung dar. Anschließend folgt die Aktivierung und Einwanderung von Entzündungszellen in den Thrombus. <sup>38,92,32</sup> Durch die von verschiedenen Wachstumsfaktoren aktivierten Rezeptoren und Signaltransduktionwege werden die SMC angeregt, sich aus ihrem

Zellverband zu lösen, sich zu teilen, in den Thrombus zu migrieren und diesen durch Umbau der EZM mittels Proteasen, wie den Matrix Metalloproteinasen, zu stabilisieren. Dabei kommt es zu einer weiteren Volumenexpansion der Neointima, die hauptsächlich durch Akkumulation von EZM verursacht wird.<sup>100</sup> Zu diesem Zeitpunkt beginnt das arterielle Remodeling. Der Gefäßwandumbau oder „vascular remodeling“ ist definiert als Änderung des Gefäßkalibers mit wenig oder keiner Änderung der Gewebsmasse. Es handelt sich um eine Verlagerung von Zellen und Matrix zum Lumen oder vom Lumen weg, mit Verkleinerung oder Vergrößerung des Querschnitts.

AtRA hemmte die TSP-1 mRNA- und Fibronectin-Expression, die TGF- $\beta$ 1 und Biglycan mRNA-Expression blieben dagegen unverändert. Kollagen-1 wurde in niedriger Dosierung stimuliert und bei hohen Dosen gehemmt. Unsere Ergebnisse zeigten, dass atRA eine Zunahme an  $\alpha$ -sm-Aktin und Kollagen-1 mRNA verursacht. Nach der Einteilung der Proteine der EZM in Strukturproteine wie Kollagen und Elastin, sowie in Adhäsionsproteine wie Laminin, Thrombospondin und Fibronectin, zeigten unsere Ergebnisse, dass Strukturproteine durch atRA angeregt werden, während Adhäsionsproteine gehemmt werden.

Insgesamt kann gesagt werden, dass atRA pleiotrope Effekte auf Gefäßzellen ausübt und dass die totale Menge an Matrix und der Netto-Effekt von atRA von einer Vielzahl differenter Faktoren abhängt.

## 4.5 Ausblick

Wir erwarteten bei einer Hemmung der Matrix Metalloproteinasen durch atRA eine Zunahme der Matrix und eine Abnahme der Zellmigration in die Intima oder in Plaques. Während bei der Arteriosklerose eine Zunahme der Matrix für die Stabilisierung fortgeschrittener fibröser Plaques durchaus von Vorteil sein könnte, ist eine Zunahme der EZM bei einer Restenose unerwünscht, da es zu einer Intimaverdickung und damit zu einer progredienten Stenosierung mit folgender Ischämie kommen könnte.

Es könnte die Hypothese aufgestellt werden, daß es durch direkte Hemmung der MMP-9 Synthese in haSMC sowie durch Zunahme der Kollagen-1 Synthese nach atRA-Behandlung zu einer Stabilisierung der fibrösen Kappe kommen kann. Somit könnte atRA in vivo möglicherweise die Stabilisierung der atheromatösen Plaque auch über die Stimulation der Differenzierung glatter Muskelzellen fördern. Die redifferenzierten glatten Muskelzellen in der fibromuskulären Kappe bilden verstärkt Aktin- und Myosinfasern aus

und proliferiert nicht mehr. Dies ist typisch für ausdifferenzierte Zellen der normalen Media und der stabilen, nicht-aktiven atherosklerotischen Plaque<sup>55</sup>. Nicht-aktive, differenzierte glatte Muskelzellen produzieren keine matrixabbauenden Enzyme und tragen daher nicht zur Destabilisierung der fibromuskulären Kappe bei.

All-trans Retinsäure wurde bislang in vivo nur im Tiermodell erfolgreich getestet. Dabei wurde aber von einer systemischen Applikation ausgegangen, was den Einsatz beim Patienten möglicherweise erschweren könnte. Jedoch wurden bereits solche Dosierungen, die sich bei humanen arteriellen glatten Muskelzellen als wirksam erwiesen haben zur Tumorbehandlung eingesetzt. Hier zeigte sich eine relativ gute Verträglichkeit.

Es muss also geklärt werden, ob effektive in-vitro Konzentrationen von all-trans Retinsäure auch in vivo ohne nennenswerte Nebenwirkungen erreicht werden können. Eine lokale Behandlung mittels Doppelballon-Katheter oder medikamentösen Stents sind in Bezug auf eventuell drohende, möglicherweise erhebliche Nebenwirkungen durchaus zu diskutieren. Vorteile der Retinoide sind die äußerst vielfältigen Wirkungen auf das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung, die Matrixsynthese und den Matrixabbau, was auch deren physiologische Beteiligung in mehreren Stadien der Embryogenese belegt. All-trans Retinsäure hat pleiotrope Effekte auf eine Vielzahl von Prozessen in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen und in der Restenosebildung. Effekte auf Differenzierung und Migration von haSMC wurden schon unter anderem von *Axel et al.*<sup>4</sup> beschrieben. Diese Arbeit bestätigte die Ergebnisse und konnte zeigen, dass auch die Synthese und der Abbau der EZM und im Besonderen die Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 einen wichtigen Faktor in der Ausbildung der Atherosklerose und Fortschreiten der Restenose darstellen. Eine selektive Hemmung könnte zu einem günstigeren Verlauf bei diesen Erkrankungen führen. Jedoch sind diese Ergebnisse erst ein Beginn und müssen weiter untersucht werden. Insbesondere die genauen molekularen Grundlagen der Aktivierung und Hemmung der Metalloproteinasen durch Retinsäure sind noch unklar. Ebenso unklar sind die Effekte auf andere physiologische und pathologische Zellinteraktionen und deren Auswirkungen.



## 5 Zusammenfassung

All-trans-Retinsäure ist eine Substanz mit wachstummodulierenden Eigenschaften, die in verschiedenen Zelltypen die Ausbildung eines differenzierten Zellphänotyps induzieren kann. Da die Entstehung von arteriosklerotischen und restenotischen Gefäßläsionen durch das Auftreten von entdifferenzierten glatten Muskelzellen charakterisiert ist, ergibt sich hieraus ein Ansatz, all-trans-Retinsäure bei diesen Krankheitsbildern therapeutisch einzusetzen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte von all-trans-Retinsäure auf die Matrix Metalloproteinasen und die vaskuläre extrazelluläre Matrix, im Besonderen auf die Expression der matrixabbauenden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sowie die mRNA-Expression von TSP-1, TGF- $\beta$ 1, Biglycan,  $\alpha$ -glattmuskulärem-Aktin und Kollagen-1 in glatten Gefäßmuskelzellen des Menschen in in-vitro Untersuchungen zu prüfen.

Diese Arbeit zeigte, dass unstimulierte haSMC MMP-2 produzieren, jedoch nicht MMP-9. Eine erhöhte Expression von MMP-9 kann nach mehr als 12 Std. Stimulation mit PMA nachgewiesen werden. Dagegen induziert TNF $\alpha$  keine erhöhte MMP-Expression in haSMC. Eine Präinkubation mit atRA für 6 Std. zeigte in SDS-PAGE Zymographien und Westernblot Analysen eine dosisabhängige Hemmung der gelatinolytischen Aktivität und der Proteinexpression von MMP-9 nach 12 bis 72 Std. Stimulation mit PMA. Eine partielle Hemmung der MMP-2-Synthese deutete sich bei Gabe von hohen atRA-Dosen an. AtRA hemmte die Thrombospondin-1 mRNA und Fibronectin mRNA in Northernblot Analysen deutlich, während es in niedrigeren Dosen in Höhe zwischen 0,01 und 0,1  $\mu$ M die Bildung von Kollagen-1 mRNA sowie von  $\alpha$ -glattmuskulärem-Aktin gering stimulierte.

Zusammenfassend ergab diese in vitro-Untersuchung Hinweise, dass Marker von entdifferenzierten glatten Muskelzellen wie MMP-9, Thrombospondin-1 und Fibronectin durch all-trans-Retinsäure gehemmt werden können.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AF	Aktivationsfaktor
AP	Aktivatorprotein
atRA	all-trans retinoic acid
BSA	bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CRABP	cellular retinoic acid binding protein
CRBP	cellular retinol binding protein
DAPI	4',6-diamidine-2-phenylindole-dihydrochloride
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
haSMC	humane arterielle smooth muscle cells
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-Sulfonsäure
IL-1	Interleukin-1
KHK	koronare Herzkrankheit
LBD-8	Ligandenbindungsdomäne 8
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MMP	Metalloproteinasen
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
MT-MMP	membran-type Metalloproteinase
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor

PMA	phorbol myristate acetate
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
RA	retinoic acid
RAR	retinoic acid receptor
RARE	Retinsäure-responsives-Element
RXR	retinoid-X-Rezeptor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-polyacrylamidgelelektrophorese
sm-Aktin	glattmuskuläres Aktin
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	tumor necrosis factor
t-PA	tissue-type-Plasminogen-Aktivator
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
TSP	Thrombospondin
u-PA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
UV	ultraviolettes Licht
WHO	World Health Organisation
Zn <sup>2+</sup>	Zink

## 7 Literaturverzeichnis

1. Aimes RT und Quigley JP: Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem.* 1995;270:5872-58726
2. Angel P, Baumann I, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P: 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5' flanking region. *Mol Cell Biol.* 1987;7:2256-2266
3. Axel DI, Frigge A, Dittmann J, Runge H, Spyridopoulos I, Riessen R, Viebahn R und Karsch KR: All-trans retinoic acid regulates proliferation, migration, differentiation, and extracellular matrix turnover of human smooth muscle arterial cells. *Cardiovasc Res.* 2001;49:851-862
4. Axel DI, Riessen R, Athanasiadis A, Runge H, Köveker G and Karsch KR: Growth factor expression of human arterial smooth muscle cells and endothelial cells in a transfilter coculture system. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:2967-2978
5. Barnes JM, Farndale RW: Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol.* 1999;34:513-525
6. Bauters C, Marotte F, Hamon M, Oliviero P, Farhadian F, Robert V, Samuel JL, Rappaport L: Accumulation of fetal fibronectin mRNAs after balloon denudation of rabbit arteries. *Circulation* 1995;92:904-911
7. Beller GA: Coronary heart disease in the first 30 years of the 21<sup>st</sup> century: Challenges and opportunities. *Circulation.* 2001;103:2428-2435
8. Bendeck MP, Irvin C, Reidy MA: Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ Res.* 1996;78:38-43
9. Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE and Reidy MA: Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res.* 1995;75:539-545
10. Birkedal-Hansen H, Moore W, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA: Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4:197-250
11. Bollag W, Isnardi S, Jablonska M, Klaus S, Majewski W, Pirson S and Toma S: Links between pharmacological properties of retinoids and nuclear receptors. *Int J Cancer.* 1997;70 (4): 470-472
12. Bornstein P: Thrombospondins: structure and regulation of expression. *FASEB J* 1992;6:3290-3299
13. Brophy CM, Marks WH, Reilly JM, Tilson MD: Tissue inhibitor of metalloproteinases is matrix associated in aortic tissue: a report of a radioimmunoassay. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;167:898-903
14. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM: Identification of 92 kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. *Circulation.* 1995;91:2125-2131
15. Brown PD, Levy AT, Margulies IM, Liotta LA and Stetler-Stevenson: Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. *Cancer Res.* 1990;50:6184-6191
16. Camejo G, Camejo EH, Olsson U, Bondjers G: Proteoglycans and lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1993;4:385-391

17. Chen J, Zheng D, Liu J, Zhu S: All-trans retinoic acid reduces intimal thickening after balloon angioplasty in atherosclerotic rabbits. *Chin Med J*. 1999 Feb;112(2):121-3
18. Chytil F and Ong D: Cellular retinoic-binding proteins. The retinoids. Vol. 2. Academic Press. Orlando 1984 pp90-123
19. Clark RAF, Quinn JH, Winn HJ, Lanigan JM, Dellepella P, Colvin RB: Fibronectin is produced by blood vessels in response to injury. *J Exp Med* 1982;156:646-651
20. Clark SD, Kobayashi DK and Welgus HG: Regulation of the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and collagenase by retinoids and glucocorticoids in human fibroblasts. *J Clin Invest*. 1987;80:1280-1288
21. Clausell N, de Lima VC, Molossi S, Liu P, Turley E, Gotlieb AI, Adelman AG, Rabinovitch M: Expression of tumour necrosis factor and accumulation of fibronectin in coronary artery restenotic lesions retrieved by atherectomy. *Br Heart J* 1995;73:534-539
22. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA and Goldberg GI: H-ras oncogenettransformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J. Biol. Chem*. 1988;263, 6579-6587.
23. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SMF, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N: Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta 1 in vivo. *Cell* 1998;93:1159-1170
24. Di Mario C, Gil R, Camenzind E, Ozaki Y, von Birgelen C, Umans V, de Jaegere P, De Feyter PJ, Roelandt JRTC, Serruys PW: Quantitative assessment with intracoronary ultrasound of the mechanisms of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty and directional coronary atherectomy. *Am J Cardiol*. 1995;75:772-777
25. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM: Matrix Metalloproteinases and Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 1995;77:863-868
26. Durand B, Saunders M, Gaudon C, Roy B, Losson R and Chambon P: Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J*. 1994;13:4370-5382
27. Emanuel EJ, Emanuel LL: The promise of a good death *Lancet*. 1998;351:21-29
28. Estreicher A, Wohlwend A, Belin D, Schleunung WD, Vassalli JD: Characterization of the cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem*. 1989;264:1180-1189
29. Fabunmi RP, Baker AH, Murray EJ, Booth RF and Newby AC: Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors or metalloproteinases-1, -2, and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J*. 1996;315:335-342
30. Faxon DP, Coats W, Currier J: Remodeling of the coronary artery after vascular injury. *Prog Cardiovasc Dis*. 1997;40:129-140
31. Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D, Shah PK, Badimon L: Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol*. 1994;23:1562-1569
32. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J: A paradigm for restenosis based on cell biology: Clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol*. 1991;17:758-769
33. Frankenberger M, Hauck RW, Frankenberger B, Haussinger K, Maier KL, Heyder J, Ziegler-Heitbrock HW: All trans-retinoic acid selectively down-regulates matrix

- metalloproteinase-9 and up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human bronchoalveolar lavage cells. *Mol Med.* 2001 Apr;7(4):263-70
34. Fuster V: Elucidation of the role of plaque instability and rupture in acute coronary events. *Am J Cardiol* 1995;76:24C-33C
  35. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Libby P: Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res.* 1994;75:181-189
  36. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P: Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94:2493-2503
  37. Gearing AJH, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL et al.: Processing of TNF $\alpha$  precursor by metalloproteinases. *Nature.* 1994;370:555-557
  38. Geary RL, Nikkari ST, Wagner WD, Williams JK, Adams MR, Dean RH: Wound healing: a paradigm for lumen narrowing after arterial reconstruction. *J Vasc Sur.g* 1998;27:96-106
  39. George SJ, Johnson JL, Angelini GD, Newby AC, Baker AH: Adenovirus-mediated gene transfer of the human TIMP-1 gene inhibits smooth muscle cell migration and neointimal formation in human saphenous vein. *Hum Gene Ther.* 1998;9:867-877
  40. Grüntzig AR: Transluminal dilatation of coronary artery stenosis. *Lancet.* 1978;1:263-264
  41. Hanemaajer R, Koolwijk P, LeClercq L, DeVree W und Hinsbergh V: Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. *Biochem J.* 1993;298:803-809
  42. Hansson GK, Jonasson L, Seiffert PS, Stemme S: Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1989;9:567-578
  43. Harris ED and Krane SM: An endopeptidase from rheumatoid tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta.* 1972;258,566-576
  44. Hendrix MJ, Wood WR, Seftor EA, Lotan D, Nakajima M, Misiorowski RL, Seftor RE, Stetler-Stevenson WG, Bevacqua SJ and Liotta LA: Retinoic acid inhibition of human melanoma cell invasion through a reconstituted basement membrane and its relation to decreases in the expression of proteolytic enzymes and motility factor receptor. *Cancer Res.* 1990;50:4121-4130
  45. Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, Humphries SE: Localisation of stromolysine gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:8154-8158
  46. Iruela-Arispe ML, Bornstein P, Sage H: Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on cord formation by endothelial cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5026-5030
  47. Iruela-Arispe ML, Liska D, Sage EH, Bornstein P: Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development. *Dev Dynam* 1993;197:40-56
  48. James TW, Wagner R, White LA, Zwolak RM, Brinckerhoff CE: Induction of collagenase and stromolysin gene expression by mechanical injury in avascular smooth muscle-derived cell line. *J Cell Physiol.* 1993;157:426-437
  49. Jensen BA, Holund B, Clemmensen I: Demonstration of fibronectin in normal and injured aorta by an indirect immunoperoxidase technique. *Histochemistry* 1983;77:395-403

50. Kato S, Sasaguri Y, Morimatsu M: Down-regulation in the production of matrix metalloproteinase-1 by human aortic intimal smooth muscle cells. *Biochem Mol Biol int.* 1993;31:239-248
51. Katsuda S, Okada Y, Minamoto T, Oda Y, Matsui Y, Nakanishi I: Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arteriosclerosis Thromb* 1992;12:494-502
52. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG: Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases. *Current Opinion Cell Biol.* 1993;5:891-897
53. Kleinert et al. *Anal Biochem.* 1994;218:325-329
54. Knox JB, Sukhova GK, Whittmore AD and Libby P: Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation.* 1997;95:205-212
55. Krusius T, Ruoslahti E: Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:7683-7687
56. Kunz J: The role of the vascular extracellular matrix and the age-related changes of arteries. *Gerontology.* 2002;48:267-278
57. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685
58. Lahav J: The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 1993;1182:1-14
59. Lawler J, Duquette M, Whittaker CA, Adams JC, McHenry K, DeSimone DW: Identification and characterization of thrombospondin-4, a new member of the thrombospondin gene family. *J Cell Biol* 1993;120:1059-1067
60. Lee RT, Kamm RD: Vascular mechanics for the cardiologist. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:1289-1295
61. Lee RT, Libby P: The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1859-1867
62. Liotta LA, Abe S, Robey PG and Martin GR: Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979;76, 2268-2272.
63. Luscinskas FW, Lawler J: Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J* 1994;8:929-938
64. Mayne R, Brewton RG: New members of the collagen superfamily. *Current Opinion Cell Biol* 1993;5:883-890
65. Mayne R: Collageneous proteins of blood vessels. *Arteriosclerosis* 1986;6:585-593
66. McCullagh KG, Duance VC, Bishop KA: The distribution of collagen types I, III and V (AB) in normal and atherosclerotic human aorta. *J Pathol* 1980;130:45-55
67. McDonald JA: Fibronectin: A primitive matrix, in Clark RAF, Henson PM (eds): *The molecular and cellular biology of wound repair.* New York, Plenum Press, 1988, pp 405-426
68. McGeehan GM, Becherer JD, Bast RC jr, Boyer CM, Champion B, Connolly KM, Conway JG, Furdon P, Karp S, Kidao S et al.: Regulation of TNF $\alpha$  processing by a metalloproteinase inhibitor.
69. Miano JM, Topouziz S, Majesky MW, Olson EN: Retinoic receptor expression and all-transretinoec acid-mediated growth inhibition in vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 1996;93: 1886-1895
70. Miano JM, Vlasic N, Tota RR, Stemerman MB: Smooth muscle cell immediate-early gene and growth factor activation follows vascular injury. A putative in vivo mechanism for autocrine growth. *Arteriosclerosis Thromb* 1993;13:211-219

71. Mignatti P, Rifkin DB: Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 1993;73:161-195
72. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong SC, Hong MK, Kovach JA, Leon MB: Arterial remodeling after coronary angioplasty. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation.* 1996;94:35-43
73. Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Isupov M, Lindqvist Y, Schneider G and Tryggvason K: Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science* 1999;284, 1667-1670.
74. Morton LF, Barnes MJ: Collagen polymorphism in the normal and diseased blood vessel wall. *Atherosclerosis* 1982;42:41-51
75. Mozar H, Bal DG and Farag SA: The natural history of atherosclerosis: a ecologic perspective Viewpoint. *Atherosclerosis.* 1986;6:664-669
76. Muini JRF, Young CW, Warrell RP: Clinical pharmacology of all-trans retinoic acid. *Leucemia.* 1994;8:1807-1812
77. Müller R, Büllsfeld L, Gerckens U und Grube E: Aktueller Stand der Therapie der koronaren Herzerkrankheit mit medikamentenbeschichteten Stents. *Herz.* 2002; 27:508-13
78. Murata K, Motoyama T, Kotake C: Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis* 1986;60:251-262
79. Nagase H, Enghild JJ, Suzuki K, Salvesen G: Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 by proteinases and mercuric acetate. *Biochemistry.* 1990;29:5783-5789
80. Nicholson RC, Mader S, Nagpal S, Leid M, Rochette-Egly C, and Chambon P: Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP1 binding site. *EMBO J.* 9:4443-4454
81. O'Callaghan CJ, Williams B: Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: Role of TGF- $\beta$ . *Hypertension.* 2000;36:319-324
82. O'Brien KD, Olin KL, Alpers CE, Chiu W, Ferguson M, Hudkins K, Wight TN, Chait A: Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques: colocalization of biglycan with apolipoproteins. *Circulation* 1998;98:519-527
83. Ong DE, Newcomer ME and Chytil F: Cellular retinoid-binding proteins. Chemistry and medicine NY: Raven Press Ltd. 1994
84. Pan L, Chamberlain SH, Auble DT and Brinckerhoff CE: Differential regulation of collagenase gene expression by retinoic receptors - alpha, beta and gamma. *Nucleic Acids Res.* 20:3105-3111
85. Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hijnen DJ, de Kleijn DP Teepen H, van der Wal AC und Borst C: Arteriosclerotic arterial remodeling and the localisation of macrophages and matrix metalloproteinases 1,2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis.* 2000;150:245-253
86. Patel MK, Lymn JS, Clunn GF, Hughes AD: Thrombospondin-1 is a potent mitogen and chemoattractant for human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2107-2114
87. Rantala-Ryhänen S, Ryhänen L, Nowal FV and Uitto J: Proteinases in human polymorphonuclear leukocytes. Purification and characterization of an enzyme which cleaves denatured collagen and a synthetic peptide with a Gly-Ile sequence. *Eur. J. Biochem.* 1983;134, 129-137.



88. Rasmussen LH, Garbarsch C, Chemnitz J, Christensen BC, Lorenzen I: Injury and repair of smaller muscular and elastic arteries. *Virchows Archiv [A]* 1989;415:579-585
89. Roger VL, Weston AS and Killian JM: Time trends in the prevalence of atherosclerosis: a population-based autopsy study. *Am J Med.* 2001;110:267-273
90. Rowsell S, Hawtin P, Minshull CA, Jepson H, Brockbank SMV, Barratt DG, Slater AM, McPheat WL, Waterson D, Henney AM and Pauptit RA: Crystal structure of human MMP-9 in complex with a reverse hydroxamate inhibitor. *J. Mol. Biol.* 2002;319, 173-181.
91. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shingawa A, Yamamoto E, Seiki M: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature.* 1994;370:61-65
92. Schwartz RS, Holmes DR, Topol EJ: The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol.* 1992;20:1284-1293
93. Schwartz RS, Topol EJ, Serruys PW, Sangiorgi G, Holmes DRJ: Artery size, neointima, and remodeling: time for some standards. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:2087-2094
94. Sellers A, Reynolds JJ and Meikle MC: Neutral metallo-proteinases of rabbit bone. Separation in latent forms of distinct enzymes that when activated degrade collagen, gelatin and proteoglycans. *Biochem J.* 1978;171,493-496.
95. Serruys PW, Kutryk MJ, Ong AT; Coronary artery stents. *N Engl J Med.* 2006;354:483-95
96. Silverstein RL, Leung LL, Harpel PC, Nachman RL: Complex formation of platelet thrombospondin with plasminogen. Modulation of activation by tissue activator. *J Clin Invest* 1984;74:1625-1633
97. Sopata I and Danczewicz AM: Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1974;370, 510-523.
98. Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC et al.: Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation.* 2001;2007-2011
99. Sperti G, van Leeuwen RTJ, Quax PHA, Maseri A, Kluft C: Cultured rat aortic vascular smooth muscle cells digest naturally produced extracellular matrix: involvement of plasminogendependent and plasminogen-independent pathways. *Circ Res.* 1992;71:385-392
100. Strauss BH, Chisholm RJ, Keeley FW, Gotlieb AI, Logan RA, Armstrong PW: Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. *Circ Res.* 1994;75:650-658
101. Taubman MB, Fallon JT, Schechter AD, Giesen P, Mendlowitz M, Fyfe BS, Marmor JD, Nemerson Y: Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1997;78:200-204
102. Thompson RW, Parks WC: Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Ann NY Acad Sci.* 1996;800:157-174
103. Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA: Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 1990;10:966-990
104. Tuszynski GP, Nicosia RF: The role of thrombospondin-1 in tumor progression and angiogenesis. *Bioessays* 1996;18:71-76
105. Webb KE, Henney AM, Anglin S, Humphries SE and McEwan JR: Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in the rat carotid artery after balloon injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1997;17:1837-1844

106. Werb Z: Proteinases and matrix degradation. In: Textbook of rheumatology, edited by Kelly WN, Harris ED, Ruddy S Jr and Sledge CB. WB Saunders, Philadelphia pp. 300-321
107. Wiegman PJ, Barry WL, McPherson JA, McNamara CA, Gimple LW, Sanders JM, Bishop GG, Powers ER, Ragosta M, Owens GK, Sarembock IJ.: All-trans retinoic acid limits restenosis after balloon angioplasty in the focally atherosclerotic rabbit: a favorable effect on vessel remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jan;20(1):89-95
108. Wight T, Raugi GJ, Mumby SM, Bornstein P: Light microscopic immunolocalization of thrombospondin secretion in human tissues. *J Histochem Cytochem* 1984;33:280-288
109. Wight TN, Kinsella MG, Qwarnström EE: The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Current Opinion in Cell Biology* 1992;4:793-801
110. Wight TN: Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis* 1989;9:1-20
111. Wight TN: The extracellular matrix and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1995;6:326-334
112. Wight TN: The vascular extracellular matrix, in Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds): *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Hagerstown, Lippincott-Raven, 1996
113. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA and Goldberg GI: SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.* 1989;264, 17213-17221.
114. Zempo N, Kenagy RD, Au YPT, Bendeck M, Clowes MM, Reidy MA and Clowes AW: Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery. *Vasc Surg.* 1994;20:209-217
115. Zempo N, Koyama N, Kenagy RD, Lea HJ and Clowes AW: Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Bio.* 1996;16:28-33

## 8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. L. Seipel und Herrn Prof. K.R. Karsch begonnen und unter der Leitung von Herrn Prof. M.P. Gawaz in der Abteilung für Kardiologie der Medizinischen Universitätsklinik in Tübingen beendet.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. D.I. Siegel-Axel für die Überlassung des interessanten Themas und Herrn Prof. Dr. R. Riessen, der sich freundlicherweise bereit erklärte, diese Arbeit als Doktorvater weiter zu betreuen nach dem Weggang von Herrn Prof. Dr. K.R. Karsch. Zusätzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H.D. Becker und Herrn Prof. Dr. R. Viebahn, Allgemeinchirurgie, für die Überlassung des humanen Ausgangsmaterials nach Transplantationen und bei Frau Runge für die freundliche Einführung in die Methoden und unermüdliche fachliche sowie moralische Unterstützung bedanken.

Auch danke ich meiner Familie, meinen Eltern und meiner Schwester Iris sowie Stephan, für die nie endende Motivation.

Tübingen, im Januar 2008

## 9 Lebenslauf

Name	Jasmin Dittmann
02.05.1973	Geboren in Sindelfingen, Baden-Württemberg als erstes Kind des kaufmännisch Angestellten Horst Detlef Dittmann und seiner Frau Bärbel Dittmann, geb. Tippelt
1980-1993	Grundschule und Goldberg-Gymnasium Sindelfingen
1993	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
10/93 – 11/00	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
03/96	Erfolgreiches Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung
03/97	Erfolgreiches Ablegen des 1. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung Famulaturen in der unfallchirurgischen Abteilung des Krankenhauses in Westerwald, Sylt, in der Abteilung für Kinderheilkunde in Roseau, Dominica, in der Medizinischen Klinik Tübingen und in der anästhesiologischen Gemeinschaftspraxis Drs. Palesch, Zug und Spitzer
09/99	Erfolgreiches Ablegen des 2. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung in Tübingen
10/99 – 08/00	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Tübingen mit Wahlfach Anästhesie
15.11.00	Erfolgreiches Ablegen des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung in Tübingen
12/00 – 05/02	Ärztin im Praktikum in der Allgemein Chirurgie am Universitätsklinikum Tübingen
06/02 – 02/08	Assistenzärztin in der Allgemein Chirurgie am Universitätsklinikum Tübingen
Seit 01.03.2008	Assistenzärztin in der Allgemein Chirurgie am Marienhospital Stuttgart