

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Peter C. Weber

**Vergleichende Untersuchung der Wirkung verschiedener HMG-CoA
Reduktase Inhibitoren auf die Apoptose normaler und neointimaler
Gefäßmuskelzellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt
von Mihail Hristov
aus Lovetsch, Bulgarien
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Peter C. Weber
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. F. Krombach Priv. Doz. Dr. K. Parhofer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. biol. hum. Wolfgang Erl
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. Klaus Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	06.11.2003

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	6
1. Einleitung	9
2. Stand der Forschung	11
2.1. Apoptose	11
2.2. Glatte Gefäßmuskelzellen und Neointimabildung	14
2.3. Inhibitoren der HMG-CoA Reduktase (Statine)	15
2.4. Fragestellung	18
3. Material und Methoden	19
Allgemeines	19
Liste der Chemikalien, Reagenzien, Antikörper, Medien, Lösungen und Kits	19
3.1. Statine	21
3.2. Gewinnung und Kultur glatter Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima	21
3.3. Bestimmung der Zellvitalität	22
3.4. Durchflußzytometrie	23
3.5. Apoptosedetektion durch Annexin-V Färbung und Caspase-3 Aktivitätsbestimmung	23
3.6. TUNEL Färbung	24
3.7. DNS Zellzyklusanalyse	25
3.8. Kokultur zwischen Media und Neointima glatter Gefäßmuskelzellen	25
3.9. Bestimmung der Expression pro- und antiapoptotischer Proteine in glatten Gefäßmuskelzellen	25
3.10. Proteinextrakte und Western Blot	26
3.11. Statistische Auswertung	26

4. Ergebnisse	27
4.1. Charakterisierung glatter Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima	27
4.2. Lovastatin reduziert die mitochondriale Aktivität und die Zell- vitalität in glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima	28
4.3. Lovastatin induziert Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen der Media und Neointima	31
4.3.1. Annexin-V Bindung	31
4.3.2. Caspase-3 Aktivität	33
4.3.3. DNS Fragmentierung	33
4.3.4. DNS Zellzyklusanalyse	36
4.4. Die lipophilen Statine, aber nicht das hydrophile Pravastatin, reduzieren die mitochondriale Aktivität und induzieren Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima	39
4.5. Glatte Gefäßmuskelzellen aus der Neointima sind empfindlicher auf die Induktion von Zelltod durch Statine im Vergleich zu Media Zellen	41
4.6. Die Neointima Muskelzellen zeigen eine niedrigere Expression von <i>Bax</i> und <i>cIAP-1</i> im Vergleich zu den Media Zellen	43
5. Diskussion	45
5.1. Methodendiskussion	45
5.1.1. Unterschiede zwischen glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima	45
5.1.2. Media und Neointima glatter Gefäßmuskelzellen als Zellkulturmodell <i>in vitro</i>	45
5.1.3. Bestimmung der Zellvitalität	46
5.1.4. Messungen zur Apoptosedetektion	47
5.1.5. Durchflußzytometrie	47
5.2. Ergebnisdiskussion	47
6. Zusammenfassung	53

7. Literaturverzeichnis	55
8. Eigene Publikationen	62
9. Danksagung	63
Lebenslauf	64

Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

A). Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP-1	Aktivierungsprotein-1
APS	Adenosine 5'-Phosphosulfat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	<i>Desoxy ribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin Tetraacetat
FACScan	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FasL	Fas Ligand
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
FL	Fluoreszenz
FLU	Fluvastatin
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HMG-CoA	3-Hydroxy, 3-Methylglutaryl Coenzym A
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis proteins</i>
KON	Kontrolle
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
log	Logarithmus
LOV	Lovastatin
M	Mol
min	Minute(n)
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MTT	Methylthiazoletetrazolium
NF-kB	Nuklear Faktor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphatgepufferte isotone Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PRA	Pravastatin
PS	Phosphatidylserin
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>

SIM	Simvastatin
T-25, T-75	Zellkulturflasche mit 25 cm ² und 75 cm ² Wachstumsfläche
TBS	Tris- gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase nick and labeling</i>
U	Einheit (<i>Unit</i>)
α -SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>

B). Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abb. 1.	Schema typischer Apoptosemerkmale	13
Abb. 2.	Pleiotrope Effekte der HMG-CoA Reduktase Inhibitoren	16
Abb. 3.	Chemische Strukturen von 6 Vertretern der HMG-CoA Reduktase Inhibitoren (Statine) die zur Zeit Anwendung in der klinischen Praxis finden/fanden	17
Abb. 4.	Durchflußzytometrische Analyse der Expression des für Muskelzellen typischen Proteins <i>α-smooth muscle actin</i> in Media und Neointima Zellen	27
Abb. 5.	Effekt unterschiedlicher Konzentrationen von Lovastatin auf die MTT Aktivität in Media und Neointima glatter Gefäßmuskelzellen	29
Abb. 6.	Effekt von 40 μ M Lovastatin auf die Gesamtzellzahl und auf die Zahl Trypanblau positiver Muskelzellen aus Media und Neointima	30
Abb. 7.	Behandlung mit 20 μ M Lovastatin erhöht die Bindung von Annexin-V in glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima	32
Abb. 8.	Caspase-3 Aktivität und TUNEL Färbung nach Behandlung mit 20 μ M Lovastatin	34
Abb. 9.	Caspase-3 Aktivität und TUNEL Färbung in glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima nach Behandlung mit 20 μ M Lovastatin	35
Abb. 10.	DNS Zellzyklusanalyse in glatten Gefäßmuskelzellen der Media und Neointima nach Behandlung mit 10 oder 20 μ M Lovastatin	37

Abb. 11.	Reduktion der MTT Aktivität in glatten Gefäßmuskelzellen der Media und Neointima unter der Wirkung verschiedener Statine	39
Abb. 12.	Apoptoseinduktion in glatten Gefäßmuskelzellen der Media und Neointima unter der Wirkung verschiedener Statine	40
Abb. 13.	Lovastatin induziert Zelltod hauptsächlich in den Neointima Zellen	42
Abb. 14.	Durchflußzytometrische Analyse der Expression proapoptotischer (<i>Bax</i>) und antiapoptotischer (<i>Bcl_{XL}</i> , <i>cIAP-1</i> , <i>cIAP-2</i>) Proteine in Media und Neointima Muskelzellen	43
Abb. 15.	Western Blot Analyse der Expression des antiapoptotischen Proteins <i>cIAP-1</i> in Media und Neointima Muskelzellen	44
Abb. 16.	Schematische Darstellung pro- und antiapoptotischer Verhältnisse in glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima	50
Abb. 17.	Schema möglicher zusätzlicher Statineffekte	54
C). Tabellenverzeichnis		
Tabelle 1.	DNS Zellzyklusanalyse glatter Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima	36

1. EINLEITUNG

Die Arteriosklerose ist eine generalisierte Erkrankung der Gefäßwand, die durch endotheliale Verletzung bzw. Dysfunktion, Entzündung und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie Lipoproteineinlagerung und Schaumzellbildung charakterisiert ist (49). Dabei bilden sich im Laufe der Zeit atherosklerotische Plaques, die die Blutgefäße einengen können. Fortgeschrittene Plaques bestehen aus einer fibrösen Deckplatte und aus einem Lipidkern, der hauptsächlich Entzündungszellen und Cholesterinester enthält. Diese pathologischen Verdickungen der Gefäßwand können als stabile Plaques allmählich zu einer langzeitigen Verminderung des Blutstroms führen. Solche Plaques besitzen eine relativ dicke fibröse Deckplatte und einen kleinen Lipidkern, der wenig Entzündungszellen enthält (39). Im Laufe der Zeit kann dabei eine kolaterale kompensatorische Durchblutung entstehen. Die Gefahr ausgedehnter Infarkte ist eher gering. Im Unterschied dazu gibt es auch instabile, „weiche“ Plaques, deren fibröse Deckplatte relativ dünn ist und leicht rupturieren kann. Diese Plaques haben weiterhin einen großen, zahlreiche Entzündungszellen enthaltenden Lipidkern. Bei einer Plaqueruptur kommt es zur Aktivierung von Plättchen, zur Thrombusbildung und letztendlich zu einem subtotalen oder totalen thrombotischen Verschluss des betroffenen Gefäßes. Das Ergebnis ist eine akute Ischämie des distal liegenden Gewebes. Die klinische Manifestation äußert sich z.B. durch einen Schlaganfall oder einen Myokardinfarkt.

Der Myokardinfarkt ist eine der häufigsten Todesursachen in westlichen Industrienationen. Nach einem überlebten Myokardinfarkt ist die Wahrscheinlichkeit für einen zweiten sehr hoch. Außerdem können auch Komplikationen entstehen, die zu einer dauerhaften Verschlechterung der Pumpfunktion des Herzens und damit auch der Lebensqualität führen. Deswegen ist die rechtzeitige Prävention oder Therapie solcher Prozesse von besonderer Bedeutung. Zur Zeit verfügt man über nutritive, medikamentöse oder invasive Therapiemaßnahmen. Zu den invasiven Therapiemöglichkeiten gehört die perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA), bei der mittels eines Ballonkatheters das verschlossene Herzkranzgefäß wieder eröffnet werden kann. Jährlich werden weltweit über 1,5 Millionen PTCA durchgeföhrt (2). Das größte Problem nach solch einer Manipulation besteht in der Bildung einer Restenose wöhren der ersten 3 bis 6

Monate in 30 bis 50% der behandelten Patienten (40). Zur Verhinderung solcher Restenosen wurden unterschiedliche klinische Strategien entwickelt. Zur Zeit ist die Verwendung intrakoronarer Stents besonders viel versprechend. Dabei kann aber wieder in bis zu 20% der Patienten eine in- Stent Restenose entstehen (41). Besonders gefährdet sind Diabetiker und Patienten mit langen Läsionen oder Läsionen an Gefäßverzweigungen (17,29,41). Die derzeit als sehr effektiv angewendeten Methoden zur Verhinderung dieser besonderen Art der Restenose umfassen Verbesserungen der Stentkonstruktion sowie die Beschichtung der Stents mit verschiedenen antiproliferativen Substanzen (17,26).

2. STAND DER FORSCHUNG

2.1. Apoptose

Apoptose, oder programmierter Zelltod, ist ein physiologischer Prozeß, der eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung oder bei dem Gewebsumbau durch Regulation des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Zelltod in Gefäßen und Organen des erwachsenen Menschen spielt. Der Begriff „Apoptose“ wurde zum ersten Mal im Jahr 1972 verwendet (30) zur Abgrenzung dieser spezifischen Art von Zelltod von Zelluntergängen durch Nekrose.

Typische Merkmale der Apoptose sind (24,25):

- Translokation von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran
- Aktivierung von spezifischen Proteasen, die sogenannten Caspasen, die bei Initiation und Fortgang der Apoptose eine Schlüsselrolle spielen
- Freisetzung von Cytochrom-C aus den Mitochondrien
- Kernschrumpfung mit Chromatinkondensation und enzymatischer DNS-Fragmentierung durch Endonukleasen
- Zellschrumpfung mit Zytoskelettdegradierung und Bildung apoptotischer Körperchen, die rasch von Nachbarzellen oder Phagozyten aufgenommen werden, wodurch Entzündungsreaktionen vermieden werden

Der gesamte Vorgang wird von einer Vielfalt an Transkriptionsfaktoren (z.B. *NF-kB*, *AP-1*) und pro- oder antiapoptischen Proteinen (z.B. *Bax*, *Bcl-2*, *Bcl_{XL}*, *cIAP-1*) reguliert. Obwohl die Apoptose ein physiologischer Prozeß ist und eine bedeutende Rolle für die Gewebshomöostase spielt, könnte unter pathologischen Bedingungen eine Dysregulation dieses Vorgangs auftreten. So könnte eine pathologisch dysregulierte Apoptose eine bedeutende Rolle bei der Atherosklerose, bei der Tumorbildung und Tumorprogression, sowie bei chronisch entzündlichen und degenerativen Krankheiten, aber z.B. auch beim Myokardinfarkt haben. Eine erhöhte Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen atherosklerotischer Plaques könnte z.B. zu deren Ruptur mit nachfolgenden Komplikationen führen. Andererseits trägt eine verminderte Apoptose in diesen Zellen, z.B. nach Ballonangioplastie, im Laufe der Zeit vermutlich zur Bildung einer stark proliferierenden Neointima und zur Gefäßverengung bei. Erhöhte Apoptose in Kardiomyozyten nach

Myokardinfarkt, bei Ischämie und Reperfusion des Herzmuskels wurde beobachtet (6). Deshalb ist die Untersuchung dieses Prozesses und ein besseres Verständnis dessen Regulation von besonderer Bedeutung für die Verbesserung der Kenntnisse über die Pathophysiologie und mögliche neue Therapieansätze atherosklerotischer Gefäß-erkrankungen.

Die wichtigsten Apoptosemerkmale sind in der Abb. 1 schematisch zusammengefasst.

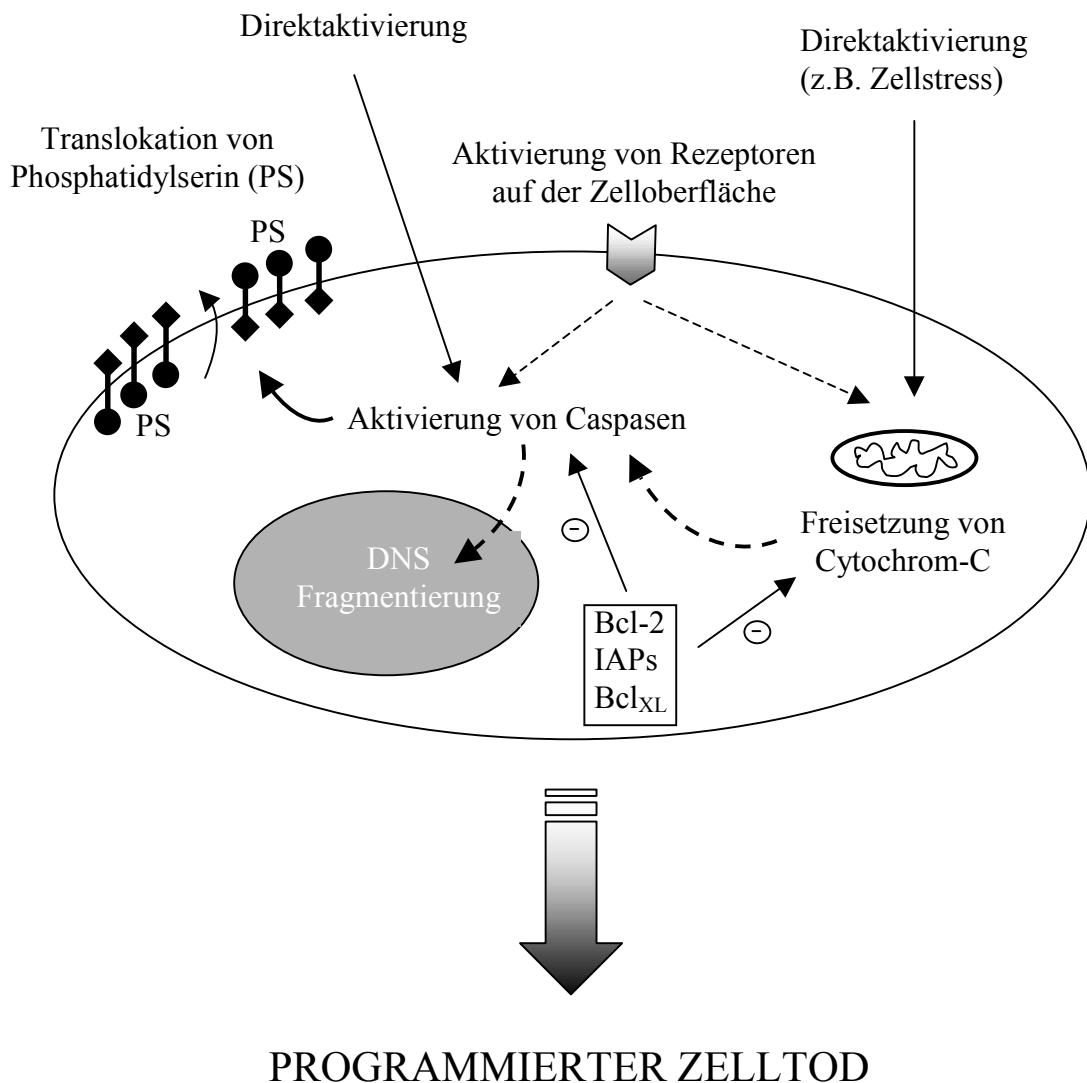


Abb. 1. Schema typischer Apoptosemerkmale.

Während der Apoptose kommt es frühzeitig zu einer Exposition von Phosphatidylserin (PS) an die Außenseite der Zellmembran. Eine Schlüsselrolle während des Apoptoseverlaufs spielt die Aktivierung der Caspasen (insbesondere der Caspase-3). Dies erfolgt direkt, nach Interaktion zwischen bestimmten Rezeptoren (z.B. *Fas*) und Liganden (z.B. *FasL*) oder nach der Freisetzung von Cytochrom-C aus den Mitochondrien. Durch Caspasen werden Endonukleasen im Zellkern aktiviert, die eine DNS-Fragmentierung verursachen. Schließlich kommt es zur Zellschrumpfung mit Zytoskelettdegradierung und Bildung apoptotischer Körperchen. Die Apoptose kann durch antiapoptotische Proteine (z.B. *Bcl-2*, *IAPs* oder *Bcl_{XL}*) limitiert werden.

2.2. Glatte Gefäßmuskelzellen und Neointimabildung

Die glatten Gefäßmuskelzellen bilden die mittlere Gefäßwandschicht, die Media, und spielen eine bedeutende physiologische Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus. Unter pathologischen Umständen (z.B. endotheliale Verletzung und Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten und Monozyten) ist die unerwünschte Migration dieser Zellen aus der Media in die Intima und deren anschließende Proliferation in der Intima Voraussetzung für die Entstehung atherosklerotischer Plaques (12,49). Weiterhin sind die glatten Muskelzellen von Bedeutung für die Stabilisierung der fibrösen Deckplatte atherosklerotischer Plaques (z.B. durch Produktion von Kollagen). Andererseits ist die unkontrollierte Migration und Proliferation glatter Muskelzellen Voraussetzung für die Entstehung der Neointima nach Ballonangioplastie, was zu einer Restenose der Läsion führen kann (52). Dabei sind folgende pathologische Mechanismen von Bedeutung: endotheliale bzw. subendotheliale Verletzung durch den Ballonkatheter, nachfolgende Aktivierung von Thrombozyten und Makrophagen mit Thrombusbildung und letztendlich eine begünstigte Proliferation glatter Muskelzellen, die eine Neointimahyperplasia verursacht (12,51). Gleichzeitig damit kommt es zusätzlich zu einer „Dedifferenzierung“ der glatten Gefäßmuskelzellen, die ihren kontraktiven Phänotyp verlieren und einen synthetischen Phänotyp ausbilden (29). Dies führt zu einem fortlaufenden Gefäßwandumbau mit erneuter Verengung des Gefäßlumens. Besonders kritisch sind die ersten vier Wochen nach der Ballonangioplastie, wenn das beschädigte Endothel noch nicht regeneriert ist (18). Dies ist eine Voraussetzung für Thrombusbildung und erhöhte Migration/Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen aus der Media. Die entstandene Neointima besteht hauptsächlich aus glatten Muskelzellen und aus extrazellulärer Matrix.

2.3. Inhibitoren der HMG-CoA Reduktase (Statine)

Die HMG-CoA Reduktasehemmer (Statine) sind wirksame Medikamente bei der Primär- und Sekundärprävention der koronaren Herzkrankheit, die das kardiovaskuläre Risiko signifikant reduzieren (48,56). Der Haupteffekt der Statine besteht in der Inhibierung des Schlüsselenzyms, der 3-Hydroxy, 3-Methylglutaryl Coenzym A (HMG-CoA) Reduktase in der Cholesterinsynthese wonach es durch hepatische LDL- Rezeptorhochregulierung zu einer Senkung des LDL-Cholesterins im Blut kommt (21). Gleichzeitig beobachtet man auch eine Senkung der Triglyzeride und eine Anhebung des HDL- Cholesterins. Entscheidend für die klinische Wirkung der Statine ist offensichtlich jedoch nicht nur diese Beeinflussung des Lipidprofils.

Ähnlich bedeutend könnten die sogenannten pleiotropen oder gefäßwandgerichteten Wirkmechanismen sein, die direkt in die Plaquentwicklung eingreifen und letztendlich zur Plaquestabilisierung führen (38) (Abb. 2). Die wichtigsten pleiotropen Eigenschaften der Statine sind:

- Antientzündliche Wirkungen (z.B. Inhibierung von Matrix Metalloproteinasen und von *NF-kB*, Senkung des C-reaktiven Proteins im Blut) (9,46,58).
- Antiproliferative Wirkung (z.B. Inhibierung der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen) (20,35,57,68).
- Antithrombotische Wirkung (z.B. Inhibierung der Expression von Tissue Faktor und von Plasminogen Aktivator Inhibitor in Endothelzellen) (16,37,53,66).
- Stabilisierung der fibrösen Deckplatte atherosklerotischer Plaques (z.B. durch Erhöhung des Kollagengehaltes und Inhibierung der Matrix Metalloproteinasen) (4,9,20).
- Steigerung der NO- Produktion und damit Verbesserung der endothelialen Funktion (34,43).
- Senkung des Makrophagengehaltes in den Plaques und der Cholesterinesteransammlung in Makrophagen und der Gefäßwand (38,39).
- Inhibierung der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen und Monozyten (43,59,63,69).

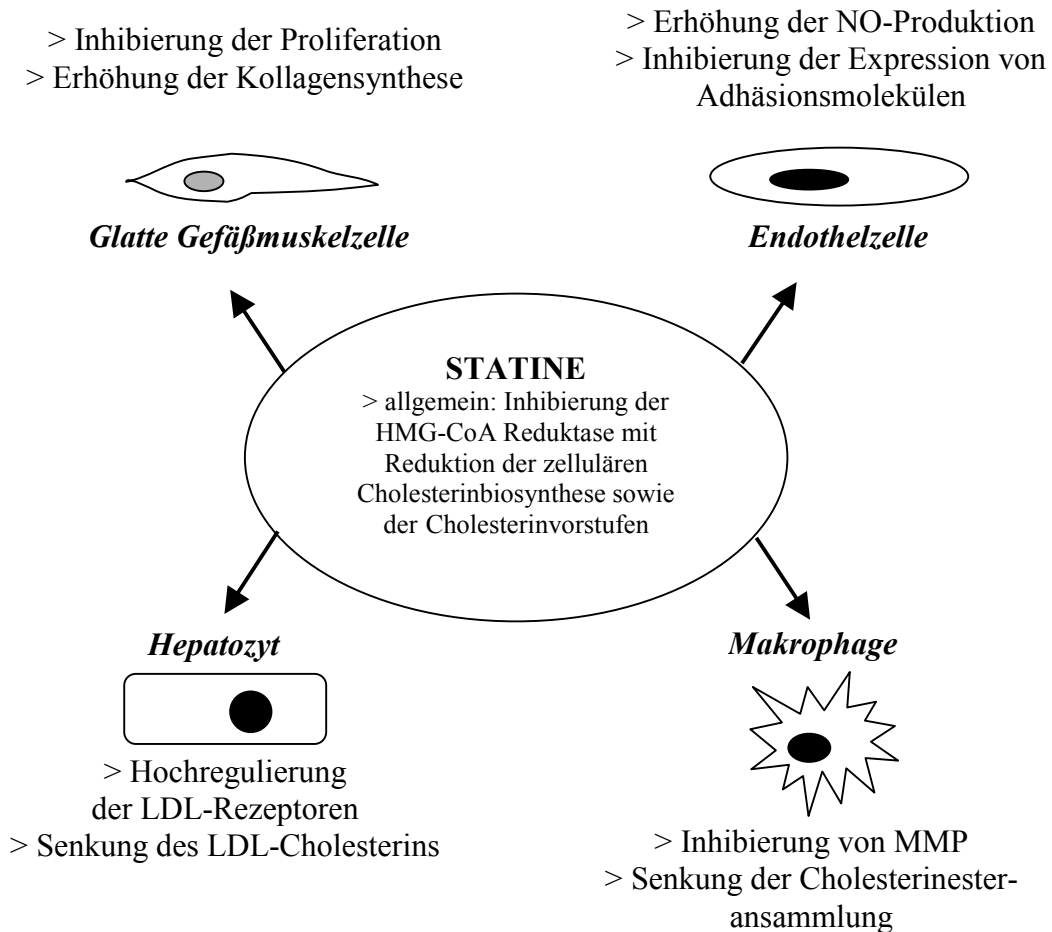


Abb. 2. Pleiotrope Effekte der HMG-CoA Reduktase Inhibitoren.

Der Haupteffekt der Statine besteht in der Inhibierung des Schlüsselenzyms, der 3-Hydroxy, 3-Methylglutaryl Coenzym A Reduktase (HMG-CoA Reduktase) in der Cholesterinsynthese. Danach kommt es zu einer LDL- Rezeptorhochregulierung in den Hepatozyten und schließlich zu einer Senkung des LDL- Cholesterins im Blut. Gleichzeitig damit sind von besonderer Bedeutung die s.g. pleiotropen Effekte, die auf verschiedene Weise in die Plaquentwicklung eingreifen und letztendlich zur Stabilisierung atherosklerotischer Plaques, bzw. zur Reduktion des kardiovaskulären Risiko führen. Die wichtigsten dieser Effekte sind für glatte Gefäßmuskulzellen, Endothelzellen und Makrophagen dargestellt.

LDL, *Low density lipoprotein*; MMP, Matrix Metalloproteinasen; NO, Stickstoffmonoxid

Abgebildet sind die Strukturen von 6 Vertretern der Statingruppe (Abb. 3). Pravastatin ist hydrophil, alle anderen Statine sind lipophil.

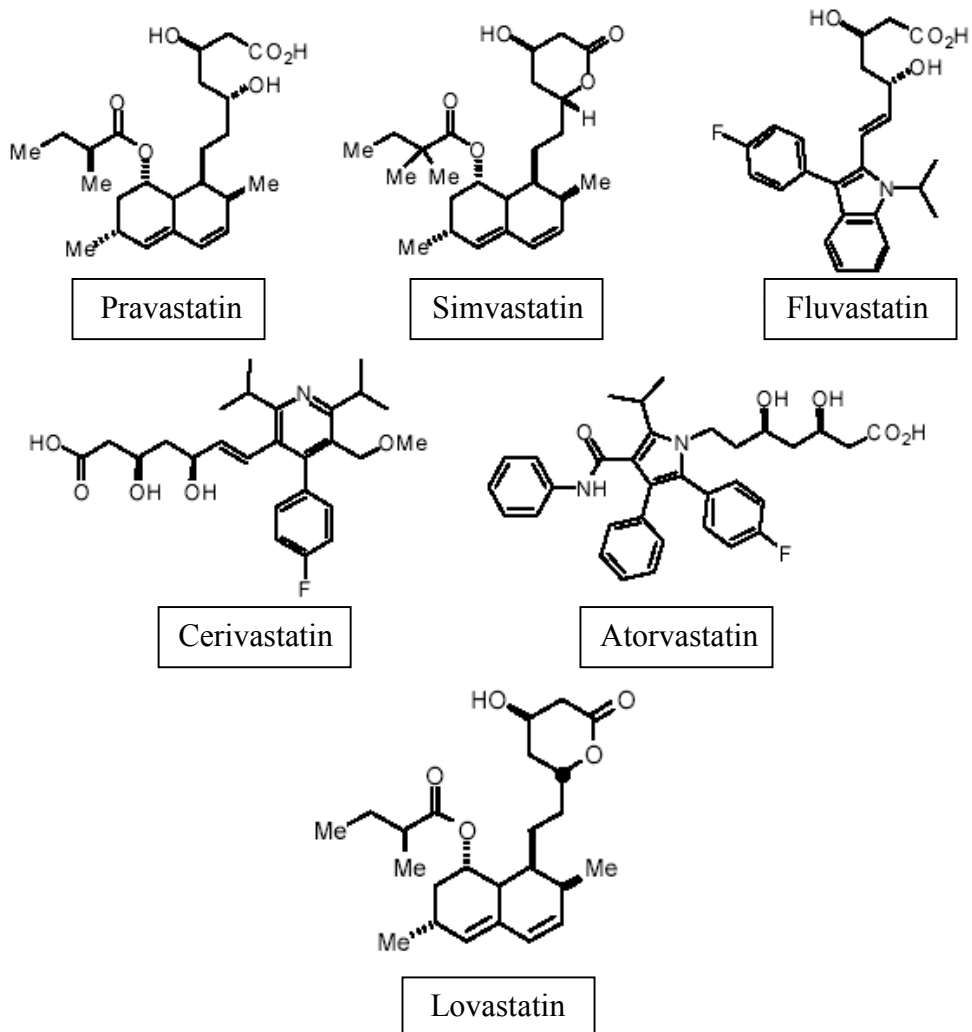


Abb. 3. Chemische Strukturen von 6 Vertretern der HMG-CoA Reduktase Inhibitoren (Statine) die zur Zeit Anwendung in der klinischen Praxis finden/fanden (Cerivastatin). Me, Methylgruppe (-CH₃).

2.4. Fragestellung

Sowohl für die Inhibierung der Apoptose zur Plaquestabilisierung, wie auch für eine selektive Induktion von Apoptose in Zellen der Neointima zur Restenoseprävention ist ein besseres Verständnis der Apoptoseregulation in glatten Gefäßmuskelzellen erforderlich. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Apoptoseregulation in Media und Neointima Zellen näher untersucht werden. Diesbezügliche neue Erkenntnisse könnten dazu beitragen, neue Therapieansätze für die Plaquestabilisierung oder Restenoseprävention zu entwickeln.

Bei der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen spielen verschiedene Zwischenprodukte der Cholesterinsynthese offenbar eine bedeutende Rolle (47). Eine Inhibierung der HMG-CoA Reduktase durch Statine reduziert die Migration und die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (20,35,57,68). Weiterhin induzieren die HMG-CoA Reduktase Hemmer *in vitro* Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen aus der Media (3,22,31,57). Dabei wurden die Statine in einem breiten Konzentrationsbereich bis zu 100 μ M verwendet. Bemerkenswerterweise basieren die Studien über Behandlung glatter Gefäßmuskelzellen mit Statinen auf Versuchen mit Media Zellen aus normalen Gefäßen. Diese Zellen werden *in vitro* unter serumhaltigen Bedingungen kultiviert und untersucht. Im normalen Gefäß sind aber die Media Zellen in einem nicht proliferierenden Zustand und haben keinen Kontakt mit dem Blutstrom. Die Neointima Zellen, die z.B. nach einer Ballonangioplastie entstehen können, sind dagegen dem Blutstrom ausgesetzt und durch eine rasche Proliferation charakterisiert. Die Wirkung von Statinen auf die Apoptose neointimaler Zellen *in vitro* wurde bis jetzt nicht untersucht. In diesem Zusammenhang sollten in der folgenden Arbeit zuerst die beiden unterschiedlichen Typen glatter Gefäßmuskelzellen unter Zellkulturbedingungen charakterisiert und verglichen werden. Weiterhin sollte die durch Statine induzierte Apoptose in diesen Zellen unter serumhaltigen und serumfreien Bedingungen untersucht werden. Dabei interessieren uns vor allem mögliche Unterschiede in der Apoptosesensitivität zwischen den beiden Zellarten. Von besonderer Bedeutung ist die Untersuchung der Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen der Neointima, da diese Zellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Restenose nach Ballonangioplastie spielen. Schließlich sollten mögliche Ursachen und Mechanismen eventueller Unterschiede in der Apoptosesensitivität zwischen glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima aufgeklärt werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

Allgemeines

Alle Medien sind von Gibco™ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany), die Zellkulturplatten und Zellkultureinsätze- von Nunc (Wiesbaden, Germany) und das fötale Kälberserum (FKS)- von Sigma (Taufkirchen, Germany). Für die durchflußzytometrischen Analysen wurden alle Antikörper in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ und 1% FKS verdünnt. Beim Western Blot wurden die Antikörper in Milch verdünnt, die in trisgepufferter Kochsalzlösung (TBS) gelöst war.

Chemikalien und Reagenzien

1-Butanol	Fluka
Acrylamid	Sigma
Annexin-V-FITC	PharMingen
Aprotinin	Sigma
APS	Sigma
Benzamidin	Sigma
DMSO	Sigma
DTT	Sigma
EDTA	Sigma
Ethanol	Sigma
Formaldehyd	Sigma
Glycerol	Fluka
Glycin	Carl Roth
HEPES	Sigma
Isopropanol	Fluka
Leupeptin	Sigma
Methanol	Fluka
Mevalonat	Sigma
MgCl_2	Fluka
MTT	Sigma
NaCl	Merck
Pepstatin	Sigma
PMSF	Sigma
pNPP	Sigma
Propidiumjodid	Sigma
Salzsäure	Fluka
Saponin	Sigma
SDS	Bio-Rad
Sodium Orthovanadat	Sigma
TEMED	Bio-Rad
Tris	Biomol

Triton X-100		Fluka
Tween 20		Sigma
β -Glycerophosphat		Sigma
Antikörper (AK)		
Primäre AK:		
anti-Bax		Santa Cruz
anti-Bcl _{XL}		Santa Cruz
anti-Caspase-3		Pharmingen
anti-cIAP-1		Santa Cruz
anti-cIAP-2		Santa Cruz
anti- α -smooth muscle actin		DAKO
anti- β -Aktin		Sigma
Sekundäre AK:		
anti-Maus F(ab) ₂ -FITC		Santa Cruz
anti-Maus-HRP		Amersham
anti-Kaninchen IgG-FITC		Santa Cruz
anti-Kaninchen-HRP		Santa Cruz
Medien und Lösungen		
Annexin-V Lösung	Annexin-V-FITC (1:400) 1% FKS PBS mit 1,5 mM Ca ²⁺	
DMEM/F12		Gibco
FKS		Sigma
MTT- Lösung	MTT (0,5 mg/ml) 0,5% FKS DMEM/F12 phenolrotfrei	
PBS		PAA
PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺		PAA
Penicillin/Streptomycin	10 000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	Sigma
PI- Lösung	10 μ g/ml DNSase- freie RNSase 0,1% Triton-X 100 20 μ g/ml PI in PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺	
Running Buffer (10X)	32,1 g/l Tris 144 g/l Glycin 10 g/l SDS	

TBS	10 ml 1M Tris 33 ml 5M NaCl auf 1000 ml Wasser	
TBS- Milch	5% Lösung in TBS	
Transfer Buffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin auf 800 ml Wasser 200 ml Methanol	
Trypanblau Lösung (0,4%)		Sigma
Trypsin/EDTA Lösung (1X)		Sigma
Kits		
<i>Bio-Rad_{DC} Protein Assay Kit</i>		Bio-Rad
<i>Chemiluminescence Luminol Reagent</i>		Santa Cruz
<i>Fluorescein In Situ Cell Death Detection Kit</i>		Roche

3.1. Statine

Die Statine wurden von den folgenden Firmen zur Verfügung gestellt: Lovastatin und Simvastatin- von *MSD Sharp & Dohme GmbH* (Haar, Germany), Fluvastatin- von *Novartis Pharma AG* (Basel, Switzerland) und Pravastatin- von *Bristol-Myers-Squibb* (Wallinford, CT, USA). Die lipophilen Lovastatin, Simvastatin und Fluvastatin wurden in Dimethyl Sulfoxide (DMSO) und das hydrophile Pravastatin- in PBS gelöst. Die Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt und unmittelbar vor Verwendung aufgetaut. Die Endkonzentration von DMSO auf den Zellen war maximal 0,1%.

3.2. Gewinnung und Kultur glatter Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden von 6 Wochen alten männlichen *Sprague-Dawley* Ratten isoliert. Die Media Zellen stammen aus der thorakalen Aorta und die Neointima Zellen wurden aus dem Neointimabereich der A. Carotis zwei Wochen nach Gefäßverletzung mit einem Ballonkatheter isoliert. Die Zellen wurden in DMEM/F12 Medium mit Zugabe von 10% FKS , 50 U/ml Penicillin und 50 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin bei 37°C , 5% CO_2 und 90% Luftfeuchtigkeit gezüchtet. Nach 5 bis 7 Tagen wurden die Zellen passagiert und in einer Dichte von 10^4 Zellen/ cm^2 in T-75 Kolben zum Propagieren ausgesät. Alle zwei Tage wurde das alte Medium durch frisches ersetzt. Bei Vorbereitung der

Versuche wurden die Zellen in einer Dichte von $1,0 \times 10^4/\text{cm}^2$ (Media) oder $0,7 \times 10^4/\text{cm}^2$ (Neointima) in T-25 Kolben, 6- und 12-Wellplatten oder 10 cm Petrischalen ausgesät. Zellen zwischen Passage 6 und 12 wurden in allen Versuchen verwendet. Für Versuche bei serumfreien Bedingungen wurde die Serumkonzentration stufenweise reduziert: 48 h 10% FKS, 24 h 0,1% FKS, 24 h 0% FKS, Statinbehandlung für bis zu 24 h.

3.3. Bestimmung der Zellvitalität

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte über Messung der Methylthiazole-tetrazolium (MTT) Aktivität und Färbung mit Trypanblau. MTT Lösung in der Zellkultur wird zu unlöslichem Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen umgewandelt. Es besteht die Möglichkeit zum Quantifizieren der Menge des gebildeten Formazanprodukts und dadurch kann man die mitochondriale Aktivität, bzw. indirekt die Zellvitalität bestimmen.

Die Muskelzellen wurden in 24- Wellplatten für 48 h kultiviert, 24 h nach Behandlung mit verschiedenen Statinen zweimal mit PBS gewaschen und danach mit 400 μl MTT Lösung (0,5 mg/ml) im phenolrotfreien Medium mit 0,5% FKS inkubiert. Zwei Stunden nach der Inkubation, wurde die MTT Lösung dekantiert und das Formazanprodukt in den Zellen mit 200 μl Isopropanol mit Salzsäure (0,04 M) gelöst. Nach etwa 10 min, wurden 2X90 μl von jedem Well in eine 96- Wellplatte pipettiert. Die Absorption wurde bei 570 nm in SLT 400 ATX ELISA Reader gemessen. Die MTT Aktivität wurde als Prozentwert relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

Als alternativer Marker für die Bestimmung der Zellvitalität wurde die Trypanblau Färbung durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, zusammen mit den schwimmenden Zellen gesammelt, im eiskalten PBS mit 1% FKS resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau gemischt. Danach wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer Kammer im Olympus IX50 Mikroskop bei 10X Vergrößerung gezählt. Die toten Zellen nehmen den Farbstoff auf und färben sich blau. Im Gegensatz kann Trypanblau in die lebenden Zellen nicht eindringen und deshalb bleiben diese ungefärbt. Bei der Trypanblau Zählung kann man zusätzlich die Gesamtzellzahl bestimmen.

Die Bestimmung der MTT Aktivität und die Trypanblau Färbung wurde in einigen Versuchen parallel durchgeführt.

3.4. Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension aufgrund ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzeigenschaften. Vor der Messung im Durchflußzytometer werden die Zellen mit spezifischen Farbstoffen gefärbt. In unseren Versuchen fanden vor allem Verwendung Fluorescein Isothiocyanat (FITC) für Immunfluoreszenz und Propidiumjodid (PI) zur Zellzyklusanalyse, bzw. Detektion der Membranintegrität. Nach der Färbung besteht die Möglichkeit zur Auftrennung der Zellen durch ihre Fluoreszenz, Größe oder Granularität intrazellulärer Bestandteile. Zur Auswertung verwendet man die Einparameterdarstellung als Histogrammplot oder korrelierte Zweiparameterdarstellung als Punkteplot. Die Zellen werden aufgrund der Positivität oder der mittleren Fluoreszenzintensität analysiert. Im Histogrammplot kann man durch das Setzen eines Markers die Zellen in „positiv“ oder „negativ“ einteilen, und die entsprechenden Prozentwerte berechnen. Dabei wird nur eine Art der Fluoreszenz, z.B. Fluoreszenz-1 (FL-1) ausgewertet. Beim Punkteplot kann man gleichzeitig zwei Fluoreszenzen analysieren (FL-1/FL-2). Die mittlere Fluoreszenzintensität wird in Kanälen berechnet. Die Messung erfolgte in einem Durchflußzytometer (FACScan, Becton Dickinson) unter Verwendung von der *CellQuest* (Becton Dickinson) Software.

3.5. Apoptosedetektion durch Annexin-V Färbung und Caspase-3 Aktivitätsbestimmung

Annexin-V ist ein Protein, das hohe Affinität für Phosphatidylserin besitzt. Da früh während der Apoptose Phosphatidylserin von der Innenseite zu der Außenseite der Zellmembran transloziert wird, ist die Annexin-V Färbung eine klassische Methode zur Apoptosedetektion. Wichtig bei dieser Färbung ist die Verwendung eines kalziumhaltigen Puffers, da die Bindung zwischen Phosphatidylserin und Annexin-V Ca^{2+} benötigt. Gleichzeitig wird auch Gegenfärbung mit PI durchgeführt, um Nekrose auszuschließen. Apoptotische Zellen sind Annexin-V- positiv/PI- negativ, nekrotische dagegen nehmen PI auf und sind deswegen gleichzeitig positiv für Annexin-V und PI.

Zur Durchführung der Färbung wurden die schwimmenden mit den trypsinierten Zellen gemischt und in PBS mit 1,5 mM Ca^{2+} und 1% FKS resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit Annexin-V-FITC Lösung (Verdünnung 1:400 in PBS mit 1,5 mM Ca^{2+} und

1% FKS) inkubiert. Nach 30 min wurden die Zellen zweimal gewaschen, in 200 µl PBS mit 1,5 mM Ca²⁺ und 1% FKS resuspendiert und mit 5 µl PI (1 mg/ml) gefärbt. Es werden in der Regel mindestens 10 000 Zellen bei jedem Versuch analysiert und die Daten wurden mittels FL1- Histogramm- oder FL-1/FL-2 Punkteplots ausgewertet.

Ein weiteres typisches Apoptosemerkmal ist die Aktivierung von Caspase-3. Für Caspase-3 Detektion wurde Antikörper verwendet, der vor allem die aktive Form erkennt. Bei Durchführung der Färbung wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd (PFA) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und danach mit 70% Ethanol für 30 min permeabilisiert. Nach zwei Waschschritten wurden die Zellen mit dem anti-Caspase-3 Antikörper (Verdünnung 1:100) für 1 h auf Eis inkubiert, danach wieder zweimal gewaschen und mit dem sekundären FITC- gekoppelten Antikörper (1:200) für 45 min inkubiert. Schließlich wurden die Zellen wieder zweimal gewaschen und im Durchflußzytometer mittels FL-1 Histogrammplots gemessen und der Anteil positiver Zellen bestimmt. Als Kontrolle wurde Färbung mit sekundärem FITC- Antikörper (1:200) allein verwendet.

3.6. TUNEL Färbung

DNS Fragmente, die später bei der Apoptose entstehen, kann man durch Färbung der freien 3'-OH Enden mit modifizierten Nukleotiden in einer enzymatischen Reaktion identifizieren. DNS Fragmentierung wurde mit einem *Fluorescein In Situ Cell Death Detection Kit* detektiert. Die schwimmenden Zellen wurden mit den trypsinierten gesammelt, in 2% PFA fixiert und danach mit 70% Ethanol für 30 min auf Eis permeabilisiert. Die TUNEL- (*terminal deoxynucleotidyl transferase nick and labeling*) Färbung wurde nach dem Herstellerprotokoll (Roche) durchgeführt. Im Wesentlichen enthält das TUNEL- Kit zwei Lösungen: Färbe- und Enzymlösung. Die Färbelösung ist ohne das Enzym Terminaltransferase. Bei der Färbung benötigt man eine Kontrolle mit ungefärbten Zellen, eine weitere Kontrolle nur mit der Färbelösung und die TUNEL- Reaktion, wobei die Zellen mit einer Mischung beider Lösungen inkubiert werden. Danach wurden die Zellen im Durchflußzytometer gemessen und mittels FL-1 Histogrammplot ausgewertet. Als Kontrolle diente die Messung mit der Färbelösung allein.

3.7. DNS Zellzyklusanalyse

Zur Proliferationsanalyse und zur Detektion der DNS Degradierung wurde DNS Zellzyklusanalyse durchgeführt. Die Muskelzellen wurden in T-25 Kolben kultiviert, nach Statinbehandlung geerntet, in 0,5 ml PBS mit 1% FKS resuspendiert und schließlich mit 5 ml eiskaltem Methanol für 30 min fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal gewaschen und für 1 h mit PI Lösung (10 µg/ml DNSase- freie RNSase, 0,1% Triton-X 100 und 20 µg/ml PI) inkubiert. Danach wurden die Zellen im Durchflußzytometer mit Instrumenteneinstellung von *DNA Quality Control Kit* (Becton Dickinson) gemessen. Ausgewertet wurden typische Zellzyklussignale (G0/G1, S, G2/M Phase) in FL2-A Histogramm über manuelles Gating.

3.8. Kokultur glatter Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima

Die Media Zellen wurden in einer hohen Dichte von $1,0 \times 10^5$ Zellen/cm² in 6-Wellplatten ausgesät und für 24 h kultiviert. Die Neointima Zellen wurden in einer Dichte von $1,0 \times 10^4$ Zellen/cm² in 6-Wellplatten mit oder ohne Media Zellen ausgesät und auch für 24 h kultiviert. Zusätzlich wurden Neointima Zellen auf Zellkultureinsätze (Polycarbonatmembrane mit Porengröße von 3,0 µm) ausgesät, die man in 6-Wellplatten mit oder ohne Media Zellen plazierte. Alle Zellkulturen wurden mit 20 µM Lovastatin inkubiert und nach 24 h bestimmte man die Zahl schwimmender Zellen.

3.9. Bestimmung der Expression pro- und antiapoptotischer Proteine in glatten Gefäßmuskelzellen

Die Expression des proapoptotischen *Bax* und der antiapoptotischen Proteine *Bcl_{XL}*, *cIAP-1* und *cIAP-2* in glatten Gefäßmuskelzellen der Media und Neointima wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Die Muskelzellen wurden trypsiniert, mit 2% PFA fixiert und dann mit 0,1% Saponin für 10 min permeabilisiert. Nach zwei Waschsritten wurden die Zellen mit Antikörper (Verdünnung 1:100) gegen die obengenannten Proteine auf Eis inkubiert. Eine Stunde später wurden die Zellen zweimal gewaschen und mit dem sekundären FITC- markierten Antikörper (1:200) für 45 min inkubiert. Die Zellen wurden danach wieder zweimal gewaschen, im FL-1 Histogrammplot gemessen und die mittlere

Fluoreszenzintensität bestimmt. Als Kontrolle wurde Färbung mit dem sekundären FITC-Antikörper allein verwendet.

3.10. Proteinextrakte und Western Blot

Media und Neointima Zellen wurden in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser für 48 h kultiviert und danach für 24 h mit Statinen behandelt. Schwimmende und trypsinisierte Zellen von jeder Behandlung wurden gemischt, zentrifugiert (300 g, 5 min) und für 30 min auf Eis in 150 µl Zellextraktionspuffer [0,5% *Triton X-100*, 25 mM *HEPES* (pH=7,6), 300 mM *NaCl*, 10% *Glycerol*, 0,2 mM *EDTA*, 1,5 mM *MgCl₂*, 20 mM *β-Glycerophosphat*, 10 mM *p-Nitrophenylphosphat*, 0,3 mM *Sodium Orthovanadat*, 10 mM *Benzamidin*, 2 mM *DTT*, 20 µg/ml *Aprotinin*, 2,5 µg/ml *Leupeptin*, and 1,7 µg/ml *Pepstatin*] inkubiert. Membran- und DNS- Reste wurden danach durch Zentrifugation (14 000 g, 10 min) entfernt. Der Gesamtproteingehalt wurde mit *Bio-Rad_{DC} Protein Assay Kit* bestimmt und die Menge zum Auftragen auf ein 10% SDS Polyacrylamid Gel wurde auf 40 µg berechnet.

Western Blot ist eine klassische Methode zur Proteindetektion. Die Proteine werden mittels Gelelektrophorese (10% SDS Polyacrylamid Gel) nach ihrer Größe getrennt und danach auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Auf dieser Membran können die Proteine durch Antikörper detektiert werden. Die Inkubation mit dem anti-*cIAP-1* Antikörper (1:1000) erfolgte über nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran dreimal mit TBS- Tween gewaschen und mit einem zweiten *horseradish peroxidase*- markierten Antikörper (1:2000) inkubiert. Nach 45 min wurde die Membran wieder dreimal mit TBS- Tween gewaschen und mit *Chemiluminescence Luminol Reagent* für 2 min inkubiert. Nach Exposition, Entwickeln und Fixieren wurden die Proteinbanden analysiert. Als Kontrolle fürs Auftragen gleicher Proteinmengen in jeder Probe wurde zusätzlich ein Nachweis von *β-Aktin* (Verdünnung 1:5000) auf den selben Membranen durchgeführt.

3.11. Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert ± Standardabweichung von mindestens drei Versuchen dargestellt und mit Hilfe des ungepaarten *Student's t-Tests* oder *ANOVA* ausgewertet. Unterschiede mit einem *P*-Wert kleiner als 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Charakterisierung glatter Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima

Glatte Gefäßmuskelzellen aus der Neointima wachsen in der Zellkultur als eine Schicht und charakterisieren sich durch eine niedrigere Expression des typischen Muskelzellenproteins α -smooth muscle actin (α -SMA) (mittlere Fluoreszenzintensität: $165 \pm 60,2$; $n=4$) (Abb. 4). Glatte Gefäßmuskelzellen aus der Media dagegen wachsen auch übereinander, sind etwas größer und zeigen eine höhere Expression von α -SMA (mittlere Fluoreszenzintensität: $236 \pm 30,7$; $n=4$) (Abb. 4).

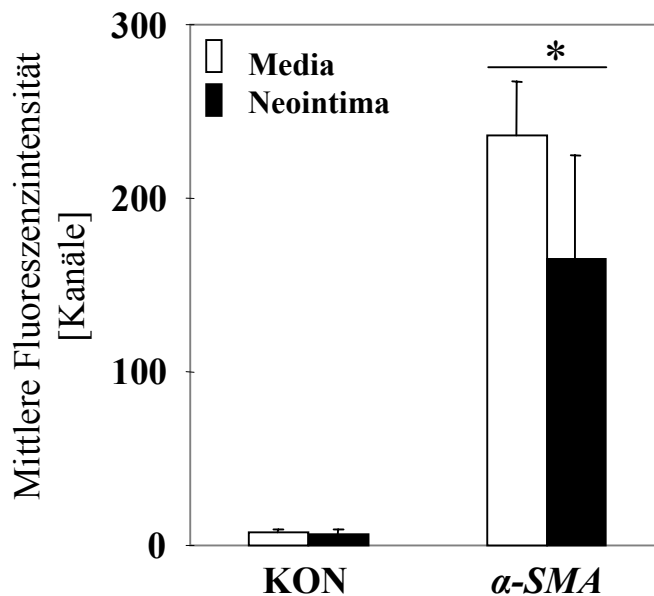


Abb. 4. Durchflußzytometrische Analyse der Expression des für Muskelzellen typischen Proteins α -smooth muscle actin (α -SMA) in Media (weiße Balken) und Neointima (schwarze Balken) Zellen.

Die mittlere Fluoreszenz wurde mit Hilfe des FL-1 Histogrammplots berechnet. Als Kontrolle (KON) wurde Färbung nur mit dem Sekundären, FITC- gefärbten Antikörper verwendet; ($n=4$, * $P<0,05$).

4.2. Lovastatin reduziert die mitochondriale Aktivität und die Zellvitalität in glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima

Die Inkubation glatter Gefäßmuskelzellen mit Lovastatin (5-40 μM) für 24 h induzierte eine konzentrationsabhängige Reduktion der MTT Aktivität, bzw. der mitochondrialen Aktivität (Abb. 5). In Medium mit 10% FKS zeigten die Media Zellen eine Reduktion der MTT Aktivität von $47,5 \pm 4,8\%$ nach Behandlung mit 40 μM LOV (Abb. 5A). Die Neointima Zellen zeigten Reduktion der MTT Aktivität von $62,9 \pm 4,5\%$. Beide Zelltypen waren weniger empfindlich auf die Lovastatin Behandlung in Medium ohne Serum (Abb. 5B). Unter diesen Bedingungen hatte nur die höchste Konzentration von 40 μM Lovastatin einen signifikanten Effekt, wobei die Neointima Zellen wieder eine stärkere Reduktion der MTT Aktivität ($68,9 \pm 13,6\%$) als die Media Zellen ($21,3 \pm 19,3\%$) zeigten. Bei gleichzeitiger Inkubation mit 400 μM Mevalonat für 24 h wurde der Effekt von 40 μM Lovastatin auf die MTT Aktivität nur in Media Zellen ($98,4 \pm 3,6\%$, $n=3$), aber nicht in Neointima Zellen ($92,9 \pm 1,7\%$, $n=3$), fast vollständig aufgehoben.

Weiterhin wurde Trypanblau Färbung durchgeführt. Nach Behandlung mit 40 μM Lovastatin wurde die Gesamtzellzahl in den beiden Zelltypen reduziert, mit $58,5 \pm 4,3\%$ in den Media Zellen und mit $72,6 \pm 4,6\%$ in den Neointima Zellen (Abb. 6A). Gleichzeitig damit beobachtete man auch einen Anstieg Trypanblau- positiver Zellen von $3,9 \pm 1,1\%$ auf $8,6 \pm 4,3\%$ in den Media Zellen und von $3,1 \pm 2,0\%$ auf $21,9 \pm 7,5\%$ in den Neointima Zellen. Unter serumfreien Bedingungen wurde keine Reduktion der Zellzahl in Media Zellen ($102,3 \pm 13,3\%$) und kein Anstieg der Trypanblau- positiven Zellen (Kontrolle $11,1 \pm 3,4\%$, Lovastatin $12,8 \pm 8,4\%$) beobachtet (Abb. 6B). Im Gegensatz dazu reagierten die Neointima Zellen mit einer Abnahme der Zellzahl ($39,9 \pm 14\%$) und mit einem deutlichen Anstieg der Trypanblau- positiven Zellen von $8,6 \pm 2,3\%$ auf $28,4 \pm 6,6\%$.

Diese Daten zeigen, dass nichtproliferierende Zellen in Medium ohne FKS weniger empfindlich auf Behandlung mit Lovastatin sind. Außerdem sind die Neointima Zellen im Vergleich zu den Media Zellen empfindlicher für die Behandlung mit Lovastatin sowohl im serumfreien, als auch im serumhaltigen Medium.

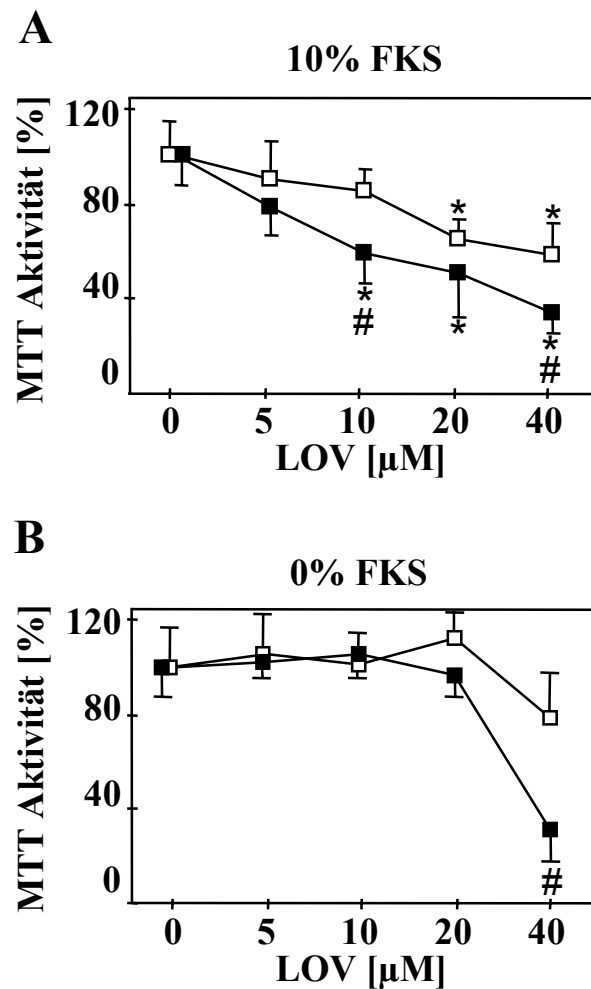


Abb. 5. Effekt unterschiedlicher Konzentrationen von Lovastatin (LOV) auf die MTT Aktivität in Media und Neointima glatter Gefäßmuskelzellen.

Die MTT Aktivität wurde als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.

A. Zellen unter normalen Kulturbedingungen (10% FKS).

B. Zellen im serumfreien Medium (0% FKS).

Weißer Quadrate symbolisieren Media Zellen, schwarze Quadrate- Neointima Zellen; (n=4;

$P < 0,05$, *t*-Test, Unterschied zwischen Media und Neointima; * $P < 0,05$, ANOVA,

Unterschied zu der entsprechenden Kontrolle). FKS, fötales Kälberserum.

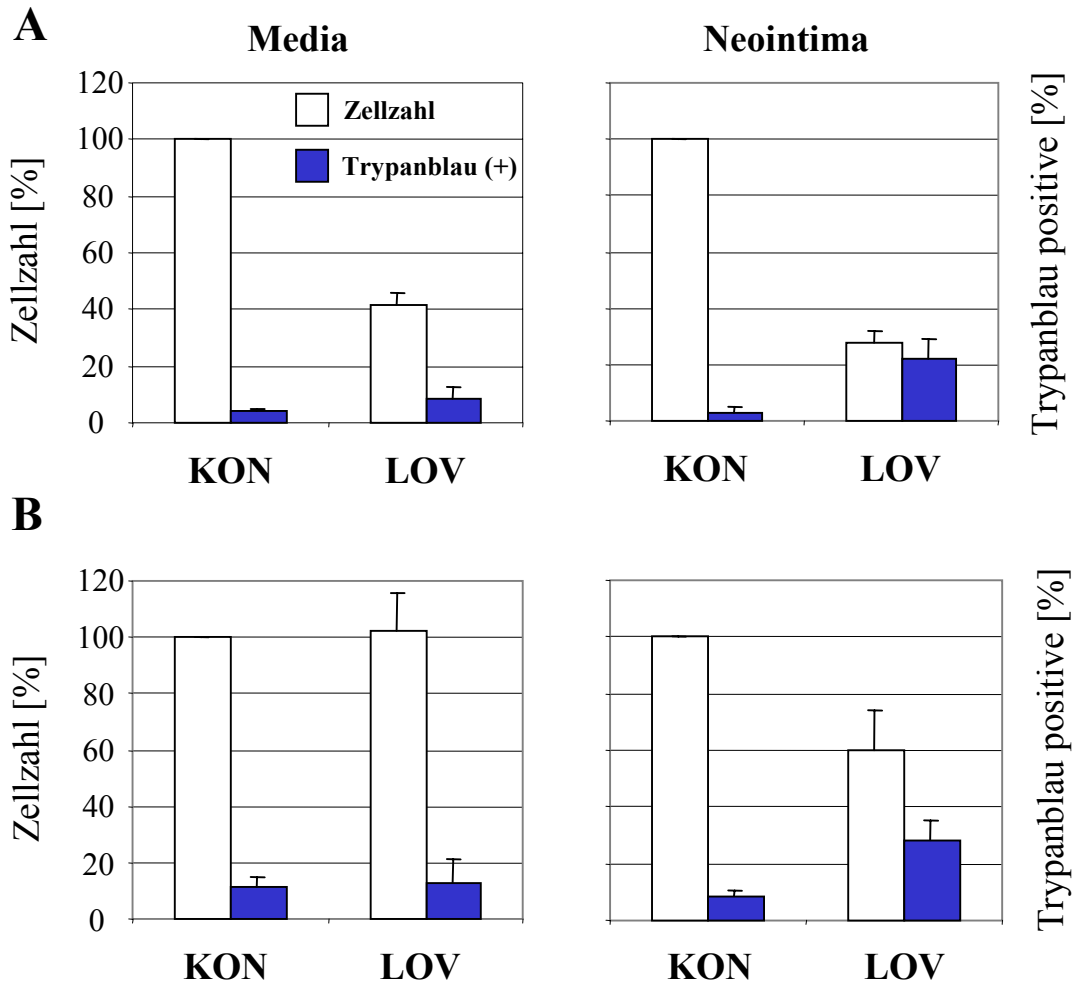


Abb. 6. Effekt von 40 μ M Lovastatin (LOV) auf die Gesamtzellzahl (weiße Balken) und auf die Zahl Trypanblau positiver (blaue Balken) Muskelzellen aus Media und Neointima.

Die Gesamtzellzahl wurde als Prozent der unbehandelten Kontrolle (KON) dargestellt.

A. Muskelzellen in 10% FKS. **B.** Muskelzellen in 0% FKS.

4.3. Lovastatin induziert Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen der Media und Neointima

Die Reduktion der Zellvitalität bzw. der Zellzahl könnte durch Apoptose bedingt sein. Um diese Hypothese zu testen wurden Messungen durchgeführt, die typisch für den Nachweis der Apoptose sind.

4.3.1. Annexin-V Bindung

Als erstes wurde die Annexin-V Bindung in PI negativen Zellen untersucht. Unbehandelte Neointima Zellen zeigten eine schwächere Bindung von Annexin-V (Abb. 7). Das könnte bedeuten, dass die Neointima Zellen im Vergleich zu Media Zellen eine niedrigere basale Apoptose haben. Nach Inkubation der Media Zellen mit 20 μM Lovastatin wurde eine zeitabhängige Zunahme der Annexin-V Bindung festgestellt und nach 24 h war die Zahl Annexin-V- positiver Zellen ungefähr 2,5- Mal höher als in der Kontrolle (Abb. 7). Die Neointima Zellen reagierten mit einer stärkeren Positivität für Annexin-V, so dass nach 24 h die Zahl Annexin-V- positiver Zellen ungefähr 5- Mal höher als in der Kontrolle war.

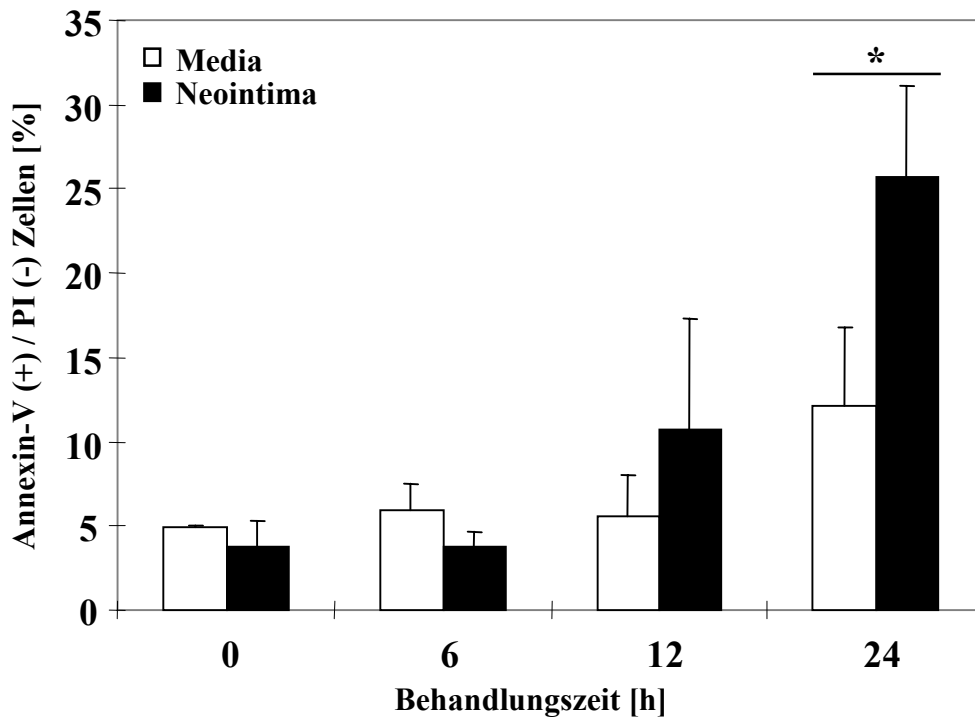


Abb. 7. Behandlung mit 20 μ M Lovastatin erhöht die Bindung von Annexin-V in glatten Gefäßmuskelzellen aus Media (weiße Balken) und Neointima (schwarze Balken). Der Prozentanteil Annexin-V- positiver/Propidiumjodid (PI)- negativer Zellen wurde mittels FL-1/ FL-2 Punkteplots berechnet und als Balkendiagramm dargestellt; (n=4, * $P < 0,05$).

4.3.2. Caspase-3 Aktivität

Zusätzlich wurde eine Bestimmung der Caspase-3 Aktivität durchgeführt. Durchflußzytometrische Messungen für aktivierte Caspase-3 haben eine gesteigerte Aktivität dieses Apoptosemarkers in Muskelzellen nach Statinbehandlung gezeigt (Abb. 8). In den Media Zellen wurde eine erhöhte Caspase-3 Aktivität nach 6 h festgestellt, aber die Inkubation mit Lovastatin für 12 h oder 24 h führte nicht zu einer weiter zunehmenden Aktivierung der Caspase-3 (Abb. 9A). Die Neointima Zellen zeigten dagegen einen kontinuierlichen Anstieg der Caspase-3 Aktivität mit einem signifikanten Unterschied gegenüber den Media Zellen nach 24 h (Abb. 9A).

4.3.3. DNS Fragmentierung

Ein typisches Merkmal in den späteren Apoptosestadien ist die DNS Fragmentierung. Um DNS Fragmente nachzuweisen, wurde TUNEL Färbung verwendet. Die Media Zellen zeigten eine relativ schwache TUNEL Färbung bzw. DNS Fragmentierung, wobei die Neointima Zellen deutlich stärker reagierten und eine exponentielle Zunahme der TUNEL-positiven Zellen nach 6-, 12- und 24 h Inkubation mit 20 µM Lovastatin zeigten (Abb. 8, 9B).

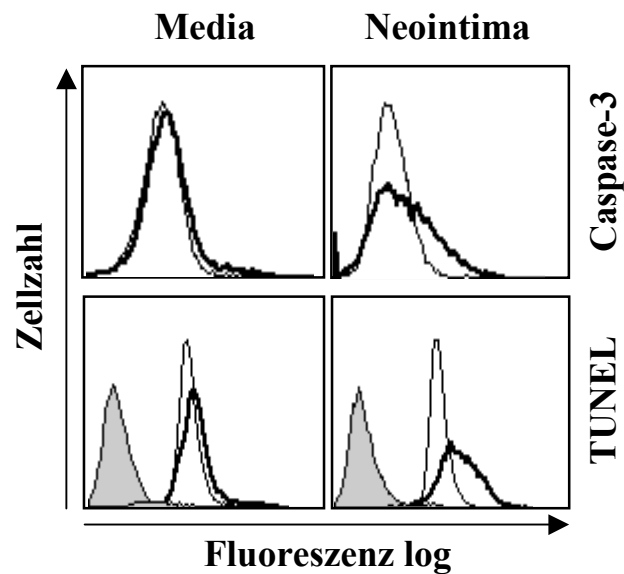
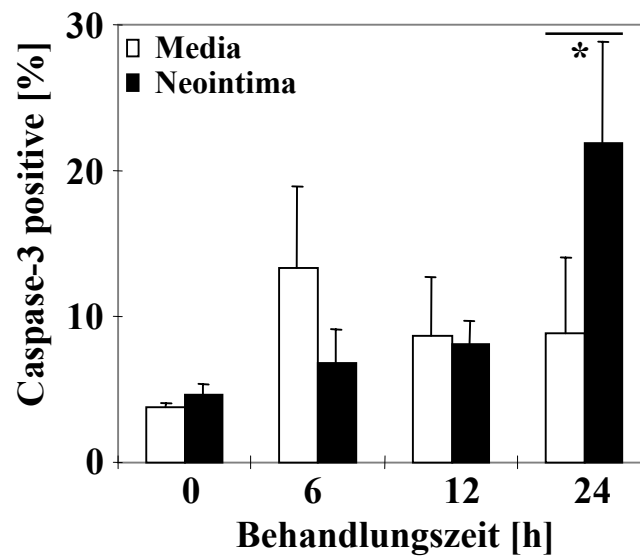


Abb. 8. Caspase-3 Aktivität und TUNEL Färbung nach Behandlung mit 20 μ M Lovastatin.

Typische Histogrammplots für Caspase-3 Aktivität (oben) und für TUNEL Reaktion (unten). Es wurde die Caspase-3 Aktivität in unbehandelten Kontrollzellen (dünne Linie) oder in Zellen nach Behandlung mit Lovastatin (dicke Linie) gezeigt. Die TUNEL Reaktion wurde in Zellen nach Statinbehandlung (dicke Linie) dargestellt. Unbehandelte Zellen (grau) und die Reaktion nur mit der Färbelösung (dünne Linie) sind auch gezeigt.

A



B

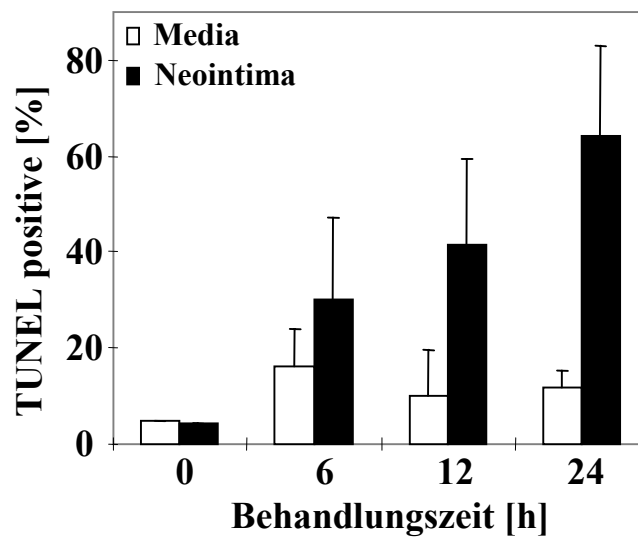


Abb. 9. Caspase-3 Aktivität und TUNEL Färbung in glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima nach Behandlung mit 20 μ M Lovastatin.

Der Prozentanteil aktiver Caspase-3- und TUNEL-positiver Zellen wurde mittels FL-1 Histogrammplots berechnet und als Balkendiagramm dargestellt.

A. Prozentanteil aktiver Caspase-3- positiver Media (weiße Balken) und Neointima (schwarze Balken) Muskelzellen; (n=3, * $P < 0,05$).

B. Prozentanteil TUNEL- positiver Media (weiße Balken) und Neointima (schwarze Balken) Muskelzellen. Als Kontrolle wurde Färbung mit der Färbelösung allein verwendet; (n=3).

4.3.4. DNS Zellzyklusanalyse

Um die Proliferationsrate in Media und Neointima Zellen zu untersuchen, wurden DNS Zellzyklusanalysen durchgeführt. Dabei zeigten die unbehandelten glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima sehr ähnliche Proliferationsraten.

	G0/G1	S	G2/M	
Media:	78,1±4,1	7,5±2,5	14,5±2,3	10% FKS
Neointima:	82,5±1,6	7,6±1,1	9,9±0,9	
Media:	87,5±2,4	4,9±1,2	7,7±1,7	0% FKS
Neointima:	88,6±0,8	5,1±1,0	6,2±0,5	

Tabelle 1. DNS Zellzyklusanalyse glatter Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima.

Ausgewertet wurden typische Zellzyklussignale (G0/G1, S, G2/M Phase) in FL2-A Histogrammplot über manuelles Gating; (n=4).

Mit der Zellzyklusanalyse kann auch die DNS Degradierung gemessen werden. In unbehandelten Zellen zeigten beide Zelltypen sehr niedrige Prozentanteile von Zellen im sub-G1 Bereich des Zellzyklus. In diesem Bereich liegen Zellen mit degradierter DNS, die in späteren Phasen der Apoptose entsteht. In unbehandelten Media Zellen wurden $0,15 \pm 0,08\%$ und in unbehandelten Neointima Zellen $0,04 \pm 0,02\%$ der Zellen im sub-G1 Bereich gefunden (Abb. 10). Dies bestätigt die bei der Annexin-V Färbung beobachtete Tendenz, dass Neointima Zellen unter normalen Kulturbedingungen einer niedrigeren basalen Apoptose unterliegen. In serumfreiem Medium wurde eine leichte Erhöhung der Zellen im sub-G1 Bereich beobachtet (Media $3,1 \pm 1,6\%$, Neointima $0,9 \pm 0,2\%$), wobei das Verhältnis zwischen Media und Neointima ähnlich war wie unter Standardkulturbedingungen. Eine Behandlung mit 10 oder 20 μM Lovastatin induzierte einen deutlichen Anstieg der Zellen im sub-G1 Bereich. Die Neointima Zellen waren wieder sensitiver im Vergleich zu Media Zellen sowohl in Medium mit 10% FKS, als auch in Medium ohne FKS.

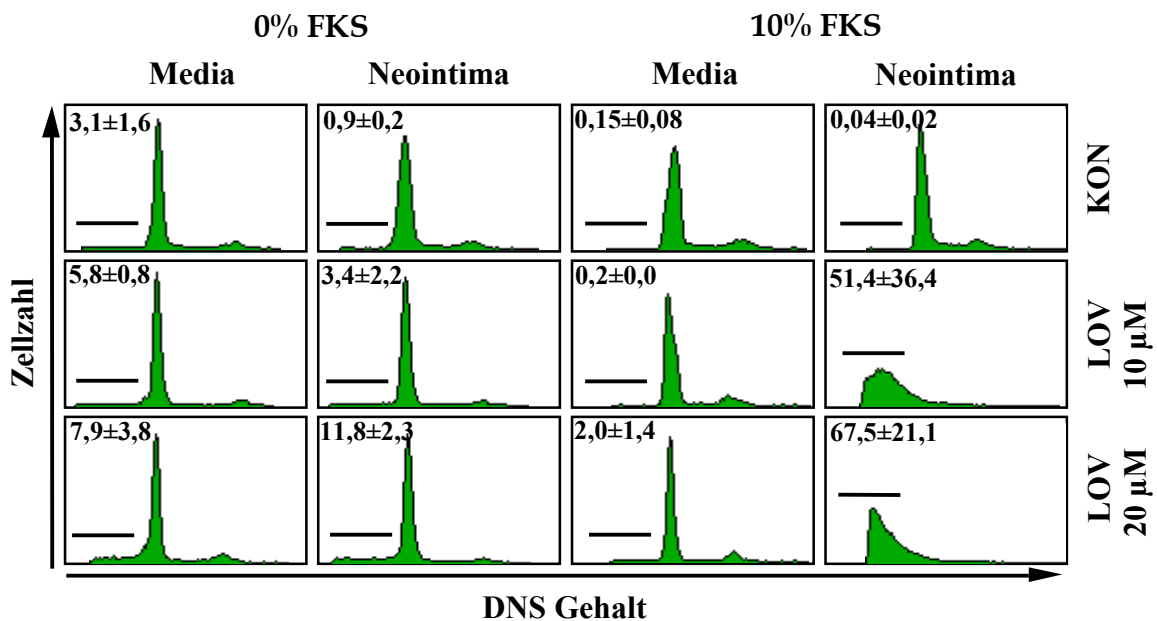


Abb. 10. DNS Zellzyklusanalyse in glatten Gefäßmuskelzellen der Media und Neointima nach Behandlung mit 10 oder 20 μM Lovastatin (LOV). Repräsentative Histogrammplots. Der Balken zeigt den sub-G1 Bereich. In der oberen linken Ecke ist die durchschnittliche Prozentzahl ($n=4$) der Zellen im sub-G1 Bereich gezeigt. Wegen des starken Effekts von LOV bei den Neointima Zellen in 10% FKS ist in diesen Zellen kein typisches Zellzyklussignal mehr zu erkennen. FKS, fötales Kälberserum; KON, Kontrolle unbehandelter Zellen.

Zusammenfassend zeigten alle Messungen zum Nachweis der Apoptose (Annexin-V/PI Doppelfärbung, Bestimmung der Caspase-3-Aktivität, Nachweis der DNS Fragmentierung durch TUNEL und der DNS Degradierung durch Zellzyklusanalyse), dass Lovastatin Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen sowohl aus der Media als auch aus der Neointima induziert. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass bei allen diesen Messungen die Neointima Zellen deutlich stärker als die Media Zellen auf Stimulation mit Lovastatin reagierten. Die Media Zellen reagierten kaum mit Apoptoseinduktion in serumfreien Bedingungen.

4.4. Die lipophilen Statine, aber nicht das hydrophile Pravastatin, reduzieren die mitochondriale Aktivität und induzieren Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima

Außer Lovastatin wurden auch andere Vertreter der Statingruppe getestet, die lipophilen Simvastatin und Fluvastatin, und das hydrophile Pravastatin. Die Muskelzellen wurden für 24 h mit 20 μ M Simvastatin, Fluvastatin oder Pravastatin inkubiert. Alle lipophilen Statine reduzierten signifikant die MTT Aktivität, wieder stärker in den Neointima im Vergleich zu den Media Zellen (Abb. 11). Interessanterweise, zeigte eine Behandlung mit Pravastatin keinen Effekt.

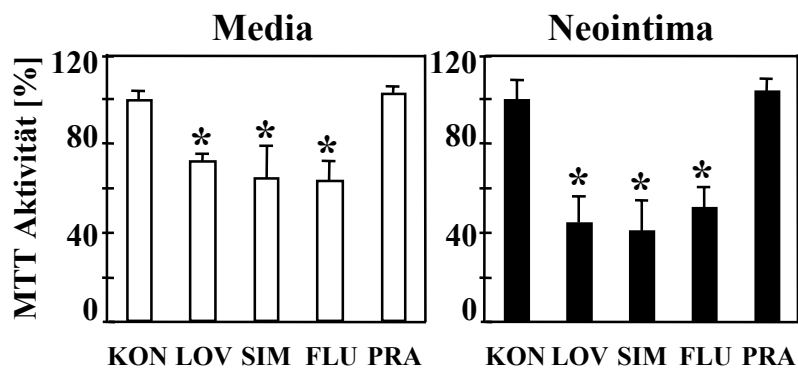


Abb. 11. Reduktion der MTT Aktivität in glatten Gefäßmuskelzellen der Media und Neointima unter der Wirkung verschiedener Statine.

Die lipophilen Statine [Lovastatin (LOV), Simvastatin (SIM) und Fluvastatin (FLU)], aber nicht das hydrophile Pravastatin (PRA), reduzieren die MTT Aktivität in Media (weiße Balken) und Neointima (schwarze Balken) Muskelzellen. Die Zellen wurden mit 10% FKS kultiviert. Die MTT Aktivität wurde als Prozent der unbehandelten Kontrolle (KON) berechnet; (n=4, * $P < 0,05$).

Die Doppelfärbung mit Annexin-V/PI zeigte, dass die lipophilen Statine Lovastatin, Simvastatin und Fluvastatin Apoptose in Media und Neointima Muskelzellen induzieren, wobei das hydrophile Pravastatin keinen Effekt hatte (Abb. 12). Wieder reagierten die Neointima Zellen empfindlicher auf die Behandlung mit Lovastatin, Simvastatin und Fluvastatin.

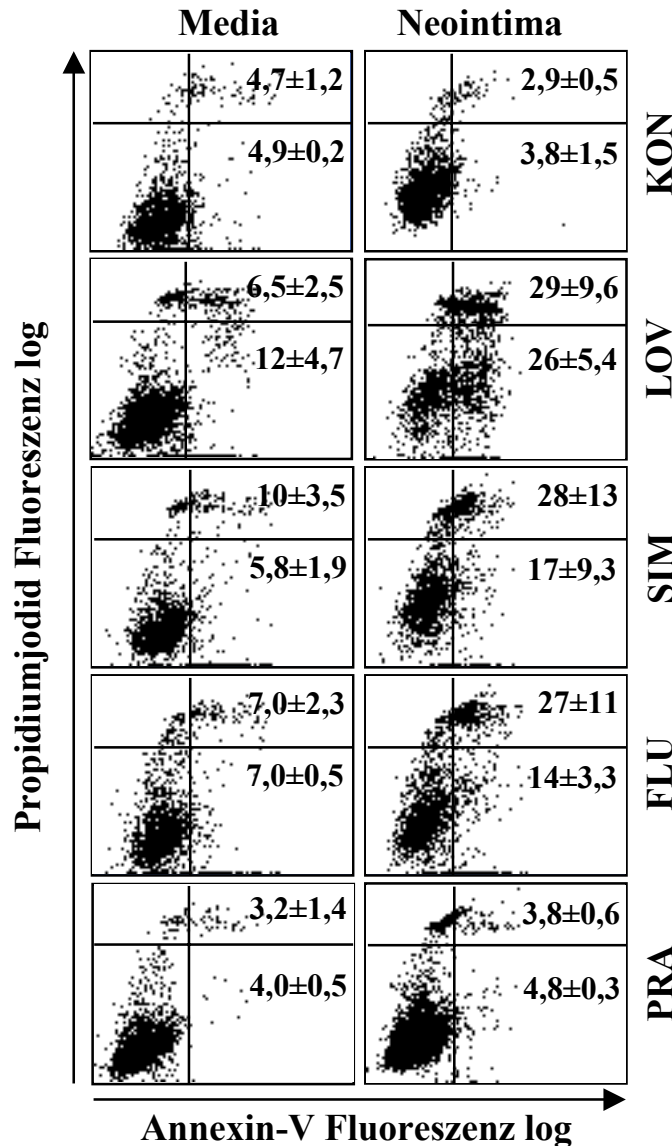


Abb. 12. Apoptoseinduktion in glatten Gefäßmuskelzellen der Media und Neointima unter der Wirkung verschiedener Statine.

Die lipophilen Statine [Lovastatin (LOV), Simvastatin (SIM) und Fluvastatin (FLU)], aber nicht das hydrophile Pravastatin (PRA), induzieren Apoptose in Media und Neointima Muskelzellen. Die Zellen wurden mit 10% FKS kultiviert. Der Prozentanteil Annexin-V-positiver/Propidiumjodid (PI)-negativer sowie Annexin-V-positiver/PI-positiver Zellen wurde von FL-1/ FL-2 Punkteplots berechnet und rechts oben bei den entsprechenden Zellpopulationen gezeigt; (n=4). KON, Kontrolle unbehandelter Zellen.

4.5. Glatte Gefäßmuskelzellen aus der Neointima sind empfindlicher auf die Induktion von Zelltod durch Statine im Vergleich zu Media Zellen

Beide Zellarten wurden in einer Kokultur untersucht. Die Neointima Zellen wurden mit einer Dichte von $1,0 \times 10^4 / \text{cm}^2$ auf Media Zellen hoher Dichte ($1,0 \times 10^5 / \text{cm}^2$) ausgesät als ein Model für die Entstehung einer Neointima. Die Zellen wurden für 24 h kultiviert und dann mit jeweils $20 \mu\text{M}$ Lovastatin für 24 h stimuliert. Diese Behandlung führte zu einem Anstieg der abgelösten Zellen ($8,6 \pm 5,5 \times 10^3$) (Abb.13). Dies entspricht $3,9 \pm 2,5\%$ der Gesamtzellzahl. Kontrollen von Media Zellen allein zeigten eine niedrigere Zahl abgelöster Zellen ($1,9 \pm 0,9 \times 10^3$), was $0,95 \pm 0,05\%$ der Gesamtzellzahl entspricht. So kann man annehmen, dass der Unterschied in der Zahl von abgelösten Zellen hauptsächlich aus Neointima Zellen besteht. Insgesamt entspricht dies ungefähr einem Drittel der Gesamtpopulation der ausgesäten Neointima Zellen. Eine Trennung der Neointima Zellen von einem direkten Kontakt mit den Media Zellen durch einen Zellkultureinsatz resultierte in einem deutlichen Anstieg abgelöster Zellen ($30 \pm 21,9 \times 10^3$). Dies könnte bedeuten, dass die Neointima Zellen durch den Kontakt mit Media Zellen vor Apoptose geschützt sind. Neointima Zellen allein reagierten wieder deutlich empfindlicher auf Behandlung mit Lovastatin ($39,5 \pm 31,4 \times 10^3$ abgelöste Zellen/Zellkultureinsatz oder $55,2 \pm 23,2 \times 10^3$ apoptotische Zellen/Well in der 6-Wellplatte).

4.6. Die Neointima Muskelzellen zeigen eine niedrigere Expression von *Bax* und *cIAP-1* im Vergleich zu den Media Zellen

Mittels Durchflußzytometrie wurde die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine in glatten Gefäßmuskelzellen der Media und Neointima untersucht. Die Neointima Zellen zeigten eine signifikant niedrigere Expression des proapoptotischen Proteins *Bax* und des antiapoptotischen *cIAP-1*, im Vergleich zu den Media Zellen (Abb. 14). Die mittlere Fluoreszenzintensität für *Bax* und *cIAP-1* war $63,3 \pm 16,2$ und $44,5 \pm 10,4$ in Media Zellen. Die Neointima Zellen zeigten eine Intensität von $40,3 \pm 7,6$ und $21,5 \pm 3,8$ für *Bax* und *cIAP-1*. Es wurden keine signifikanten Unterschiede für *Bcl_{XL}* und *cIAP-2* festgestellt.

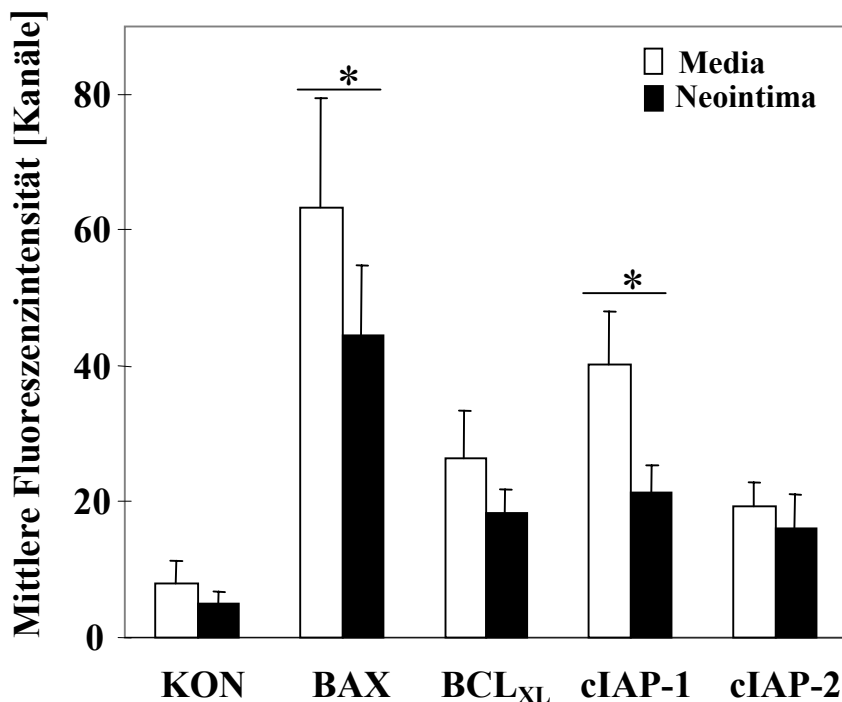


Abb.14. Durchflußzytometrische Analyse der Expression proapoptotischer (*Bax*) und antiapoptotischer (*Bcl_{XL}*, *cIAP-1*, *cIAP-2*) Proteine in Media (weiße Balken) und Neointima (schwarze Balken) Muskelzellen.

Die mittlere Fluoreszenzintensität wurde mittels FL-1 Histogrammplots berechnet. Als Kontrolle (KON) wurde die Färbung mit dem zweiten FITC- konjugierten Antikörper verwendet; (n=4; * P<0,05)

Der Unterschied in der Expression von *cIAP-1* zwischen Media und Neointima Zellen wurde weiterhin im Western Blot bestätigt (Abb. 15). Die lipophilen Statine Lovastatin und Simvastatin reduzierten die Expression von *cIAP-1*, das hydrophile Pravastatin zeigte keinen Effekt.

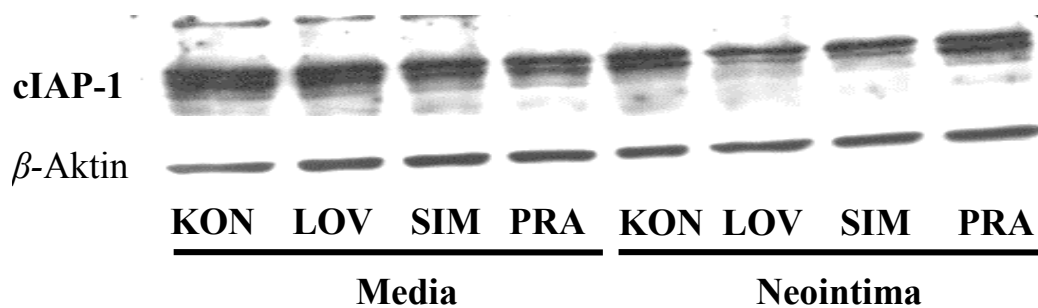


Abb. 15. Western Blot Analyse der Expression des antiapoptotischen Proteins *cIAP-1* in Media und Neointima Muskelzellen.

Die Zellen wurden mit jeweils 20 μ M Lovastatin (LOV), Simvastatin (SIM) und Pravastatin (PRA) für 24 h inkubiert. Als Kontrolle für gleiche Proteinmenge wurde β -Aktin verwendet. Repräsentative Abbildung von drei unabhängigen Versuchen. KON, Kontrolle unbehandelter Zellen.

5. DISKUSSION

5.1. Methodendiskussion

5.1.1. Unterschiede zwischen glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima

Die Neointima Muskelzellen, die nach einer Gefäßverletzung z.B. durch Ballonkatheter entstehen, unterscheiden sich von den Media Zellen, die die mittlere Schicht der Gefäßwand formieren. Die Neointima Zellen wachsen in Zellkultur als eine Schicht und charakterisieren sich durch eine niedrigere Expression von α -SMA. Zusätzlich sind auch andere Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen beschrieben. So zeigen die Neointima Muskelzellen eine leicht erhöhte Proliferation, eine niedrigere Expression von Myosin und sie produzieren mehr Stickstoffmonoxid nach Stimulation mit Zytokinen (5,32,44,67). Um diese unterschiedlichen Muskelzellen bei einer möglichst vergleichbaren Zelldichte untersuchen zu können, wurden die Neointima Zellen in einer etwas niedrigeren Dichte ($0,7 \times 10^3/\text{cm}^2$) im Vergleich zu den Media Zellen ($1,0 \times 10^3/\text{cm}^2$) ausgesät. Auf diese Weise befanden sich die Zellen zur Zeit der Behandlung mit Statinen in ähnlicher Zelldichte und in ähnlichem Proliferationsstadium, wie MTT Test, Trypanblau Zählung und Zellzyklusanalyse zeigten (Abb. 5,6; Tabelle 1)

5.1.2. Media und Neointima glatter Gefäßmuskelzellen als Zellkulturmodell *in vitro*

Die Verwendung glatter Gefäßmuskelzellen der Ratte ist ein gut etabliertes Modell in der zellbiologischen Forschung (8,23,52). In unseren Versuchen stammen die Zellen aus unterschiedlichen Gefäßbereichen- der A. Carotis und der thorakalen Aorta. Dies ist durch die Tatsache bedingt, dass in der Aorta Ballonkatheterverletzung schwer durchzuführen ist, um Neointima Zellen zu gewinnen. Die Aorta hat aber eine relativ dicke Wand und ist deshalb die ideale Quelle für Media Zellen. In der A. Carotis ist die Verletzung mittels eines Ballonkatheters gut durchführbar und die später entstandene Neointima kann mikroskopisch leicht präpariert werden. In unseren Experimenten wurden die Zellen auch in einem Kokulturmodell untersucht. Dabei sind die Neointima Zellen gut auf den Media Zellen gewachsen. Solch ein Modell könnte als eine *in vitro* entstehende Neointima betrachtet werden. Bei einer späteren Messung im Durchflußzytometer besteht jedoch nicht die Möglichkeit, Media von Neointima Zellen zu unterscheiden. Deshalb wurde hier nur die Zahl abgelöster Zellen im Lichtmikroskop gezählt. Die vorhergehenden umfangreichen

Analysen zur Apoptosedetektion berechtigen aber zu dem Schluss, dass es sich bei den gezählten abgelösten Zellen zum größten Teil um apoptotische Zellen handelt.

Die hier erhaltenen Ergebnisse könnten Ausgangspunkt für Untersuchungen z.B. an humanen Zellen oder auch an knock-out Mausmodellen sein. Die Verfügbarkeit humanen Materials ist zwar limitiert. Außerdem besitzen die menschlichen Muskelzellen aus Media und Neointima eine geringere Proliferationsfähigkeit. Das Hauptproblem ist die Gewinnung von Media und Neointima Zellen aus dem selben Patienten, um direkte vergleichende Untersuchungen durchführen zu können. Inzwischen ist es aber in unserem Labor gelungen, humane Muskelzellen aus Carotisläsionen zu isolieren und zu charakterisieren (14). Zukünftige Untersuchungen können also auch in humanen Zellen die Effekte der Statine testen. Andererseits wäre gerade in Mäusen die Induktion einer Neointima sehr interessant, weil hier durch die Verwendung genetisch veränderter Tiere der Einfluß verschiedener Proteine und Rezeptoren untersucht werden könnte. In diesem Zusammenhang wurde vor kurzem ein interessantes Mausmodell für Entstehung atherosklerotischer Plaques der A. Carotis beschrieben (60). Zusätzlich wird seit einiger Zeit in Mäusen durch eine Katheterverletzung auch versucht, eine Neointimabildung zu stimulieren. Am interessantesten wäre aber die Kombination beider Modelle. Die Erfahrung an den Mausmodellen für Plaque- oder Restenoseentstehung ist jedoch im Vergleich zu der Fülle an Daten aus dem Rattenmodell zur Zeit noch beschränkt. In Zukunft könnte aber ein solches Modellsystem für die Untersuchung der Restenosemechanismen eine wichtigere Rolle spielen als das zur Zeit noch sehr weit verbreitete Modell der Carotisverletzung der Ratte.

5.1.3. Bestimmung der Zellvitalität

Mit dem MTT Test wird die mitochondriale Aktivität gemessen. Das heißt, diese Methode ist kein direktes Maß für die Zellzahl und die Zellvitalität wird nur indirekt bestimmt. Deshalb wurde diese Methode mit Trypanblau Färbung kombiniert, um Daten über die Zellzahl und die Zahl abgestorbener Zellen zu erhalten. Die Bestimmung der MTT Aktivität ist gut reproduzierbar, da die Absorption eines Farbstoffs im Photometer gemessen wird. Die Zählung Trypanblau positiver und negativer Zellen ist dagegen subjektiv, weil die Zellen im Lichtmikroskop als „positiv“ oder „negativ“ beurteilt, bzw. gezählt werden. In einigen Versuchen wurden deshalb die Bestimmungen parallel durchgeführt, um zu zeigen, dass MTT Test und Trypanblau Zählung gut korrelieren.

5.1.4. Messungen zur Apoptosedetektion

Um programmierten Zelltod oder Apoptose nachzuweisen und deutlich von nekrotischem Zelltod oder sekundärer Nekrose abzugrenzen, ist es erforderlich mehrere Methoden der Apoptosedetektion parallel zu verwenden. Deshalb wurden in den meisten Versuchen mindestens zwei Methoden zur Apoptosedetektion kombiniert. Die verwendeten Methoden umfassen die Doppelfärbung von Annexin-V/PI zur Messung der Phosphatidylserin Exposition auf der Membranoberfläche nicht nekrotischer Zellen, die Bestimmung der Caspase-3 Aktivität durch Färbung mit spezifischem Antikörper der präferentiell die aktive Form erkennt, den Nachweis der DNS-Fragmentierung durch Färbung von DNS Brüchen über eine spezielle Enzymreaktion (TUNEL Reaktion) und die Degradierung der DNS durch Bestimmung der Zellen im sub-G1 Bereich bei der Zellzyklusanalyse.

5.1.5. Durchflußzytometrie

Bei Durchführung der Färbung und später während der Messung kann direktes Sonnenlicht Störeinflüsse ausüben, da FITC lichtempfindlich ist. Daher wurde unter entsprechenden Schutzbedingungen gearbeitet. Um repräsentative Ergebnisse zu bekommen, sollen in der Regel mindestens 10 000 Zellen in jeder Messung analysiert werden. Dabei liegt die Meßgenauigkeit bei Doppelmessungen im Durchflußzytometer bei über 98%.

5.2. Ergebnisdiskussion

Obwohl gezeigt wurde, dass Statine in verschiedenen Zelltypen Apoptose induzieren (1,10,22,65), wurden die Effekte dieser Substanzen auf Apoptose in Neointima Muskelzellen bis jetzt nicht untersucht. Außerdem wurden die Statine *in vitro* in relativ hohen Konzentrationen verwendet (bis zu 100 µM) um Apoptose in Media Zellen induzieren zu können. Diese Muskelzellen wurden auch unter serumhaltigen Bedingungen untersucht (22,57). Die Plasmakonzentrationen der Statine *in vivo* sind jedoch viel niedriger und die Muskelzellen im normalen Gefäß sind nicht in Kontakt mit dem zirkulierenden Blut.

In dieser Arbeit wurde nun gezeigt, dass die lipophilen Statine Lovastatin, Simvastatin und Fluvastatin Zelltod in glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima

induzieren, während das hydrophile Pravastatin keinen Effekt hatte. Um die genaue Art dieses Zelltodes zu charakterisieren, wurden die Messungen zur Bestimmung der Zellvitalität (MTT Aktivität und Trypanblau Färbung) mit spezifischen Messungen zum Apoptosenachweis kombiniert. Die lipophilen Statine verursachten eine erhöhte Bindung von Annexin-V in der Population PI- negativer Zellen, eine Aktivierung der Caspase-3 und eine DNS- Fragmentierung und Degradierung (erhöhter Prozentanteil TUNEL- positiver Zellen und der Zellen im sub-G₁ Bereich des Zellzyklus). Diese Ergebnisse beweisen, dass lipophile Statine Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen sowohl der Media als auch der Neointima induzieren. Besonders hervorzuheben ist, dass in allen diesen Messungen sowohl bei serumhaltigen, als auch bei serumfreien Bedingungen die Neointima Muskelzellen nach Statinbehandlung deutlich stärker mit Apoptose im Vergleich zu den Media Zellen reagierten. Diese ausgeprägte Induktion von Apoptose in Neointima Gefäßmuskelzellen könnte von Bedeutung für die Prävention der post- PTCA Restenose sein. Ganz offensichtlich sind die Neointima Zellen im Vergleich zu den Media Zellen empfindlicher für Apoptoseinduktion mit Statinen. Ähnliches wurde auch in Studien mit Wasserstoffperoxyd und Retinolsäure demonstriert (36,45). Unsere Befunde waren in Übereinstimmung mit diesen Studien.

Statine reduzieren signifikant das kardiovaskuläre Risiko und stabilisieren atherosklerotische Plaques (38,48,56). Deshalb gehören diese Substanzen zu den meist verwendeten Medikamenten in der industrialisierten Welt (insbesondere Atorvastatin, Fluvastatin und Simvastatin). Die in unserer Arbeit beschriebenen Unterschiede in Bezug auf die Apoptoseinduktion sind ein Beispiel für voneinander abweichende Eigenschaften von lipophilen Statinen und dem hydrophilen Pravastatin. Ähnliche Unterschiede wurden auch neulich beschrieben. So z.B. wurde in einer Studie gezeigt, dass Pravastatin den Kollagengehalt in atherosklerotischen Plaques von Kaninchen erhöhen und die Zahl apoptotischer Zellen reduzieren kann, was letztendlich zu einer Plaquestabilisierung führt (20). Diese mögliche stabilisierende Wirkung von Pravastatin wurde auch an Patienten mit atherosklerotischen Plaques der A. Carotis bestätigt (9).

Wie die Zellzyklusanalysen zeigten, führten unsere Kulturbedingungen zu sehr ähnlichen Proliferationsraten in Media und Neointima Zellen. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass eine erhöhte Proliferationsrate der Zellen für den beobachteten Unterschied in der Apoptosesensitivität zwischen Media und Neointima Zellen

verantwortlich ist. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die beobachteten Effekte könnte die Inhibierung von Cholesterinvorstufen sein. Diese Produkte werden z.B. zur Membransynthese oder zum normalen Verlauf des Zellzyklus benötigt. Eine Inkubation der Zellen mit Mevalonat, dem Produkt der HMG-CoA Reduktase, konnte den Effekt in Neointima Zellen nicht vollständig aufheben. Da die beschriebenen Effekte der Statine nicht an der Proliferation der Zellen zur Zeit der Statinbehandlung liegen (ähnliche Zelldichte und Proliferationsrate zur Zeit der Behandlung) und da die Inkubation mit Mevalonat die Wirkung von Lovastatin in Neointima Zellen nicht vollständig aufheben konnte, wurden zusätzliche Erklärungsmöglichkeiten für die beobachteten Unterschiede zwischen Media und Neointima Zellen gesucht. In diesem Zusammenhang ist es vorstellbar, dass an der Apoptoseregulation beteiligte Proteine eine Rolle spielen könnten. Deshalb wurde die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine der *Bcl*- und *Iap*- Familie untersucht. Es wurde kein Unterschied in der Expression der antiapoptotischen Proteine *Bcl_{XL}* und *cIAP-2* zwischen Media und Neointima Muskelzellen festgestellt. Die Neointima Zellen zeigten aber eine niedrigere Expression des antiapoptotischen Proteins *cIAP-1*, das eine Schlüsselrolle bei der Apoptoseregulation in glatten Gefäßmuskelzellen spielt (13). Damit könnte möglicherweise die erhöhte Apoptosesensitivität neointimaler Muskelzellen auf die Behandlung mit Statinen erklärt werden.

Die Zelldichte spielt eine wichtige Rolle bei der Apoptoseregulation in glatten Gefäßmuskelzellen. So sind z.B. Muskelzellen hoher Dichte vor Apoptose geschützt (15). Möglicherweise wird diese Protektion durch eine höhere Expression von *cIAP-1* vermittelt. Aus diesem Grund wurden die Media und Neointima Zellen in allen Versuchen bei ähnlicher Zelldichte und Proliferationsrate untersucht. Wie bereits oben erwähnt, begründet sich deshalb die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen nach Behandlung mit Statinen sehr wahrscheinlich nicht auf Unterschiede in der Zelldichte oder Proliferationsrate, sondern vermutlich auf eine niedrigere *cIAP-1* Expression. Die Kinetik der Apoptoseinduktion zeigte, dass Neointima Zellen am Anfang langsamer im Vergleich zu Media Zellen auf die Behandlung mit Lovastatin reagierten, nach 24 h aber starben die Neointima Zellen massiv, wobei der Effekt auf die Media Zellen schwächer blieb. Diese am Anfang der Apoptoseinduktion gemachten Beobachtungen könnten durch die niedrigere basale Apoptoserate von Neointima Zellen in der Zellkultur erklärt werden. Gleichzeitig zeigen diese Zellen eine niedrigere Expression des proapoptotischen Proteins *Bax*, aber auch des

antiapoptotischen *cIAP-1*. Vermutlich beginnen deshalb die Neointima Zellen langsamer in Apoptose zu gehen, eine längere Inkubation mit Statinen könnte jedoch zu einer „Erschöpfung“ ihrer antiapoptotischen Abwehrmechanismen führen. Nach längerer Exposition mit Statinen sterben die Neointima Zellen massiv durch Apoptose (Abb. 16).

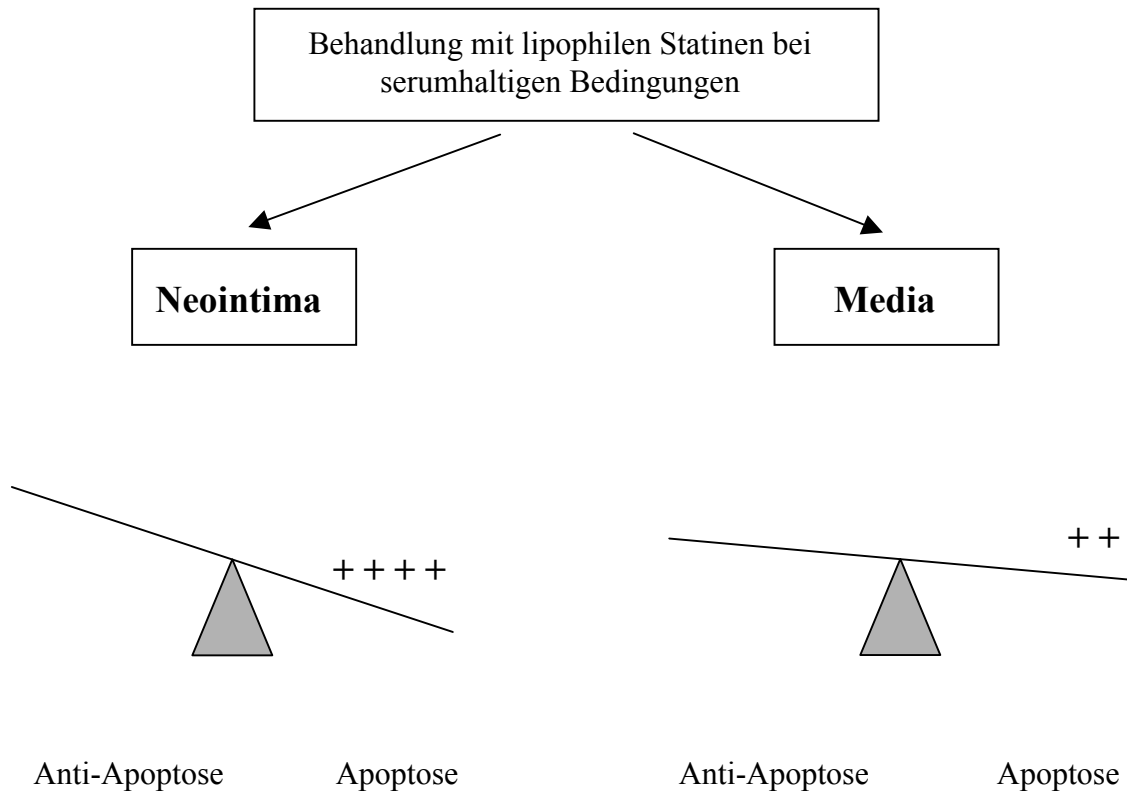


Abb. 16. Schematische Darstellung pro- und antapoptotischer Verhältnisse in glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima.

In Kultur zeigen die Neointima Zellen im Vergleich zu den Media Zellen eine niedrigere basale Apoptoserate (niedrigere Bindung an Annexin-V, weniger Zellen im sub-G1 Bereich des Zellzyklus, niedrigere Expression des proapoptotischen Proteins *Bax* und des antiapoptotischen *cIAP-1*). Nach Behandlung mit apoptoseinduzierenden Substanzen (z.B. lipophilen Statinen), reagieren Neointime Zellen jedoch viel stärker als Media Zellen auf diese Apoptoseinduktion.

Um eine frühe Entstehung der Neointima zu simulieren, wurde ein Kokulturmodell zwischen Media Zellen hoher Dichte und Neointima Zellen niedriger Dichte verwendet. Die Behandlung mit Lovastatin induzierte wieder Zelltod hauptsächlich in den Neointima Zellen. Der direkte Kontakt zwischen den Zellen reduzierte die Zahl sterbender Neointima Zellen. Eine Trennung der beiden Zellarten durch Membranfilter führte dazu, dass Lovastatin eine stärkere Wirkung auf die Neointima Zellen zeigte, als bei der direkten Kokultur. Dies könnte darauf hinweisen, dass Media Zellen hoher Dichte durch Zell-Zell Kontakte ein Überleben der Neointima Zellen fördern. In der Kokultur mit Membranfilter zeigten jedoch die Neointima Zellen eine geringere Neigung zur Apoptose als in Kultur auf Membranfilter ohne Media Zellen. Möglicherweise produzieren Media Zellen hoher Dichte schützende Faktoren, die über Diffusion durch die Membranfilter die Apoptose in Neointima Zellen reduzieren könnten. *In vivo* kann eine Beschädigung der inneren elastischen Gefäßmembran während Ballonangioplastie zu einem ähnlichen Kontakt zwischen den Media Zellen und den später entstehenden Neointima Zellen führen. Durch die entstehende Endothelverletzung sind die glatten Gefäßmuskelzellen zusätzlich Wachstumsfaktoren im zirkulierenden Blut ausgesetzt. Diese Umstände verursachen eine erhöhte Migration und Proliferation von Muskelzellen aus der Mediaschicht der Gefäßwand und die spätere Entstehung der Neointima.

Trotz ihrer anerkannten Wirkung bei der primären und sekundären Prävention kardiovaskulärer Krankheiten ist der Effekt von Statinen auf die Verhinderung der Restenose widersprüchlich. Einige Studien zeigen, dass Statine die Restenose nach Ballonangioplastie verhindern können. So inhibiert Simvastatin die Entwicklung der Neointima nach Ballonverletzung *in vivo* in Kaninchen oder Ratten (11,28). Weiterhin zeigt Atorvastatin einen ähnlichen Effekt in Versuchen mit Kaninchen (7). Klinische Studien demonstrieren auch eine Reduzierung der Neointimbildung in Patienten nach PTCA oder Stentimplantation (50,61,62). Im Gegensatz dazu finden aber andere klinische Studien keinen Effekt von Fluvastatin oder Lovastatin auf die Entstehung der Restenose nach PTCA (19,55,64). Ein möglicher Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse oder auch manchmal nur kurzfristigen Effekte der Statine bei der Verminderung der Restenose könnte die perorale Aufnahme sein. Dadurch werden vermutlich die notwendigen effektiven Konzentrationen dieser Substanzen an der Stelle der zukünftigen Neointima nicht erreicht. Außerdem könnte

die metabolische Veränderung dieser Substanzen in der Leber die *in vitro* beschriebenen Effekte beeinflussen. Weiterhin wäre ein Effekt der Statine hauptsächlich bei der in-Stent Restenose zu erwarten, da hier der führende pathologische Mechanismus eine exzessive Proliferation neointimaler Muskelzellen ist. Bei dieser besonderen Art der Restenose im Unterschied zu der Entwicklung der Neointima nach Ballonangioplastie ohne nachfolgendes Stenting beobachtet man keinen negativen Gefäßumbau (42,54). Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Beschichtung von Stents mit lipophilen Substanzen in einer gleichmäßigen Verteilung dieser Substanzen in der Stentumgebung führt, während hydrophile Substanzen nach Anwendung mit Stents im umliegenden Gewebe kaum nachweisbar waren (27). In diesem Sinne könnte die Beschichtung von Stents mit lipophilen Statinen hilfreich sein, um relativ hohe Medikamentenkonzentrationen an der Stelle der potentiellen Neointimabildung zu erreichen. Hohe lokale Konzentrationen nicht metabolisch veränderter Statine könnten dabei die Entstehung der Neointima verhindern. Es ist sogar vorstellbar, dass in der sogenannten „wash out“ Stentphase die verbleibenden niedrigen Statinkonzentrationen eine Reendothelialisierung sogar fördern könnten, da kürzlich gezeigt wurde, dass Statine in niedrigen Konzentrationen die Proliferation und Migration kultivierter Endothelzellen erhöhen können (33,65). Die Entwicklung solcher Statin- beschichteter Stents könnte eine interessante neue Möglichkeit für die Verminderung der post- PTCA Restenose darstellen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden glatte Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima der Ratte im Hinblick auf ihre Empfindlichkeit auf Statinbehandlung untersucht. Diese Zellen repräsentieren ein gut charakterisiertes und breit verwendetes Modell. Die Ergebnisse basieren auf Versuchen mit Zellkulturen und können als Grundlage für Versuche mit menschlichen Zellen und/oder weitere Tierexperimente betrachtet werden. Man kann Folgendes zusammenfassen:

- A).** Statine induzieren *in vitro* Apoptose sowohl in Media als auch in Neointima glatter Gefäßmuskelzellen. Diesen Effekt beobachtet man nur bei den lipophilen Statinen Lovastatin, Simvastatin und Fluvastatin. Das hydrophile Pravastatin zeigt keinen Effekt. Die Apoptoseinduktion in glatten Gefäßmuskelzellen aus der Media war gering bei serumfreien Bedingungen.
- B).** Die Neointima Zellen sind im Vergleich zu den Media Zellen sowohl bei serumhaltigen, als auch unter serumfreien Bedingungen deutlich empfindlicher auf Apoptoseinduktion durch Statine.
- C).** Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede könnte in der niedrigeren Expression des antiapoptotischen Proteins *cIAP-1* in Neointima Zellen liegen.
- D).** Dank der Ergebnisse dieser Versuche könnten neue effektive Strategien zur Prävention der Restenose nach Ballonangioplastie entwickelt werden, z.B. durch die lokale Anwendung lipophiler Statine mittels entsprechender Stentbeschichtung.

Diese zusätzlichen Effekte lipophiler Statine sind in die Synopsis pharmakologischer Wirkungen von HMG-CoA Reduktasehemmern in Abb. 17 eingefügt.

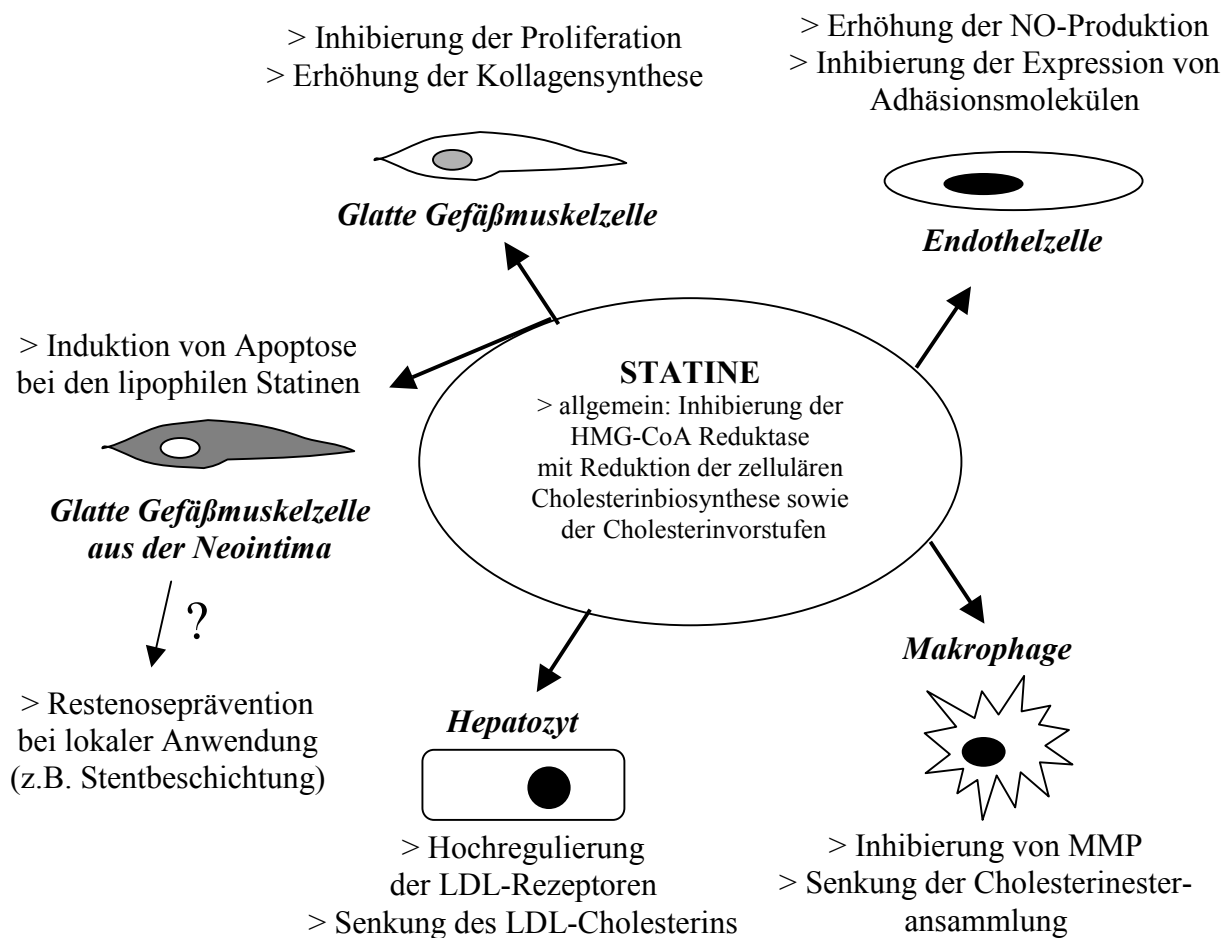


Abb. 17. Schema möglicher zusätzlicher Statineffekte

Zusammenfassend senken die Statine das LDL- Cholesterin bei gleichzeitiger Erhöhung des HDL- Cholesterins. Dank ihrer pleiotropen Effekte stabilisieren die Statine zusätzlich atherosklerotische Plaques. Einen neuen Wirkmechanismus von besonderer Bedeutung stellt die Induktion von Apoptose in glatten Gefäßmuskulzellen der Neointima dar. Dies gilt für die lipophilen Statine (Lovastatin, Simvastatin und Fluvastatin), aber nicht für das hydrophile Pravastatin. Dieser Mechanismus und vor allem die deutlich höhere Apoptosesensitivität neointimaler Muskelzellen im Vergleich zu normalen Media Zellen könnte eine wichtige Bedeutung für die Prävention der Restenose nach Ballonangioplastie spielen. Dabei würde die lokale Anwendung lipophiler Statine z.B. mittels Stentbeschichtung eine interessante Möglichkeit darstellen. Dadurch wird eine Leberpassage der Statine vermieden und eine hohe Konzentration an der Stelle der potentiellen Neointima erreicht.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Agarwal B, Rao CV, Bhendwal S, Ramey WR, Shirin H, Reddy BS, Holt PR. Lovastatin augments sulindac-induced apoptosis in colon cancer cells and potentiates chemopreventive effects of sulindac. *Gastroenterology*. 1999;117:838-847.
2. American Heart Association. 2002 heart and stroke statistical update. Dallas: American Heart Association, 2001.
3. Baetta R, Donetti E, Comparato C, Calore M, Rossi A, Teruzzi C, Paoletti R, Fumagalli R, Soma MR. Proapoptotic effect of atorvastatin on stimulated rabbit smooth muscle cells. *Pharmacol Res*. 1997;36:115-121.
4. Bellosta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1671-1678.
5. Bochaton-Piallat ML, Gabbiani F, Gabbiani G. Heterogeneity of rat aortic smooth muscle cell replication during development: correlation with replicative activity after experimental endothelial denudation in adults. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1994;26:1-8.
6. Buja LM, Entman ML. Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease. *Circulation*. 1998;98:1355-1357.
7. Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tunon J, Ortega L, Perez F, Diaz C, Hernandez G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:2057-2064.
8. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest*. 1983;49:327-333.
9. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation*. 2001;103:926-933.

10. Dimitroulakos J, Nohynek D, Backway KL, Hedley DW, Yeger H, Freedman MH, Minden MD, Penn LZ. Increased sensitivity of acute myeloid leukemias to lovastatin-induced apoptosis: A potential therapeutic approach. *Blood*. 1999;93:1308-1318.
11. Dol F, Mares A, Herbert J. Simvastatin inhibits myointimal hyperplasia following carotid artery injury in cholesterol-fed rabbits. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996;7:772-778.
12. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2002;8:1249-1256.
13. Erl W, Hansson GK, de Martin R, Draude G, Weber KS, Weber C. Nuclear factor-kappa B regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1999;84:668-677.
14. Erl W, Kim HJ, Brandl R. Isolation, culture, and characterization of vascular smooth muscle cells from human carotid lesions. 9th Annual Scandinavian Atherosclerosis Conference. 2003 (Abstract).
15. Erl W, Weber C, Hansson GK. Pyrrolidine dithiocarbamate-induced apoptosis depends on cell type, density, and the presence of Cu(2+) and Zn(2+). *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278:C1116-C1125.
16. Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation*. 2002;105:1756-1759.
17. Fattori R, Piva T. Drug-eluting stents in vascular intervention. *Lancet*. 2003;361:247-249.
18. Fonseca FA, Izar MC, Fuster V, Gallo R, Padurean A, Fallon JT, Schachter EN, Chesebro JH, Badimon JJ. Chronic endothelial dysfunction after oversized coronary balloon angioplasty in pigs: a 12-week follow-up of coronary vasoreactivity in vivo and in vitro. *Atherosclerosis*. 2001;154:61-69.
19. Freed M, Safian RD, O'Neill WW, Safian M, Jones D, Grines CL. Combination of lovastatin, enalapril, and colchicine does not prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol*. 1995;76:1185-1188.
20. Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, Hill CC, Enomoto M, Hirouchi Y, Shiomi M, Aikawa M. Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation*. 2001;103:993-999.

21. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343:425-430.
22. Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Egido J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res*. 1998;83:490-500.
23. Hansson GK, Holm J, Holm S, Fotev Z, Hedrich HJ, Fingerle J. T lymphocytes inhibit the vascular response to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:10530-10534.
24. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*. 1998;82:1111-1129.
25. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. Apoptotic cell removal. *Curr Biol*. 2001;11:R795-805.
26. Hiatt BL, Ikeno F, Yeung AC, Carter AJ. Drug-eluting stents for the prevention of restenosis: in quest for the Holy Grail. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2002;55:409-417.
27. Hwang CW, Wu D, Edelman ER. Physiological transport forces govern drug distribution for stent-based delivery. *Circulation*. 2001;104:600-605.
28. Indolfi C, Cioppa A, Stabile E, Di Lorenzo E, Esposito G, Pisani A, Leccia A, Cavuto L, Stingone AM, Chieffo A, Capozzolo C, Chiariello M. Effects of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor simvastatin on smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo after vascular injury. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:214-221.
29. Indolfi C, Mongiardo A, Curcio A, Torella D. Molecular mechanisms of in-stent restenosis and approach to therapy with eluting stents. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:142-148.
30. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-257.
31. Knapp AC, Huang J, Starling G, Kiener PA. Inhibitors of HMG-CoA reductase sensitize human smooth muscle cells to Fas-ligand and cytokine-induced cell death. *Atherosclerosis*. 2000;152:217-227.
32. Kocher O, Gabbiani F, Gabbiani G, Reidy MA, Cokay MS, Peters H, Huttner I. Phenotypic features of smooth muscle cells during the evolution of experimental carotid

- artery intimal thickening. Biochemical and morphologic studies. *Lab Invest.* 1991;65:459-470.
33. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med.* 2000;6:1004-1010.
 34. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation.* 1998;97:1129-1135.
 35. Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem.* 1999;274:21926-21931.
 36. Li WG, Miller FJ Jr, Brown MR, Chatterjee P, Aylsworth GR, Shao J, Spector AA, Oberley LW, Weintraub NL. Enhanced H₂O₂-induced cytotoxicity in "epithelioid" smooth muscle cells: implications for neointimal regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1473-1479.
 37. Libby P, Aikawa M. Effects of statins in reducing thrombotic risk and modulating plaque vulnerability. *Clin Cardiol.* 2003;26:111-14.
 38. Libby P, Aikawa M. Mechanisms of plaque stabilization with statins. *Am J Cardiol.* 2003;91:4B-8B.
 39. Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med.* 2002;8:1257-1262.
 40. Libby P, Ganz P. Restenosis revisited--new targets, new therapies. *N Engl J Med.* 1997;337:418-419.
 41. Lowe HC, Oesterle SN, Khachigian LM. Coronary in-stent restenosis: current status and future strategies. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:183-193.
 42. Moreno PR, Palacios IF, Leon MN, Rhodes J, Fuster V, Fallon JT. Histopathologic comparison of human coronary in-stent and post-balloon angioplasty restenotic tissue. *Am J Cardiol.* 1999;84:462-466.
 43. Mueck AO, Seeger H, Wallwiener D. Further evidence for direct vascular actions of statins: effect on endothelial nitric oxide synthase and adhesion molecules. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;109:181-183.

44. Orlandi A, Ehrlich HP, Ropraz P, Spagnoli LG, Gabbiani G. Rat aortic smooth muscle cells isolated from different layers and at different times after endothelial denudation show distinct biological features in vitro. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:982-989.
45. Orlandi A, Francesconi A, Cocchia D, Corsini A, Spagnoli LG. Phenotypic heterogeneity influences apoptotic susceptibility to retinoic acid and cis-platinum of rat arterial smooth muscle cells in vitro: Implications for the evolution of experimental intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1118-1123.
46. Ortego M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Tunon J, Diaz C, Hernandez G, Egido J. Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis*. 1999;147:253-361.
47. Raiteri M, Arnaboldi L, McGeady P, Gelb MH, Verri D, Tagliabue C, Quarato P, Ferraboschi P, Santaniello E, Paoletti R, Fumagalli R, Corsini A. Pharmacological control of the mevalonate pathway: effect on arterial smooth muscle cell proliferation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;281:1144-1153.
48. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344:1383-1389.
49. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
50. Sahni R, Maniet AR, Voci G, Banka VS. Prevention of restenosis by lovastatin after successful coronary angioplasty. *Am Heart J*. 1991;121:1600-1608.
51. Schwartz RS, Topol EJ, Serruys PW, Sangiorgi G, Holmes DR Jr. Artery size, neointima, and remodeling: time for some standards. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:2087-2094.
52. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res*. 1995;77:445-465.
53. Seljeflot I, Tonstad S, Hjermann I, Arnesen H. Improved fibrinolysis after 1-year treatment with HMG CoA reductase inhibitors in patients with coronary heart disease. *Thromb Res*. 2002;105:285-290.
54. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med*. 1994;331:489-495.

55. Serruys PW, Foley DP, Jackson G, Bonnier H, Macaya C, Vrolix M, Branzi A, Shepherd J, Suryapranata H, de Feyter PJ, Melkert R, van Es GA, Pfister PJ. A randomized placebo-controlled trial of fluvastatin for prevention of restenosis after successful coronary balloon angioplasty; final results of the fluvastatin angiographic restenosis (FLARE) trial. *Eur Heart J.* 1999;20:58-69.
56. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J; ASCOT investigators. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet.* 2003;361:1149-1158.
57. Sindermann JR, Fan L, Weigel KA, Troyer D, Muller JG, Schmidt A, March KL, Breithardt G. Differences in the effects of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and viability of smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis.* 2000;150:331-341.
58. Strandberg TE, Vanhanen H, Tikkanen MJ. Effect of statins on C-reactive protein in patients with coronary artery disease. *Lancet.* 1999;353:118-119.
59. Teupser D, Bruegel M, Stein O, Stein Y, Thiery J. HMG-CoA reductase inhibitors reduce adhesion of human monocytes to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289:838-844.
60. von der Thusen JH, van Berkel TJ, Biessen EA. Induction of rapid atherogenesis by perivascular carotid collar placement in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 2001;103:1164-1170.
61. Walter DH, Schachinger V, Elsner M, Mach S, Auch-Schwelk W, Zeiher AM. Effect of statin therapy on restenosis after coronary stent implantation. *Am J Cardiol.* 2000;85:962-968.
62. Walter DH, Schachinger V, Elsner M, Mach S, Dimmeler S, Auch-Schwelk W, Zeiher AM. Statin therapy is associated with reduced restenosis rates after coronary stent implantation in carriers of the PI(A2)allele of the platelet glycoprotein IIIa gene. *Eur Heart J.* 2001;22:587-595.

63. Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:1212-1217.
64. Weintraub WS, Boccuzzi SJ, Klein JL, Kosinski AS, King SB 3rd, Ivanhoe R, Cedarholm JC, Stillabower ME, Talley JD, DeMaio SJ, et al. Lack of effect of lovastatin on restenosis after coronary angioplasty. Lovastatin Restenosis Trial Study Group. *N Engl J Med.* 1994;331:1331-1337.
65. Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation.* 2002;105:739-745.
66. Wiesbauer F, Kaun C, Zorn G, Maurer G, Huber K, Wojta J. HMG CoA reductase inhibitors affect the fibrinolytic system of human vascular cells in vitro: a comparative study using different statins. *Br J Pharmacol.* 2002;135:284-292.
67. Yan Z, Hansson GK. Overexpression of inducible nitric oxide synthase by neointimal smooth muscle cells. *Circ Res.* 1998;82:21-29.
68. Yasunari K, Maeda K, Minami M, Yoshikawa J. HMG-CoA reductase inhibitors prevent migration of human coronary smooth muscle cells through suppression of increase in oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:937-942.
69. Yoshida M, Sawada T, Ishii H, Gerszten RE, Rosenzweig A, Gimbrone MA Jr, Yasukochi Y, Numano F. HMG-CoA reductase inhibitor modulates monocyte-endothelial cell interaction under physiological flow conditions in vitro: involvement of Rho GTPase-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1165-1171.

8. EIGENE PUBLIKATIONEN:

1. Originalarbeiten

Erl W, **Hristov M**, Neureuter M, Yan ZQ, Hansson GK, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2003;169:251-258.

Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Throm Vasc Biol*. 2003;23:1185-1189.

Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:201-206.

Hristov M, Erl W, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. 2003 (in Revision).

2. Kongressbeiträge

a) *Vorträge*

Hristov M, Hansson GK, Weber PC, Erl W. "Statin treatment and apoptosis in neointimal vascular smooth muscle cells." 2. Symposium des DFG Graduiertenkollegs "Vaskuläre Biologie in der Medizin", 5-6. Oktober 2002, Herrsching am Ammersee.

b) *Poster*

Erl W, Hristov M, Neureuter M, Yan ZQ, Hansson GK, Weber PC. "HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells." 8th Annual Scandinavian Atherosclerosis Conference, May 30-June 2, 2002, Humlebaek, Dänemark.

Hristov M, Erl W, Weber PC. "Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of endothelial progenitor cells in vitro." 9th Annual Scandinavian Atherosclerosis Conference, May 22-25, 2003, Humlebaek, Dänemark.

Hristov M, Erl W, Weber PC. "Isolation, culture and characterization of human endothelial progenitor cells." 4th Symposium on the Biology of Endothelial Cells, July 18-20, 2003, München.

(der präsentierende Autor ist unterstrichen)

9. DANKSAGUNG:

Herrn Prof. Dr. med. Peter C. Weber für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die Möglichkeit am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten promovieren zu dürfen. Weiterhin danke ich recht herzlich für seine großartige professionelle und menschliche Unterstützung und für seine vielfältigen Anregungen während meiner Promotion.

Herrn Dr. rer. biol. hum. Wolfgang Erl für die perfekte Betreuung im Labor, für das Einarbeiten in die Labormethoden und für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Göran K. Hansson (*Center for Molecular Medicine*, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden) für wertvolle Diskussionen während der Vorbereitung unseres Manuskripts und weiterhin für die Zellen, die von seiner Arbeitsgruppe freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung eines Promotionsstipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“.

Allen Dozenten für vielfältige und lehrreiche Veranstaltungen innerhalb dieses Kollegs.

Frau Gabriele Berberich für die technische Unterstützung während der Western Blot Analysen.

Herzlichen Dank!

Anschriften:

Dienstlich: Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Pettenkofenstr. 9, D-80336 München, Tel.: 089/5160-4370

Privat: Annette-Kolb-Anger 11, D-81737 München, Tel.: 0179/6841442

Heimatanschrift: Dr. Saiko Saev Str. 15, App. 18, BG-5500 Lovetsch, Tel.: +359(0)68/22479

LEBENS LAUF:

Name: Mihail Hristov

Geboren: am 14.01.1974 in Lovetsch, Bulgarien

Staatsangehörigkeit: Republik Bulgarien

Beruf: Arzt

Religion: orthodox

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1981-1988 Grundschule in Lovetsch
1988-1993 Gymnasium für Fremdsprachen in Lovetsch

Studium: 1993-1999 Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule, Pleven, Bulgarien
1999 praktisches Jahr mit fünf Staatsexamen und Studienabschluß als approbierter Arzt mit dem akademischen Grad „Magister“
Registrations-Nr. des Diploms: 003665/1999

Militärdienst: 30.09.1999-30.06.2000 bei der Feuerwehrnotfallabteilung, Sofia, Bulgarien

Promotion zum Dr. med.: 15.09.2000-30.09.2003 am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Klinikum der LMU- München, unter der Leitung von Prof. Dr. med. Peter C. Weber