Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II
Kardiologie, Angiologie, Pulmologie, Nephrologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. V. Hombach

Einfluss des terminalen Komplementkomplexes auf die Expression der Wachstumsfaktoren PDGF-AA und PDGF-BB durch glatte Gefäßmuskelzellen

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

vorgelegt von
Stefanie Stuhlweißenburg
aus München

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jan Torzewski

2. Berichterstatter: PD Dr. J. Greiner

Tag der Promotion: 19.2.2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Definition der Arteriosklerose 1

1.2 Morphologie der gesunden Arterienwand 1

1.3 Morphologie der arteriosklerotischen Läsion 2

1.4 Modelle zur Pathogenese der Arteriosklerose 4

1.5 Arteriosklerose als entzündliche Erkrankung 7

1.6 Die Rolle des Komplementsystems in der Arteriosklerose 8

1.7 Wachstumsfaktoren in der Atherogenese 11

1.8 Zielsetzung 13

2 Material und Methoden 15

2.1 Geräte 15

2.2 Verbrauchsmaterialien 15

2.3 Kits 16

2.4 Zellkulturmedium und Zusätze 16

2.5 Reagenzien 16

2.6 Primer, Nukleinsäuren und Plasmide 17

2.7 Restriktion 18

2.8 Lösungen 18

2.9 Isolierung des C5b-9 Komplexes 21

2.10 Stimulation mit PMA 24

2.11 Zellkultur 24

2.12 Generierung der DNA- Sonden für Northern Blot - Hybridisierungen 25

2.13 RNA–Isolation und Fällung 27

2.14 Northern Blot Analysen 27

2.15 RT-PCR 29

2.16 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) 30

3 Ergebnisse 32

3.1 Expression der Wachstumsfaktoren PDGF–AA und PDGF-BB unter Einfluss des terminalen Komplementkomplexes: Untersuchung auf transkriptioneller Ebene 32

3.2 Transkription zweier Splicevarianten von PDGF-AA, Unterschiede im Transkriptionsverhalten beider Varianten und seine Änderung durch den terminalen Komplementkomplex..... 35
3.3 Sekretion von PDGF-BB in den Zellkulturüberstand unter Einfluss des terminalen Komplementkomplexes: Untersuchung auf Proteinebene 38
4 Diskussion 39
5 Zusammenfassung 44
6 Literaturverzeichnis 46
Danksagung 57

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A. bidest	Aqua bidest
ß-ME	ß-Mercapto-Ethanol
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CD 59	Cluster of differentiation 59
cDNA	complementary DNA
CRP	C-reaktives Protein
Crry-Ig	complement receptor-related gene y-Immunglobulin
DAF	decay accelerating factor
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s modified eagle`s medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-LDL	Enzymatisch modifiziertes low density lipoprotein
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
G	Guanin
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphat–Dehydrogenase
GB	Great Britain
Ig	Immunglobulin
IGF	insulin like growth factor
JAK	Januskinase
kB	Kilobasen
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	low density lipoprotein
m	membrane-bound
MAK	Membranangriffskomplex
MAPK	mitogen activated protein kinase

MCP–1	monocyte chemotactic protein–1
MG-Filter	Molekulargewicht-Filter
MHD	Minimale hämolytische Dosis
MOPS	3-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	messenger–Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
NEB-Puffer	NewEnglandBiolab-Puffer
NL	Niederlande
OD	Optische Dichte
ox – LDL	Oxidiertes low density lipoprotein
pAVK	Periphere arterielle Verschlußkrankheit
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	plateled derived growth factor
PI_3	Phosphatidylinositol–3–Kinase
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Azetat
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkriptase
s	soluble
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMC	smooth muscle cell
SSC	Standard Saline Citrate
STAT	signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
T.	Tunica
TAE	Tris Acetat EDTA
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Definition der Arteriosklerose

Unter Arteriosklerose versteht man nach der WHO-Definition die „variable Kombination von Intimaveränderungen (der Arterien), bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ [55]. Im Deutschen werden die Begriffe Atherosklerose und Arteriosklerose synonym verwendet. In den Industrieländern von den USA, von Europa und Teilen Asiens kommt ihr besondere Bedeutung zu, da sie hier in ihrer Manifestation als Koronare Herzerkrankung (KHK) die Haupttodesursache darstellt [14, 13]. Andere, ebenfalls häufige und mit Arteriosklerose assoziierte Erkrankungen sind die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und die zerebrovaskuläre Insuffizienz mit dem ischämischen Hirninfarkt als Folge. Dieser steht nach der KHK und Malignomen in der Todesursachenstatistik bereits an dritter Stelle.

1.2 Morphologie der gesunden Arterienwand

Gesunde Arterien sind aus drei Schichten aufgebaut: Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia (T.externa). Tunica media und Tunica intima werden durch die sogenannte Lamina elastica interna voneinander getrennt. Sie ist bei der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen besonders betroffen. Die Intima besteht aus zwei anatomischen Schichten, die sich in Ihrem Aufbau unterscheiden. Die dem Gefäßlumen zugewandte Lamina fibroelastica, eine Proteoglykanschicht, setzt sich in erster Linie aus Bindegewebe zusammen und enthält einzelne Muskelzellen. Die dort lokalisierten Muskelzellen besitzen sekretorische oder kontraktile Eigenschaften. Muskelzellen vom sekretorischen Typ zeigen ein prominentes endoplasmatisches Retikulum und einen relativ großen Golgi-Apparat. Durch ihre Struktur sind sie zur Synthese und Sekretion von Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Elastin und Proteoglykanen befähigt und induzieren eine Proliferation. Die Muskelzellen vom kontraktilen Typ hingegen, besitzen kleinere Zellorganellen und reichlich Aktin- und

Myosinfilamente im Zytoplasma. Die Zellen kontrahieren sich als Reaktion auf chemische und mechanische Stimuli. In der bis zur Media reichenden Lamina fibromuscularis finden sich Schichten aneinandergereihter Muskelzellen vom sekretorischen Typ [56, 77].

Die Intima menschlicher Arterien kann physiologisch eine unterschiedliche Dicke aufweisen. Regionen, in denen die Intima im Vergleich zu anderen Gefäßwandschichten dick erscheint, bestehen bereits in frühester Kindheit, meist schon ab der ersten Lebenswoche und behindern nicht den Blutfluss [72]. Diese Regionen repräsentieren physiologische Anpassungen der Gefäßwand an spezielle mechanische, hämodynamische Kräfte und werden deshalb adaptive Intimaverdickungen (engl. „adaptive intimal thickenings“) genannt. Sogenannte „exzentrische“ adaptive Intimaverdickungen sind fokale, streng umschriebene Veränderungen, die an Gefäßabgängen und –verzweigungen vorkommen. Im Gegensatz dazu spricht man von einer „diffusen“ adaptiven Intimaverdickung, wenn die Adaptation nicht auf bestimmte Gefäßregionen limitiert ist. Da die adaptiven Intimaverdickungen zu einer vermehrten Lipidakkumulation neigen und eine erhöhte Umsatzrate der Endothel- und Muskelzellen aufweisen, werden diese Regionen als Prädilektionsstellen der Arteriosklerose angesehen [73]. Allerdings führt das alleinige Auftreten dieser morphologischen und funktionellen Veränderungen nicht zu einer Gefäßstenose.

Die Ernährung der Intima und der lumennahen Mediaanteile erfolgt nur durch Diffusion aus dem Gefäßlumen und ist somit unmittelbar von ihrer Dicke abhängig [82]. Die Versorgung der äußeren Mediaanteile und der Adventitia ist durch die Vasa vasorum der Adventitia gesichert [7].

1.3 Morphologie der arteriosklerotischen Läsion

Die arteriosklerotische Läsion wird nach Stary in verschiedene Stadien (Typ I-VI) eingeteilt [73]:

Typ I-Läsionen (**„prefatty streaks“**) sind gekennzeichnet durch intimale Lipoproteinakkumulationen und infiltrierende Monozyten bzw. Makrophagen. Die Makrophagen inkorporieren Lipoproteine und wandeln sich zu Schaumzellen

(engl. „foam cells“) um. In geringer Menge finden sich Lipoproteineinlagerungen auch in glatten Muskelzellen. Bevorzugte Stellen dieser Akkumulation sind Regionen, die eine adaptive intimale Verdickung aufweisen.

In Ergänzung zu den Typ I-Läsionen werden ödematöse, gallertartige Läsionen beschrieben [70, 71]. Sie sind durch ihre aufgelockerte Intimaarchitektur sowie durch erste Ablagerungen von Fibrin und Fibrinogen gekennzeichnet. Diese ödematösen Läsionen werden generell als die ersten Anzeichen der entstehenden Arteriosklerose angesehen.

Typ II-Läsionen (**„fatty streaks“**) beschränken sich nicht auf kleine Zellgruppen, sondern mehrere Schichten von lipidspeichernden Zellen werden sichtbar. In der Lamina fibromuscularis der Intima beginnt die Proliferation glatter Muskelzellen.

Diese beiden Stadien werden noch zu den frühen Läsionen (engl. „early lesions“) gezählt, verursachen keine nennenswerten Gefäßeinengungen und sind meist reversibel, während sich mit den **Typ III**-Läsionen (**„intermediate lesion“** oder **„preatheroma“)** der Übergang in die fortgeschrittenen Stadien (advanced lesions) vollzieht.

Typ III-Läsionen, die immer noch ausschließlich auf die Intima beschränkt sind, sind durch Lipidpartikel, die Triglyzeride, freies Cholesterin und Fettsäuren enthalten, gekennzeichnet. Diese liegen, anders als in den frühen Stadien, v.a. extrazellulär.

Mit der Zerstörung intimaler Strukturen und der Ausdehnung auf mediale Gefäßabschnitte beginnen die Läsionen vom **Typ IV** (**„atheroma“**) . Hierbei gehen Schaumzellen zugrunde, wodurch Lipide freigesetzt werden, was zur Ausbildung eines extrazellulären Lipidkerns (engl. „lipid core“) führt. Neben der Proliferation von intimalen SMCs, beginnen nun auch SMCs der Media, durch Wachstumsfaktoren stimuliert, in die Intima einzuwandern und dort zu proliferieren [3, 22, 62].

Ein Überwachsen mit fibrösem Bindegewebe (engl. „fibrous cap“) definiert die **Typ V**-Läsion (**„fibroatheroma“**). Diese fibröse Kappe trägt zunächst zur Stabilisierung der Läsion bei. Kommt es zur Ruptur der Plaque spricht man von **Typ VI**–Läsion oder **„complicated lesion“.** Kennzeichnend sind

Thrombusformation, Exulzeration und Einblutungen. Diese **Typ VI** –Läsion ist der Grund für klinische Symptome der Arteriosklerose, wie z.B. Myokardinfarkt oder Apoplex.

1.4 Modelle zur Pathogenese der Arteriosklerose

Schon seit Mitte des 19. Jahrhunderts wurden zahlreiche Hypothesen zur Entstehung der Arteriosklerose diskutiert. Da die Arteriosklerose ein Geschehen multikausalen Charakters ist, konnten die in der Vergangenheit aufgestellten Hypothesen bisher nur Teilaspekte beleuchten.

Die Annahme, dass eine Störung des komplexen Zusammenspiels zwischen Gefäßwand und Gerinnungssystem zu einer primären Inkorporation parietaler Mikrothromben in die Gefäßwand führt, wurde von Rokitansky erstmalig im Jahre 1852 postuliert [88]. Virchow vermutete 1856, daß eine Schädigung des Endothels in der Arterienintima die Atherogenese initiiert [84]. 1973 entwickelte Ross die „Response-to–injury“-Hypothese [58, 62].

1.4.1 „Response-to–injury“-Hypothese von Russel Ross

Als Schlüsselereignis der Atherogenese gilt dabei eine Störung der funktionellen Integrität des Gefäßendothels („endotheliale Dysfunktion“). Mögliche Ursachen dieser Dysfunktion sind erhöhte und modifizierte LDL-Plasmaspiegel, freie Radikale, hervorgerufen durch Zigarettenrauchen, Bluthochdruck und Diabetes mellitus, sowie infektiöse Mikroorganismen wie Chlamydia pneumoniae oder Herpesviren [62]. Als Folge davon, ist das Endothel nicht mehr in der Lage, seine physiologische Funktion aufrechtzuerhalten, und es kommt zu folgenden, die normalen homöostatischen Fähigkeiten des Endothels verändernden Reaktionen:

- Adhäsionserhöhung des Endothels für Leukozyten und Thrombozyten
- Permeabilitätserhöhung insbesondere für Lipoproteine
- Entwicklung prokoagulatorischer statt antikoagulatorischer Fähigkeiten
- Bildung vasoaktiver Moleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren

Es resultiert eine inflammatorische Reaktion des Gewebes, die chronische Entzündung bewirkt eine Dilatation der Arterienwand, wobei das Lumen anfangs noch unverändert bestehen kann [29].

1.4.2 „Oxidized LDL“-Hypothese von Daniel Steinberg

Die Vermutung, daß eine oxidative Modifikation von LDL in der Gefäßwand eine wichtige Rolle für die Genese arteriosklerotischer Läsionen darstellt, wurde von D. Steinberg erhoben [74]. Anfänglich kam das Interesse an oxidativ modifiziertem LDL (Ox-LDL) auf, nachdem Beobachtungen zeigten, das eine Modifikation von LDL-Partikeln durch glatte Muskelzellen, Endothelzellen oder Inkubation mit einem Schwermetallion wie Kupfer, zu einer gesteigerten Aufnahme dieser modifizierten LDL-Partikel durch Makrophagen führt. Es wurde gezeigt, dass es sich bei dieser zellinduzierten LDL-Modifikation um eine oxidative Modifikation handelt. Biochemisch handelt es sich um eine Peroxidation und Fragmentation der Lipidkomponenten von LDL und eine Modifikation und oxidative Degradation des Apolipoprotein-Anteils im LDL. In zahlreichen Studien wurden seitdem Befunde gesammelt, die die Rolle von Ox-LDL als atherogenen Faktor betonen:

- Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen können LDL in vitro oxidieren [91].

- Minimal oxidiertes LDL ist in vitro chemotaktisch für Monozyten und stimuliert die Transkription und Sekretion von MCP-1 [91].

- Modifikation von LDL-Partikeln durch Endothelzellen oder glatte Muskelzellen führt zu einer gesteigerten Aufnahme dieser Partikel durch Makrophagen via Scavenger-Rezeptor [37].

- Immunzytochemische Untersuchungen demonstrierten oxidierte LDL-Epitope in arteriosklerotischen Plaques und eine biochemische Ähnlichkeit von Plaque – Lipiden mit in vitro oxidiertem LDL [91, 96]. In tierexperimentellen Modellen wurde gezeigt, daß Antioxidantien wie Probucol und butyliertes Hydroxytoluen die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen zu hemmen vermögen [17, 18].

- Minimal modifiziertes/oxidiertes LDL induziert die Expression von Oberflächenmolekülen auf Endothelzellen. Dies führt zu einer

vermehrten Monozytenadhäsion an das Endothel und zu einer deutlich gesteigerten endothelialen Ausschüttung chemotaktischer Faktoren [6].

Trotz dieser Vielzahl an Befunden gerät die „Oxidized-LDL“-Hypothese zunehmend in die Kritik. Klinische Studien mit Antioxidantien zur Behandlung der Arteriosklerose brachten keinen nennenswerten Erfolg. Auch die tierexperimentellen Untersuchungen zeigten keine einheitliche Tendenz. In den letzten Jahren hat sich im Gegensatz zur oxidativen LDL-Modifikation eine alternative Idee zur Modifikation von LDL in der Arterienwand entwickelt. Bhakdi et al. [9] gelang es nachzuweisen, daß enzymatisch modifiziertes LDL (E–LDL) für die Plaqueentstehung bedeutsam sein könnte. Eine enzymatische Transformation mit einer Kombination aus Trypsin, Cholesterolesterase und Neuraminidase verleiht LDL–Partikeln atherogene Eigenschaften [11]. Im Gegensatz zu Ox–LDL fusionieren E–LDL-Partikel in vitro und bilden große Lipidpartikel. Dies erklärt möglicherweise in vivo Darstellungen fusionierender LDL–Partikel, die in der frühen Atherogenese subendothelial lokalisiert sind. E–LDL wird schneller als acetyliertes und oxidiertes LDL von Makrophagen aufgenommen. Darüberhinaus aktiviert E–LDL das Komplementsystem und könnte so ein Schlüsselglied in der Kausalkette der Arteriosklerose sein.

Auf einer klonalen Proliferation glatter Muskelzellen stützt sich die **„monoclonal hypothesis“** von E. P. Benditt und J. M. Benditt aus dem Jahre 1973 [4]. Sie wiesen anhand der Isoenzyme der Glucose–6–Phosphat–Dehydrogenase nach, dass bei der Bildung arteriosklerotischer Plaques eine monoklonale Proliferation glatter Gefäßwandmuskulatur erfolgt.

Die **„clonal senescence hypothesis“** von G. M. Martin und C. A. Sprague 1972/73 [48] beschreibt den Verlust der physiologischen Wachstumsinhibition als Ursache einer unkontrollierten Proliferation glatter Muskelzellen.

1.5 Arteriosklerose als entzündliche Erkrankung

Aufgrund zahlreicher experimenteller Ergebnisse der jüngsten Vergangenheit wird die Arteriosklerose heute als Entzündungsreaktion angesehen [62]. Immunhistologische Untersuchungen arteriosklerotischer Läsionen zeigen Auffälligkeiten chronischer Entzündungsprozesse, wie sie bei rheumatoider Arthritis oder chronischer Pankreatitis auftreten. Wie oben bereits erwähnt, beginnt die Erkrankung mit der endothelialen Dysfunktion aufgrund pathogener Reize, z.B. kardiovaskulärer Risikofaktoren. Hierauf folgt eine entzündliche Reaktion, die von Makrophagen und T-Lymphozyten, von der Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, sowie von der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen bestimmt ist [45, 53]. Eine vermehrte Bildung extrazellulärer Matrix führt zum bindegewebigen Umbau im entzündeten Abschnitt der Gefäßwand. Die Wichtigkeit der zellulären Immunabwehr, in erster Linie Monozyten und T-Lymphozyten, ist seit langer Zeit unbestritten. Daß jedoch auch die humorale Immunabwehr in der Pathogenese der Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielt, wird erst in den letzten Jahren immer deutlicher. Insbesondere das C–reaktive Protein und das Komplementsystem scheinen in den Prozess der Atherogenese involviert zu sein. Neuere epidemiologische Studien zeigen in diesem Zusammenhang, daß erhöhte Serumspiegel von Akute–Phase–Proteinen wie C-reaktives Protein (CRP), Fibrinogen oder Serumamyloid A mit steigendem Risiko, kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln, einhergehen können [54]. Gleichzeitig erhöhte Spiegel von LDL und CRP steigern das Risiko extrem [33, 40, 46]. Die Kolokalisation von CRP, welches Aktivator der Komplementkaskade ist, mit dem terminalen Komplementkomplex (C5b–9) in der frühen arteriosklerotischen Läsion, zeigten Torzewski et al. 1998 [80]. Als Hinweis auf eine frühe Aktivierung der Komplementkaskade in der Arterienwand konnte außerdem immunhistochemisch der terminale Komplementkomplex zusammen mit glatten Muskelzellen nachgewiesen werden [81].

1.6 Die Rolle des Komplementsystems in der Arteriosklerose

1.6.1 Aufbau und Funktion des Komplementsystems

Die Entdeckungsgeschichte der Komplementfaktoren als wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr des Menschen begann Ende des 19. Jahrhunderts. Man fand heraus, dass zwei Substanzen zum Abtöten von Bakterien nötig waren. Die eine war hitzestabil und nur in immunisiertem Serum zu finden, die andere Substanz war hitzelabil und auch ohne vorherigen Antigenkontakt im Serum nachweisbar. Sie war also die unspezifische Komponente der Immunabwehr. Der hitzestabile Faktor erwies sich als Antikörper, während die thermolabile Substanz als Komplement bezeichnet wurde, weil sie die Wirkung der Antikörper ergänzte. Es stellte sich heraus, daß Komplement kein einzelner Stoff ist, sondern aus einem System aus mehr als 20 Proteinen besteht. Durch bestimmte Signale oder Stoffe initiiert, aktivieren sich die Komplementfaktoren kaskadenartig in einer festgelegten Reihenfolge.

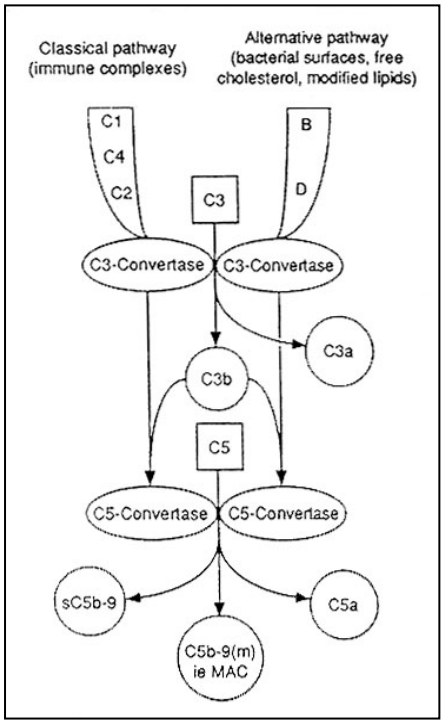

Abb. 1: Der alternative und der klassische Weg der Komplementaktivierung und die Formation des Membranangriffskomplexes (MAK) [79].

Es zeigte sich eine durch Antikörper und CRP [20, 43, 80, 87, 92] ausgelöste Aktivierung, der klassische Reaktionsweg, sowie eine durch Bindung gewisser Partikel, z.B. Zellwände von Mikroorganismen, Lipide oder Cholesterin [1, 8, 31, 66, 79, 85] getriggerte Aktivierung, der alternative Reaktionsweg. Der klassische Weg beginnt hintereinander mit den Faktoren C1, C4, C2 und C3. C1 besitzt drei Untereinheiten. Nämlich C1q, welches die Kaskade in Gang setzt, C1r, das C1s aktiviert, welches wiederum C4 und C2 spaltet. Startermolekül des alternativen Weges ist C3. Mit Hilfe der Faktoren B und D kommt es zur C3– und letztlich zur C5–Aktivierung. Erst in den letzten Jahren konnte sich ein dritter Weg zur Komplementaktivierung etablieren, welcher durch Bindung des Mannose–bindenden Lectins an Mikroorganismen initiiert wird. Es kommt zu einer Spaltung von C4 und C2 und anschließend zu einer C3–Aktivierung, ähnlich dem

klassischen Reaktionsweg [76]. Diese verschiedenen Wege besitzen eine gemeinsame Endstrecke, an deren Ende ein Komplex aus mehreren Komplementfaktoren steht, der Membranangriffskomplex (MAK) oder auch der terminale Komplementkomplex C5b-9.
Während des Ablaufs der Komplementkaskade entstehen eine Vielzahl proinflammatorischer Moleküle, z.B. die Anaphylatoxine C3a und C5a, die Entzündungszellen aktivieren, die Permeabilität der Gefäßwand erhöhen und die Kontraktion glatter Muskelzellen verursachen [24]. Außerdem entsteht C3b, welches die Opsonierung von Partikeln begünstigt. C3b und C4b bewirken zudem eine Erhöhung der Antikörperantwort und eine Steigerung des immunologischen Gedächtnisses.

Das Zielmolekül der Komplementkaskade ist der Membranangriffskomplex C5b-9. Findet die Komplementaktivierung an der Zelloberfläche statt, entsteht ein membranständiger Komplex (mC5b–9). Fehlt hingegen eine Zielmembran, bilden sich wasserlösliche sC5b–9–Komplexe, deren Funktion weitgehend unbekannt ist [8, 79]. Membranständiges C5b–9 ist ein porenbildendes Zytotoxin, das durch eine Verschiebung der Elektrolythomöostase verschiedene Wirkungen auf die Zielzelle haben kann. Während nicht kernhaltige Erythrozyten durch den MAK lysiert werden [42], bleibt bei kernhaltigen Zellen eine Lyse aus. Ionenpumpen, die dem Wasser– und Calciumeinfluss entgegenwirken und Mechanismen zur schnellen Entfernung von C5b–9–Molekülen von der Zelloberfläche verhindern hier die Lyse [49, 69]. Die Reaktion kernhaltiger Zellen ist charakterisiert durch Zytokin-, Chemokin– und Mitogenfreisetzung, also durch inflammatorische Prozesse [5, 47, 49, 51, 78, 79]. Es findet eine Erhöhung der Genexpression dieser Stoffe statt, die durch den terminalen Komplementkomplex induziert wird [49, 51].

1.6.2 Komplement und Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung [62]. Eine Vielzahl experimenteller Untersuchungen, v.a. in den letzten 10 bis 15 Jahren belegt, dass die Atherosklerose die Folge eines chronischen Entzündungsprozesses ist, der durch die Aktivierung von Makrophagen, T–Lymphozyten und Komplement hervorgerufen wird. Es wurden in der Atherogenese ähnliche Mechanismen beobachtet wie bei Erkrankungen mit immunologischer und entzündlicher Pathogenese, wie z.B. Glomerulosklerose und rheumatoide Arthritis [62].

Doch auch schon zuvor wurde das Komplementsystem mit der Atherosklerose in Verbindung gebracht. Eine Komplementaktivierung und einzelne Komplementfaktoren konnten in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden. Es zeigten sich gemeinsame Ablagerungen von Immunglobulinen (IgG, IgA, IgM) und Komplementfaktoren [86] in atherosklerotischen Gefäßwandläsionen. Zudem kommt es zu einer lokalen Hochregulation von Komplementfaktoren in atherosklerotischen Plaques, wohingegen Komplementinhibitoren nicht erhöht sind [93].

Aktivatoren des Komplementsystems sind zum einen das C–reaktive Protein, das sich zusammen mit Komplementfaktoren in der arteriellen Gefäßwand anhäuft [80, 94], sowie zum anderen das enzymatisch modifizierte LDL (E-LDL) [9, 10]. Beide sind möglicherweise Schlüsselmoleküle der Atherogenese.

Ein wichtiger Angriffspunkt des terminalen Komplementkomplexes sind glatte Muskelzellen und auch Endothelzellen. Vor allem betroffen sind die SMCs, da sie das CD 59-Molekül, das vor einem Komplementangriff schützt, nicht exprimieren [67, 69].

Der C5b–9-Komplex stimuliert die SMC Proliferation in vitro, indem er die MAPK (engl. „mitogen activated protein kinase“) und die Phosphatidylinositol 3–Kinase (PI_3 –Kinase) aktiviert [51]. Ausserdem aktiviert er verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege, z.B. Januskinase 1 und STAT 3 [51], was letztlich zu einer erhöhten DNA–Synthese und Zellproliferation führt. Zu einer Freisetzung von bFGF (engl. „basic fibroblast growth factor“) und PDGF (engl. „plateled derived growth factor”) kommt es nach C5b–9–Angriff auf Endothelzellen [5]. Lovett et al. und Morgan zeigten in ihren Untersuchungen, daß der terminale Komplementkomplex auch Wachstumsfaktorsysteme anderer Zelltypen, wie z. B. glomerulärer Mesangiumzellen, aktiviert [47, 49].

Auch Tierversuche beschreiben eine Beteiligung des Komplementsystems an der Pathogenese der Atherosklerose: 1970 stellten Geertinger und Soerensen fest, dass injiziertes komplementreiches Meerschweinchenserum, im Vergleich zu komplementinaktiviertem Serum, bei Mäusen eine Vit D–induzierte Atherosklerose deutlich verstärkte [27]. Für einen zusätzlichen Hinweis sorgten 1977 weitere Tierversuche dieser Forschungsgruppe, in denen eine Reduktion der

atherosklerotischen Veränderungen in C6–defizienten Kaninchen bei diätinduzierter Atherosklerose gezeigt werden konnte [28], was 1998 durch einen ähnlichen Versuchsansatz in einem größeren Kollektiv bestätigt wurde [65]. Dass Komplement nicht nur bei der Progression, sondern auch zu Beginn der Atherogenese eine Rolle spielt, zeigen die Kolokalisation von C5b–9 und α-Aktin glatter Muskelzellen in der frühen Läsion [81] und die Freisetzung von MCP-1 (engl. „monocyte chemotactic protein“) durch SMC nach C5b–9–Angriff in vitro [78], was einen Mechanismus in der Monozytenrekrutierung darstellen könnte. Weiterhin wirkt C5b-9 mitogen auf humane aortale SMCs, deren Zellzahl sich nach einem Angriff mit dem MAK verdoppelt [51]. Neben der Monozytenrekrutierung wird also auch der zweite wesentliche Punkt der Atherogenese, die Proliferation glatter Muskelzellen, von Komplement beeinflusst.

Die Gesamtheit dieser Studien zeigt, dass das Komplementsystem verschiedene Prozesse, sowohl bei der Entstehung als auch beim Fortschreiten der atherosklerotischen Läsion beeinflussen kann und deshalb zusammen mit der Monozyten–und T–Lymphozytenaktivierung als wichtiger inflammatorischer Faktor der Atherosklerose angesehen werden kann.

1.7 Wachstumsfaktoren in der Atherogenese

Wachstumsfaktoren sind körpereigene Substanzen, die Wachstum und Chemotaxis ihrer Zielzellen durch Genaktivierung modulieren [89].

Sie bewirken einen Übertritt der Zellen von der G0 in die G1-Phase des Zellzyklus [75]. Wachstumsfaktoren entfalten ihre Wirkung durch Bindung an spezifische, hochaffine Rezeptoren, die auf der Oberfläche ihrer Zielzellen exprimiert werden und eine Liganden-stimulierbare Thyrosin-Kinase Aktivität besitzen. Diese Kinasen autophosphorylieren den Rezeptor, was die Bindung und nachfolgend die Aktivierung mehrer intrazellulärer Proteine erleichtert und so verschiedene Signaltransduktionswege kontrolliert [15, 23].

Viele vaskuläre Erkrankungen sind durch eine abnormale Akkumulation von SMCs in der T.intima charakterisiert. Dieser Prozess ist zum Teil Folge der Migration dieser Zellen von der T.media in die Intima [21, 61]. Eine Reihe an Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderen bioregulatorischen Molekülen wird für dieses Phänomen verantwortlich gemacht. Neben dem bFGF (engl. „basic fibroblast

growth factor“) sind das PDGF-System (engl. „plateled derived growth factor“) und das IGF-System (engl. „insulin-like growth factor“) von maßgeblicher Bedeutung.

PDGF ist einer der potentesten Chemoattraktoren für SMCs [30]. In atherosklerotischen Plaques läßt sich eine vermehrte Expression von PDGF und seinem Rezeptor nachweisen [44, 59, 63, 90].

PDGFs sind eine Familie eng verwandter kationischer Glykoproteine, die als Homo- und Heterodimere aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten (A- und B-Ketten) drei Isoformen bilden: PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB.

Bei der PDGF-AA-Kette ist ein alternatives Splicing bekannt, das in zwei verschiedene Proteinprodukte resultiert. Eine Variante wird von einem Transkript codiert, das Exon 6 enthält (PDGF-AA_l), während der anderen Variante (PDGF-AA_s) Exon 6 fehlt [57]. PDGF-AA_l ist über Heparansulfatproteoglykane mit Zellmembranen und extrazellulärer Matrix assoziiert [2], während die kürzere Variante löslich ist und ins Medium sezerniert wird [52].

PDGF vermittelt seine spezifischen zellulären Effekte über zwei gut untersuchte Rezeptoren, den α-Rezeptor und den β-Rezeptor. Der α-Rezeptor bindet alle drei Isoformen von PDGF mit hoher Affinität. Der β-Rezeptor bindet nur PDGF-BB und mit zehnfach geringerer Affinität PDGF-AB [34]. Beide Rezeptoren liegen im inaktiven Zustand als Monomere vor.

Die Bindung des Liganden führt zur Dimerisation der Rezeptoren. Diese Dimerisation ist von einer Konformationsänderung der intrazellulären Rezeptordomäne begleitet, was die Autophosphorylierung bzw. Transphosphorylierung des Rezeptors gestattet und so die Tyrosinkinase aktiviert. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zur Internalisierung und lysosomalen Degradation des Rezeptors [19].

Glatte Muskelzellen exprimieren beide Rezeptorformen, aber die Expression des β-Rezeptors ist höher als die des α-Rezeptors [19]. Dieses Verhältnis verschiebt sich in entzündlich veränderten Geweben wie in arteriosklerotischen Plaques, noch stärker in Richtung der β-Rezeptoren [35, 60, 64].

Sowohl PDGF-AA und PDGF-BB sind involviert in die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen [61]. Allerdings wirkt PDGF-BB stärker mitogen auf vaskuläre SMCs als PDGF-AA [39, 41]. Dieser mitogene Effekt erfolgt entweder über einen autokrinen Mechanismus, d.h. die Zellen exprimieren PDGF und gleichzeitig den korrespondierenden Rezeptor oder über einen parakrinen Mechanismus, bei dem die Zellen nur den Rezeptor oder nur den Liganden exprimieren und der die gegenseitige Stimulierung mehrerer Zelltypen erfordert.

Wachstum und Migration vaskulärer SMCs als kritische Ereignisse in der Pathogenese der Arteriosklerose werden also vom Zusammenspiel der PDGFs und ihrer Rezeptoren kontrolliert.

1.8 Zielsetzung

Die Hyperplasie von SMCs ist ein wichtiger Schritt der Atherogenese und involviert die Migration vaskulärer SMCs von der Media in die Intima und ihre Proliferation in der Media und Intima. Bei diesen Vorgängen spielen die Wachstumsfaktoren PDGF-AA und PDGF-BB eine Schlüsselrolle. Diese werden entweder von vaskulären Zellen freigesetzt oder gelangen über den Blutstrom an ihren Wirkungsort. Von einer Reihe von Zelltypen ist bekannt, daß sie die Wachstumsfaktoren PDGF-AA und PDGF-BB bilden können. Was allerdings diese Bildung und Freisetzung stimuliert ist noch nicht ausreichend geklärt.

Komplement ist in die Ausbildung arteriosklerotischer Läsionen involviert. Neuere Ergebnisse zeigen, dass der Terminale Komplementkomplex C5b-9 über mehrere Mechanismen das Voranschreiten des Krankheitsprozesses beschleunigt. Der MAK beeinflußt Wachstumsfaktorsysteme in anderen Zelltypen [47, 49] und induziert die Freisetzung von PDGF aus Endothelzellen [5]. Außerdem ist bekannt, dass C5b–9 über einen autokrinen Loop die Proliferation glatter Muskelzellen anregt.

Um nun einen Zusammenhang zwischen dem neuen pathogenetischen Konzept der Komplementaktivierung und der etablierteren Hypothese der Wachstumsfaktoraktivierung zu finden, sollen in dieser Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

1. **Ist die Transkription von PDGF-AA und -BB durch humanes C5b-9 stimulierbar? – Die Analyse erfolgte auf RNA-Ebene**

2. **Werden beide Splicevarianten des PDGF-AA transkribiert, wird eine Variante bevorzugt und ist dies durch Komplement beeinflussbar?**

3. **Wird PDGF-BB durch Stimulation mit C5b-9 in den Überstand sezerniert? – Die Analyse erfolgte auf Proteinebene**

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Cross-Linker (Fluo-Link FLX)	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Hybridisierungsofen	Heraeus, Hanau
Hybridisierungsröhrchen	Biometra, Göttingen
Image Master VDS	Pharmacia Biotech, Freiburg
Laminar Air Flow Bench	Heraeus, Hanau
Photometer (DU 640)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Röntgenkassette	MS Laborgeräte, Heidelberg
Säulen-Chromatograph	Pharmacia Biotech, Freiburg
Spannungsgerät	Biometra, Göttingen
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Zentrifuge	Heraeus, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschläuche	Spectrum Laboratories, Breda, NL
Nylonmembran (Hybond-N)	Amersham, Braunschweig
Reaktionsgefäße 15ml und 50ml	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße 0,2µl, 0,5ml und 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm	Amersham, Braunschweig
Sterilfilter	Schleicher&Schuell, Dassel
Whatman Filterpapier	Whatman Ltd., Maidstone, GB
Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen

2.3 Kits

ELISA-System	Quantikine, R&D Systems
Hot Star Taq Master Mix	Qiagen, Hilden
Omniscript Reverse Transcriptase Kit	Qiagen, Hilden
QIA quick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIA shredder	Qiagen, Hilden
Rediprime Labelling Kit	Amersham, Braunschweig
Rneasy mini Kit	Qiagen, Hilden

2.4 Zellkulturmedium und Zusätze

Dulbecco`s modified eagle`s medium (DMEM)	Gibco, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Eggenstein
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein

2.5 Reagenzien

Agarose	Boehringer, Mannheim
ß-Mercapto-Ethanol (ß-ME)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA Fraction V	Sigma, Deisenhofen
DEAE Sephacel	Pharmacia Biotech, Freiburg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ethanol, 99,5 %	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
G 200 Sephadex	Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycogen	Sigma, Deisenhofen
Kaliumacetat	Fluka, Basel

Methylenblau	Merck, Darmstadt
3-Morpholino-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	J.T.Baker, Deventer, Holland
Natriumdihydrogenmonophosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN Biomedicals
Polyvinylpyrrolidon	Sigma, Deisenhofen
Tri-Sodium Citrat	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom KG, Berlin

2.6 Primer, Nukleinsäuren und Plasmide

2.6.1 Primer

Als Primer für die GAPDH-Sondenamplifizierung dienten folgende Sequenzen:

Sense: 5`-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC G–3`

Antisense: 5`-CTC CTG GAA GAT GGT GAT-3`

Für die PDGF A-PCR wurden folgende Sequenzen als Primer benutzt:

Sense: 5`-CTC CCG CGT CCA CCA CCG CAG CGT C-3`

Antisense: 5`-GCT GCG GCA CAT CCT CAC CTC A-3`

Sie wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg hergestellt.

2.6.2 Nukleinsäuren

DNA aus Lachssperma	Amersham, Braunschweig
DNA-Längenstandard (1kB DNA-Ladder)	Gibco, Eggenstein

2.6.3 Plasmide

Alle Plasmide wurden mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Nikolaus Marx zur Verfügung gestellt.

pUC19:

Das Plasmid enthält das 1,8kB große Insert mit der Gensequenz von PDGFA, welches durch Restriktion mit EcoRI und SACII isoliert wurde. Es diente als PDGF AA-spezifische DNA-Sonde für Northern-Blot-Hybridisierungen.

Ein weiteres pUC19-Plasmid enthielt das 2,2kB große Insert mit der Gensequenz von PDGF BB. Die Isolation erfolgte durch Restriktion mit EcoRI und PSTI. Es diente als PDGF BB-spezifische DNA-Sonde für Northern-Blot-Hybridisierungen.

2.7 Restriktion

Restriktionsenzyme EcoRI, SACII und PSTI	NewEnglandBiolab, Frankfurt
Restriktionspuffer NEB 3, NEB-Puffer für EcoRI	NewEnglandBiolab, Frankfurt

2.8 Lösungen

10x PBS

80g NaCl

2g KCl

10,85g Na_2HPO_4

2g KH_2PO_4

A. bidest ad 1l

pH 7,4

Filtrieren und autoklavieren

10x Gellaufpuffer

0,2M MOPS (pH 7,0)

80mM NaAc

10mM EDTA (pH 8,0)

steril filtrieren

50x TAE

242g Tris-Base

57,1ml Essigsäure

100ml 0,5M EDTA (pH 8,0)

A. bidest ad 1l

Gelladepuffer

50% (v/v) Glycerol

1mM EDTA (pH 8,0)

0,25% (w/v) Bromphenolblau

20x SSC

88,23g Tri-sodium Citrat

175,32g NaCl

A. bidest ad 1l (pH 7,0)

Kaltwaschlösung

50ml 20x SSC

50ml 10% (w/v) SDS

A. bidest ad 1l

Heißwaschlösung

10ml 20x SSC

200ml 10% (w/v) SDS

A. bidest ad 1l

Hybridisierungslösung

250ml Formamid deion.

125ml 20x SSC

50ml 10% (w/v) SDS

20ml Denhardt (50x)

25ml Na-Phosphat

10ml Lachs-DNA

Na-Phosphat

13,8g NaH_2PO_4 in 200ml H_2O (pH 4,0)

17,8g Na_2HPO_4 in 200ml H_2O (pH 9,0)

Na_2HPO_4-Lösung mit Na_2HPO_4-Lösung auf pH 7,0 einstellen

ssDNA

10g ssDNA/l A. bidest lösen, 12h bei 37°C inkubieren und durch Kanüle scheren

Denhardt 50x

5g Ficoll 400

5g Polyvinylpyrrolidon

5g BSA Fraction V

A. bidest ad 500ml und steril filtrieren

Methylenblau

0,5M Natriumacetat (pH 5,2)

0,04% (w/v) Methylenblau

Puffer A

10mM Phosphat

5mM Natriumazid

50mM Natriumchlorid

25% Glycerol

pH 7,0

Puffer B

10mM Phosphat

5mM Natriumazid

250mM Natriumchlorid

25% Glycerol

pH 7,0

Puffer C

10mM Phosphat

10mM Natriumazid

0,5M Natriumchlorid

pH 7,2

2.9 Isolierung des C5b-9 Komplexes

2.9.1 Probengewinnung

C5b6, die aktive Vorstufe des terminalen Komplementkomplexes wird im Rahmen einer Akute–Phase-Reaktion im Blutserum von Wöchnerinnen vorgefunden [26]. Deshalb wurde Wöchnerinnen am 4. Tag post partum, welche ein physiologisches Stressereignis darstellt, 40ml Vollblut entnommen.

2.9.2 Probenaufbereitung

Die während einer Akute–Phase–Reaktion im Überschuss gebildeten Komplementfaktoren C5 und C6 können z.B. durch Zymosan aktiviert werden, und es folgt die Bildung des C5b–9-Komplexes. Bei dieser Reaktion werden die einzelnen Komplementfaktoren verbraucht. Dies betrifft v.a. die Faktoren C7, C8 und C9. C5 und C6 hingegen liegen im Überschuss vor und bilden die aktive Vorstufe C5b6, welche aufgrund des Verbrauchs nicht weiter zu C5b–9 reagieren kann. Erst durch Zugabe der Faktoren C7, C8 und C9 kann in vitro der membranständige C5b–9-Komplex auf SMCs gebildet werden.

Durch Zentrifugation bei 1000g für 5 Minuten, wurde aus dem Vollblut das Serum isoliert. Um zu testen, ob die Serumprobe ausreichende Mengen an C5b6 enthält, wurde ein 0,5ml Aliquot mit 5mg Zymosan A für 1,5 Stunden bei 37 °C aktiviert. Nach der Aktivierung wurde das Zymosan durch Zentrifugation (fünf Minuten bei 2000g) entfernt. 2µl des Überstandes wurden auf ein 10% (v/v) Erythrozyten-2% (w/v) Agarosegel aufgetragen und gegen 2µl humanes AB-Serum bei 37°C inkubiert. Zur Herstellung des Gels wurde Agarose aufgekocht, mit PBS/EDTA/Azid versetzt und in PBS gewaschene, humane Erythrozyten zugegeben. Bei ausreichender Aktivität von C5b6, konnten nach vierstündiger Inkubationszeit bei 37°C, hämolytische Sicheln zwischen den beiden Substanzen beobachtet werden. Diese belegten, dass C5b6 mit den Faktoren C7, C8 und C9 aus dem AB–Serum einen Membranangriffskomplex bilden konnte, der zur Hämolyse der Erythrozyten führte. Nun konnte die Aktivität der gesamten Serumprobe in gleicher Weise getestet werden.

Zur weiteren Konzentrierung von C5b6 wurde der pH der Serumprobe auf 5,4 titriert. Dann folgten drei Dialyseschritte:

1. Eine Stunde gegen 4°C kaltes A. bidest
2. 24 Stunden gegen 5mM Phosphatpuffer (pH 5,4), der mehrfach ausgewechselt wurde. Hierbei fielen verschiedene Serumproteine, sog. Euglobuline aus, darunter C5b6, C8 und C9. Diese Euglobuline wurden für zehn Minuten bei 1200rpm abzentrifugiert und das Pellet in 1xPBS/10mmol Natriumazid resuspendiert. Ein Aliquot der Resuspension wurde, wie oben beschrieben, auf ein Testgel aufgetragen.
3. Die Resuspension wurde zuletzt weitere 24 Stunden gegen 1xPBS/10mmol Natriumazid dialysiert und, wie oben, zentrifugiert, wobei hier der Überstand, der nun C5b6, C8 und C9 enthielt, weiterverwendet wurde.

Sämtliche Dialyseschritte fanden bei 4°C statt. Die Dialyseschläuche wurden vor Gebrauch in 1mM EDTA gekocht und auf pH 8,0 eingestellt.
Durch den oben beschriebenen Prozess wurde das C5b6 konzentriert und Fremdproteine wurden entfernt.
Mittels Säulenchromatographie wurden die Euglobuline durch Anionenaustausch auf DEAE-Sephacel-Säulen nach ihrer Ladung aufgetrennt. Hierfür wurde die Säule in einem bestimmten Puffer A (Zusammensetzung siehe Kap. 2.8.) äquilibriert. Nach ca. zwei Stunden wurde ein zweiter Puffer B (Zusammensetzung siehe Kap. 2.8.) zugeschaltet und dessen Konzentration kontinuierlich erhöht, bis die Salzkonzentration ein Maximum von 250mM erreichte. So wurden die einer bestimmten Salzkonzentration entsprechenden Fraktionen der Euglobuline eluiert und konnten erneut auf ein Testgel gegeben werden. Die C5b6-positiven Fraktionen wurden durch Ultrazentrifugation mit Centricons 10 000 MG aufkonzentriert.
Da C5b6 zusammen mit C9 eluiert wird, wurden sie auf G-200 Sephadex-Säulen nach Molekülgröße fraktioniert. Der dabei verwendete Puffer C (Zusammensetzung siehe Kap. 2.8.) hatte eine hohe Salzkonzentration. So wurde das niedermolekulare C5b6 aus der Säule ausgewaschen und konnte auf einem Testgel identifiziert werden. Nach erneuter Ultrazentrifugation mit Centricons erhielt man konzentriertes C5b6.
C7, C8 und C9 wurden käuflich erworben (Sigma, Deisenhofen).

2.9.3 Bestimmung der Aktivität und der Äquivalenzdosis

Die Aktivität des gewonnenen C5b6 wurde durch Titration mit Meerschweinchenerythrozyten bestimmt.

Zuerst wurde eine Verdünnungsreihe von C5b6 zwischen 1:100 und 1:25 000 mit 1xPBS in 100µl Gesamtvolumen angesetzt. Anschließend wurden jeweils 50µl einer 1% (v/v) Erythrozytensuspension dazugegeben und der Komplementangriff (siehe Kap. 2.9.4.) durchgeführt. Die C5b6-Konzentration, bei der die letzte sichtbare Hämolyse (Lösung wird klar) erfolgte, wurde zur Berechnung der Aktivität herangezogen. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

Aktivität (1MHD) = Volumen (100µl) x Konzentration

Eine MHD (minimale Hämolysedosis) ist definiert als die Menge C5b6, die nötig ist, um 50 µl einer 1% Erythrozytensuspension zu lysieren.

Die Äquivalenzdosis von C7 zu C5b6 wurde ebenfalls durch Titration mit Meerschweinchenerythrozyten bestimmt. Hierfür wurde eine zweite Verdünnungsreihe von C5b6 angesetzt, zu der jeweils C7 in einer Verdünnung von 1:2000 pipettiert wurde. C5b6 bindet an C7 und wird so inaktiviert, da nur C5b6 allein an der Erythrozytenoberfläche inserieren kann. Je geringer die Verdünnung, desto mehr freies und somit aktives C5b6 bleibt nach der Zugabe von C7 erhalten.

Nun wurden 50µl einer 1% Erythrozytensuspension zugegeben und danach erfolgte wieder der Komplementangriff mit C7, C8 und C9. Auch hier wurde die Verdünnung, in der die letzte sichtbare Lyse stattfand, zur Berechnung herangezogen.

Der Quotient aus der entsprechenden C5b6-Konzentration und dem Verdünnungsfaktor von C7 ergibt die Äquivalenzdosis.

2.9.4 Angriff mit dem terminalen Komplementkomplex

Vor der Stimulierung mit dem terminalen Komplementkomplex wurden die Zellen zwölf Stunden in 1% FCS/DMEM ausgehungert.

Zuerst wurde C5b6 zum Kulturmedium pipettiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubation wurde C7 zugegeben, und nach weiteren fünfzehn Minuten erfolgte die Zugabe von C8 und C9 im Überschuss.

2.10 Stimulation mit PMA

Als Positivkontrolle im Northern Blot diente RNA aus Zellen, die mit PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat) stimuliert wurden. Dieser Stoff bewirkt, dass in hohem Maße PDGF mRNA transkribiert wird. Auch hier wurden die Zellen vor der Stimulierung in 1% FCS/DMEM ausgehungert.
Die Stimulation erfolgte mit einer Konzentration von 100ng PMA/ml Medium.

2.11 Zellkultur

2.11.1 Isolierung der glatten Gefäßmuskelzellen (SMC)

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden aus humaner Arteria mammaria interna isoliert. Hierzu wurde die Arterie unter sterilen Bedingungen zuerst vom umgebenden Gewebe und von der Endothelschicht befreit. Anschließend wurde das Gefäß in ca. 2x2mm große Stücke geschnitten und jeweils 4 dieser Stückchen wurden pro Loch einer 6-well Platte in 20% FCS/DMEM/10% Penicillin, Streptomycin ausplattiert. Bei 37°C und 5% CO_2 benötigten die Zellen ein bis drei Wochen um auszuwachsen.

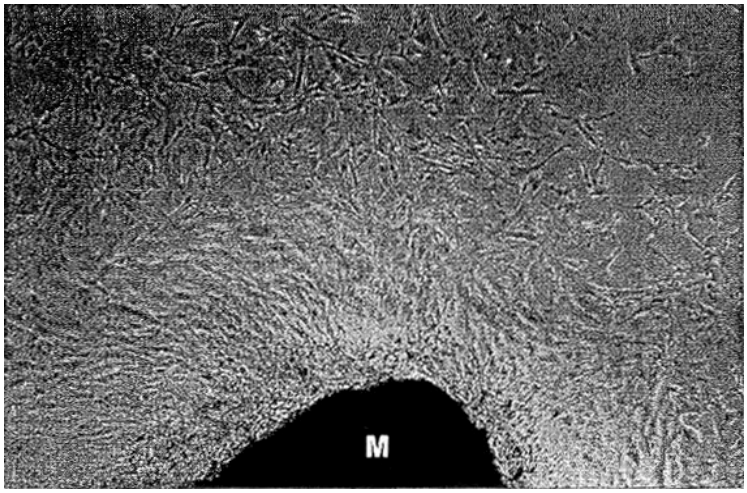

Abb. 2: Aus einem Arteria mammaria Explantat (M) auswachsende glatte Muskelzellen (Vergrößerung 4-fach)

Um sicherzustellen, dass es sich bei den ausgewachsenen Zellen um glatte Muskelzellen handelt, wurde eine α-Aktin-Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen auf Deckgläsern kultiviert und mit PBS gewaschen. Danach erfolgte ihre Fixierung mit -20°C kaltem Methanol. Nach Spülen mit PBS wurden die Zellen mit

einem gegen α-Aktin gerichteten Anti-Maus IgG-Antikörper (1µg/ml, Progen Biotechnik) 40 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde ein zweiter Antikörper (43µg/ml, Dianova Immunotechnik), der gegen den ersten gerichtet war und an seinem Fc-Fragment einen Fluoreszenzfarbstoff trug, dazugegeben. Die Inkubation geschah wie oben.
Zuletzt wurde das Ergebnis unter dem Auflichtfluoreszenzmikroskop überprüft.

2.11.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in DMEM-Nährmedium mit 20% FCS, Glutamin, Penicillin und Streptomycin (je 100IU/ml) bei 37°C und 5%CO_2 in Zellkulturflaschen kultiviert. Zur Passagierung wurden zu 80% konfluente Zellen durch Trypsinierung vom Schalenboden gelöst. Hierzu wurden die Zellen mit 1x PBS/0,02%EDTA-Lösung gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung ein bis zwei Minuten inkubiert. Danach wurden die gelösten Zellen in Nährmedium aufgenommen, um das Trypsin zu neutralisieren und fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet im Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:4 in neuen Kulturflaschen ausgesät.

2.12 Generierung der DNA- Sonden für Northern Blot - Hybridisierungen

Die Sonden für PDGF-AA und -BB wurden durch Restriktionsenzymspaltungen aus Plasmiden isoliert. Die Restriktion erfolgte nach den Anweisungen des Enzymherstellers. Es wurden 3,1µg der PDGF-AA-Plasmid-DNA und 2,5µg der PDGF-BB-Plasmid-DNA eingesetzt, um die entsprechenden Fragmente zu gewinnen.
Die PDGF-AA-Sonde wurde mit EcoRI und SACII aus dem pUC19-Plasmid geschnitten, während die PDGF-BB-Sonde mit EcoRI und PSTI aus dem pUC9-Plasmid isoliert wurde.
Das Restriktionsprodukt wurde anschließend in einem 1,5% Agarose (w/v), 2% TAE (v/v) Gel aufgetrennt. Nach Anfärben mit 0,025% Ethidiumbromid (v/v) waren jeweils drei Banden zu sehen.

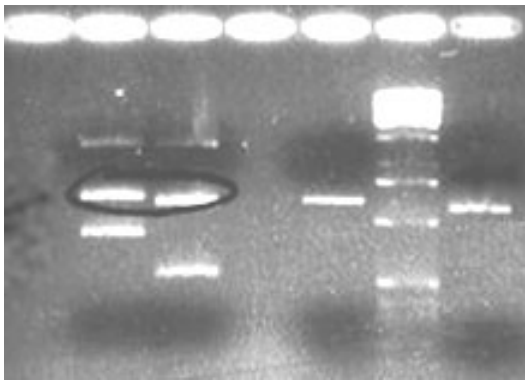

Abb. 3: Enzymrestriktion zur Generierung der PDGF-AA und BB-Sonden. Von links nach rechts: Restriktionsprodukt von PDGF-BB, Restriktionsprodukt von PDGF-AA, PDGF-BB, Größenstandard, PDGF-AA. Die eingekreisten Banden wurden aus dem Gel extrahiert.
PDGF-AA/BB = plateled derived growth factor AA/BB

Die größte Bande stellt das Plasmid dar, die zwei kleineren Banden sind Schnittstücke des Inserts. Das größere der beiden Stücke wurde jeweils aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gelextraktionskit nach den Anweisungen des Herstellers aus dem Gel isoliert.

Die GAPDH-Sonde wurde mittels RT-PCR aus Gesamt-RNA aus SMC`s generiert. Hierbei wurden 1µg der isolierten RNA (siehe Kap. 2.13.) mit einer Reversen-Transkriptase-Reaktion in c-DNA umgeschrieben (siehe Kap. 2.15.). Danach erfolgte die Amplifizierung durch PCR mit dem Hot Star Taq Master Mix.
Das PCR-Programm setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

1. 15 min 95°C
2. 40 sec 94°C Denaturierung
3. 40 sec 50°C Annealing
4. 1 min 72°C Elongation
5. 10 min 72°C

Das Reaktionsprodukt wurde auf 4°C abgekühlt.
Die Schritte 2.- 4. wurden 35-mal wiederholt.
Zur Aufreinigung des PCR-Produktes, wurde es auf einem 1,5% (w/v) Agarose, 2% (v/v) TAE-Gel von nicht inkorporierten Nukleotiden, Enzymen, Primern etc. befreit und die entsprechende Bande wie oben aus dem Gel extrahiert.

2.13 RNA–Isolation und Fällung

Die Gesamt-RNA aus glatten Gefäßmuskelzellen wurde aus jeweils zwei Zellkulturflaschen gewonnen. Die Zellen waren dabei ca. 80% konfluent.
Die RNA-Isolation erfolgte mit dem Rneasy mini Kit (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers.
Zur Bestimmung der Konzentration wurden 10µl der gewonnenen RNA in 490µl DEPC-H_20 im Verhältnis 1:50 verdünnt. Danach folgte die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm. Die RNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

Konzentration (µg/ml) = OD_{260} x Verdünnungsfaktor x 40

Um die RNA zu konzentrieren, wurde sie mit 2,25µl Glycogen (10mg/ml), 9µl Kaliumacetat (2,5M, pH 5,0) und 225µl 100% Ethanol pro 100 µl Volumen für mindestens eine Stunde bei – 80°C gefällt.
Durch Zentrifugation gewann man die ausgefällte RNA. Zuletzt wurde das RNA-Pellet in der Menge 0,1% DEPC-H_2O gelöst, die nötig war, um 25-30µg RNA auf das Gel auftragen zu können.

2.14 Northern Blot Analysen

2.14.1 Formaldehyd-Agarose Gelelektrophorese

Die unter Kap. 2.13. gewonnenen RNA-Proben wurden mittels Gelelektrophorese in einem 1% Agarosegel, dem 13,5ml Formaldeyd und 7,5ml 10x Gellaufpuffer bei einem Gesamtvolumen von 75ml zugegeben wurden, aufgetrennt.
Die eingesetzte RNA-Menge variierte zwischen 25µg und 30µg. Vor der Auftrennung wurden die Proben mit einem Denaturierungspuffer, bestehend aus 1µl 10x Gellaufpuffer, 3,5µl Formaldehyd und 10µl Formamid bei 65°C denaturiert. Nach Zugabe von 2µl RNA-Gelladepuffer konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden.
Der Gellauf wurde mit einer Spannung von 70V für drei bis vier Stunden durchgeführt, solange bis die Dyefront 2/3 des Gels passiert hatte. Dies geschah im Kühlraum bei 4°C.

2.14.2 Blotting

Beim Blotting wurde die RNA durch Kapillartransfer mit 10x SSC-Puffer und mehreren Schichten Whatmanpapier und Zellstofftücher über Nacht vom Gel auf eine Nylonmembran transferiert.

Um die RNA kovalent an die Membran zu binden, wurde sie mit UV-Licht in einem UV-Crosslinker mit 0,12J/cm^2 für eine Minute bestrahlt.

Anschließend folgte eine Methylenblaufärbung der Membran, um die Qualität der RNA zu beurteilen: die 28S- und 18S-Bande sollte zu sehen sein und die Intensitätsratio 28S:18S sollte 2:1 betragen. Nach dem Fotografieren wurde die Membran mit 25% Ethanol entfärbt.

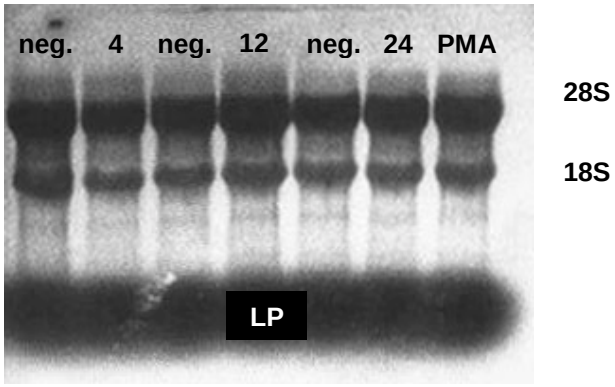

Abb. 4: Methylenblaufärbung der Nylonmembran zur Blotkontrolle. Die Zahlen entsprechen der Stimulationsdauer in Stunden, dazwischen Negativkontrollen (neg.), rechts außen die Positivkontrolle (PMA). 28S- und 18S-Banden und Ladepuffer (LP).
PMA = phorbol 12-myristat 13-acetat.

2.14.3 Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

Zum Nachweis der auf der Nylonmembran gebundenen RNA wurde ein DNA-Fragment, das dazu sequenzhomolog war, radioaktiv markiert und als Sonde für die gebundene RNA eingesetzt. Die radioaktive Markierung dieser RNA erfolgte mit 50Ci^{32}Pα-dCTP mit dem Rediprime Labelling Kit (Amersham) nach den Anweisungen des Herstellers.

2.14.4 Hybridisierung

10ml der Hybridisierungslösung wurden für 30 Minuten bei 80°C im Wasserbad denaturiert. Dann wurde die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen überführt

und mit der denaturierten Hybridisierungslösung vier Stunden lang bei 42°C im Hybridisierungsofen prähybridisiert. Dies geschah, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde die markierte DNA-Sonde dazugegeben und die Membran über Nacht damit hybridisiert.
Um nicht gebundene Sonden zu entfernen, wurde die Membran solange bei Raumtemperatur mit Kaltwaschlösung gewaschen, bis eine Strahlung von 100-200Bq erreicht worden war. Wenn sie nach zwei Waschschritten noch deutlich höher war, wurde die Membran bei 50°C mit Heißwaschlösung inkubiert.
Zuletzt wurde die Membran in Zellophanfolie eingewickelt und bei –70°C in einer Röntgenkassette gegen Röntgenfilme exponiert.

2.14.5 Strippen

Um die gebundene Radioaktivität der vorangegangenen Hybridisierung zu entfernen, wurde die Membran mit kochender Heißwaschlösung für fünf Minuten gewaschen. Dann erfolgte eine weitere Hybridisierung mit der GAPDH-Sonde. Diese GAPDH-Kontrolle diente dem Nachweis, daß in allen Proben gleiche Mengen an GAPDH-mRNA und somit auch an Gesamt-RNA vorhanden waren.

2.15 RT-PCR

2.15.1 Reverse Transkriptase-Reaktion

Die zwei Splicevarianten von PDGF-AA wurden durch RT-PCR nachgewiesen. Bei der Reverse Transkriptase-Reaktion katalysiert das Enzym Reverse Transkriptase die Umschreibung der RNA in c-DNA. Es wurden 2µg RNA eingesetzt. Die Reaktion wurde mit dem Omniscript Reverse Transcriptase Kit (Qiagen) durchgeführt. Der Vorgang fand bei 37°C für eine Stunde im Thermocycler statt. Durch einen fünf-minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C wurde die Reaktion gestoppt.

2.15.2 PCR

Durch die PCR können gezielt bestimmte DNA-Bereiche vervielfältigt werden. Die Reaktion wird durch eine thermostabile, DNA-abhängige DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) katalysiert. Das Prinzip beruht auf der zyklischen Wiederholung von drei Schritten: 1. Denaturierung, 2. Hybridisierung, 3. Polymerisation.

5µl des Produktes aus der Reversen Transkription-Reaktion wurden für die PCR eingesetzt. Die PCR wurde mit dem Hot Star Taq Master Mix durchgeführt.
Die Reaktion lief in folgenden Schritten ab:

1. 3 min 94°C
2. 40 sec 94°C
3. 40 sec 61°C
4. 1 min 72°C
5. 10 min 72°C
6. 4°C

Die Schritte 2.- 4. wurden 29 mal wiederholt.

2.15.3 DNA-Gelelektrophorese

Das PCR-Produkt wurde in einem 1,5% (w/v) Agarose, 2% (v/v) TAE-Gel gelelekrophoretisch aufgetrennt.
Nach Anfärben in 0,025% (v/v) Ethidiumbromid wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

2.16 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Es wurde ein kommerziell erhältliches ELISA-System verwendet (Quantikine, R&D Systems). Der ELISA ist spezifisch für PDGF-BB und kreuzreagiert nicht mit anderen Wachstumsfaktoren. Das Prinzip dieses Systems beruht auf einer quantitativen Sandwich Immunoassay-Technik. Eine Mikrotiterplatte war mit PDGF-β-Rezeptor beschichtet. Die Proben wurden in die Löcher der Platte pipettiert und jedes vorhandene PDGF-BB wurde an den immobilisierten Rezeptor gebunden. Nach dem Abwaschen ungebundener Substanzen wurde ein Enzym-gekoppelter, polyklonaler Antikörper, der spezifisch für PDGF-BB ist, hinzugefügt. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Platte ein zweites Mal gewaschen. Anschließend wurde eine Substratlösung hinzugegeben. Das an den Antikörper gekoppelte Enzym katalysiert eine Farbumschlagsreaktion, die sich proportional zur Menge des gebundenen PDGF-BB verhält. Der Farbumschlag konnte dann photometrisch gemessen werden.

Für den ELISA wurden SMCs für 15 Stunden ausgehungert und anschließend mit dem terminalen Komplementkomplex attackiert. Nach 4, 12, 24 und 48 Stunden wurde der Überstand abgenommen und durch Zentrifugation über einen 10000 MG Filter (Centricon, Amicon) aufkonzentriert. Mit den konzentrierten Proben wurde dann der ELISA nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Expression der Wachstumsfaktoren PDGF–AA und PDGF-BB unter Einfluss des terminalen Komplementkomplexes: Untersuchung auf transkriptioneller Ebene

Da die Arteriosklerose inzwischen als entzündliches Geschehen angesehen wird und Komplement als Bestandteil der humoralen Immunabwehr proinflammatorische Eigenschaften aufweist, unterhält die Komplementaktivierung in arteriosklerotischen Läsionen eine chronische Entzündungsreaktion.

3.1.1 Der Terminale Komplementkomplex hat keinen Einfluss auf die Expression der PDGF-AA mRNA

Um den Einfluss von C5b-9 auf die Expression der PDGF-AA mRNA zu untersuchen, wurden SMCs nach 15-stündigem Aushungern für 4, 12 und 24 Stunden mit C5b-9 (MHD 100) stimuliert.

Nach der RNA-Isolation wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt.

Als Positivkontrolle dienten vier Stunden mit PMA stimulierte Zellen, als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen mitgeführt.

Die Northern Blot-Analyse zeigte eine basale Expression von PDGF–AA mRNA in allen Proben. Auch die beiden Splicevarianten sind hier deutlich zu sehen.

Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigte sich jedoch keine signifikante Änderung der PDGF-AA mRNA Expression durch den Terminalen Komplementkomplex.

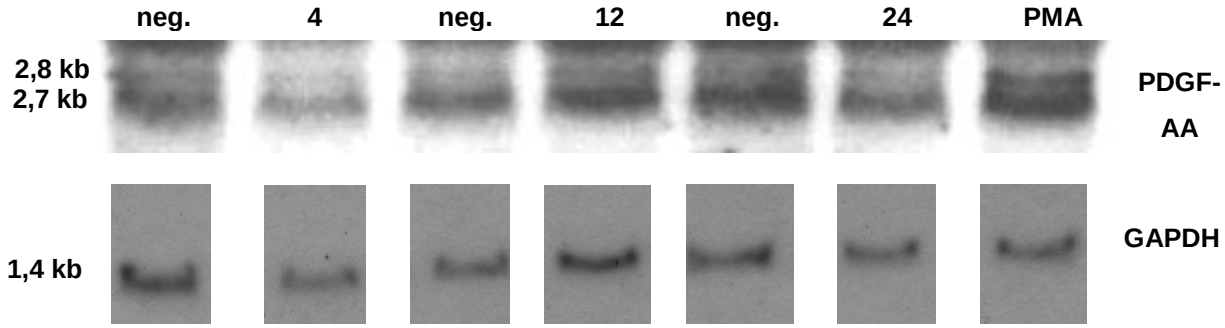

Abb. 5: Northern Blot Analyse zum Nachweis der PDGF-AA mRNA (plateled derived growth factor AA messenger ribonucleic acid) nach dem Komplementangriff mit einer MHD (minimale Hämolysedosis) von 100. Die Ziffern entsprechen der Stimulationsdauer von 4, 12 und 24 Stunden. Dazwischen sind die Negativkontrollen (neg.), PMA-stimulierte Zellen dienten als Positivkontrolle (PMA = Phorbol 12-myristat 13-acetat). Die GAPDH-Kontrolle diente zum Nachweis gleicher Menge an Gesamt-RNA (ribonucleic acid).
GAPDH = Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase

In einem anderen Versuch wurde die Dosis des MAK variiert. Die Zellen wurden nach 15-stündigem Aushungern mit dem MAK attackiert, bei einer MHD von 20, 100 und 500. Nach vier Stunden wurde die RNA isoliert und erneut Northern Blot-Analysen durchgeführt.

Hier zeigte sich ebenfalls eine Basalexpression von PDGF–AA mRNA beider Transkriptvarianten. Doch auch trotz veränderter MHD hatte der terminale Komplementkomplex keinen Einfluss auf das Transkriptionsverhalten der PDGF–AA mRNA.

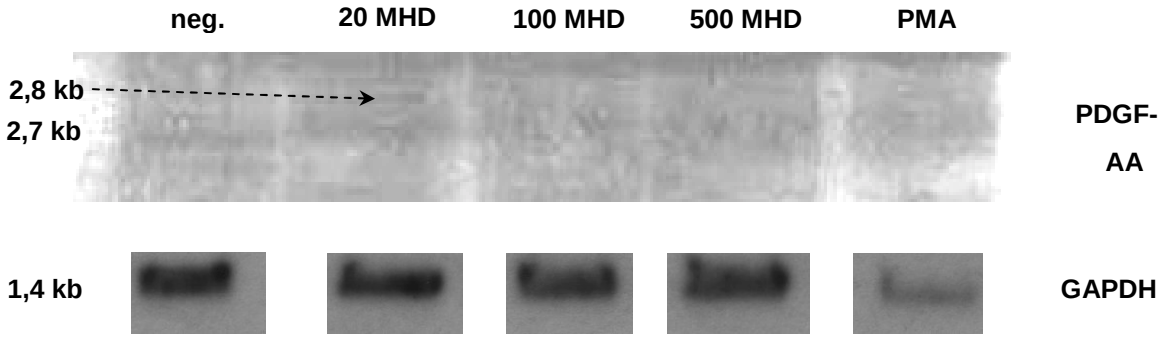

Abb. 6: Northern Blot Analyse zum Nachweis der PDGF-AA mRNA (plateled derived growth factor AA messenger ribonucleic acid) nach dem Komplementangriff mit Variation der MHD (minimale Hämolysedosis) von 20, 100 und 500. Links außen ist die Negativkontrolle (neg.), PMA-stimulierte Zellen dienten als Positivkontrolle (PMA = Phorbol 12-myristat 13-acetat). Im unteren Abschnitt wird die GAPDH-Kontrolle gezeigt.
GAPDH = Glyzerinaldehydphosphat - Dehydrogenase

3.1.2 Der terminale Komplementkomplex hat keinen Einfluss auf die Transkription der PDGF–BB mRNA

Genau wie in den Versuchen aus Kap. 3.1.1. wurden SMCs mit Hilfe von Northern Blot-Analysen auf ihre Transkription von PDGF–BB mRNA unter Komplementeinfluss untersucht.

15 Stunden lang ausgehungerte Zellen wurden für 4, 12 und 24 Stunden mit dem MAK (MHD 100) attackiert. Als Positivkontrolle wurde die RNA von PMA-stimulierten (4 Stunden) Zellen eingesetzt.

Die Transkription von PDGF-BB mRNA ließ sich nicht durch C5b-9 steigern.

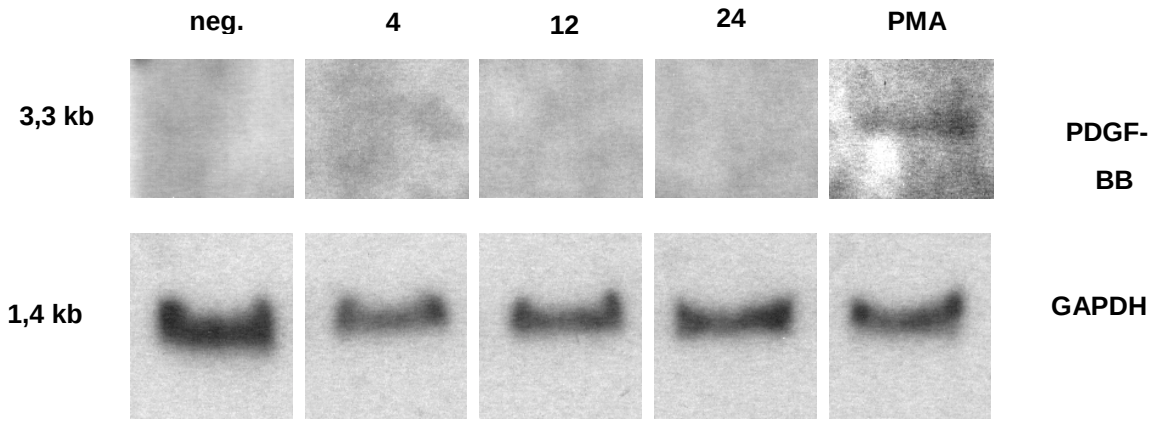

Abb. 7: Northern Blot Analyse zum Nachweis der PDGF-BB mRNA (plateled derived growth factor BB messenger ribonucleic acid) nach dem Komplementangriff mit einer MHD (minimale Hämolysedosis) von 100. Die Ziffern entsprechen der Stimulationsdauer von 4, 12 und 24 Stunden. Links außen ist die Negativkontrolle (neg.), PMA-stimulierte Zellen dienten als Positivkontrolle (PMA = Phorbol 12-myristat 13-acetat). Im unteren Abschnitt ist die GAPDH-Kontrolle zu sehen.
GAPDH = Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase

In einem anderen Versuch wurde untersucht, ob sich die Transkription durch Veränderung der MHD stimulieren lässt. Für den Komplementangriff wurde eine MHD von 20, 100 und 500 gewählt. Nach einer Aushungerphase von 15 Stunden wurden die Zellen 4 Stunden damit stimuliert.

Doch wie bei der PDGF–AA mRNA Expression zeigte sich auch bei PDGF–BB keine Änderung im Transkriptionsverhalten durch den terminalen Komplementkomplex.

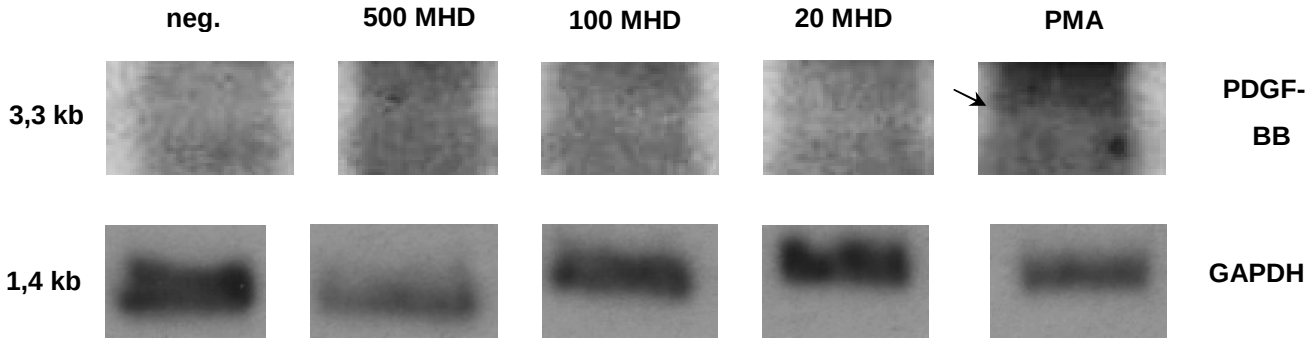

Abb. 8: Northern Blot Analyse zum Nachweis der PDGF-BB mRNA (plateled derived growth factor BB messenger ribonucleic acid) nach dem Komplementangriff mit Variation der MHD (minimale Hämolysedosis) von 500, 100 und 20.
Links außen ist die Negativkontrolle (neg.), ganz rechts die Positivkontrolle mit PMA-stimulierten Zellen (PMA = Phorbol 12–myristat 13–acetat), unten ist die GAPDH–Kontrolle zu sehen.
GAPDH = Glyzerinaldehydphosphat–Dehydrogenase

3.2 Transkription zweier Splicevarianten von PDGF-AA, Unterschiede im Transkriptionsverhalten beider Varianten und seine Änderung durch den terminalen Komplementkomplex

Wie oben bereits erwähnt, existiert beim posttranskriptionalen Processing der PDGF-AA mRNA ein alternatives Splicing, das zur Bildung zweier Splicevarianten, einer kürzeren ohne Exon 6 (PDGF-AA_s) und einer längeren, mit Exon 6 (PDGF-AA_l) führt.

Von verschiedenen Zelltypen ist bekannt, daß sie beide Transkripte bilden können.

Mittels RT-PCR wurde hier analysiert, ob auch SMCs zur Transkription beider Formen in der Lage sind und ob eine der zwei Varianten bevorzugt gebildet wird.

Außerdem wurde der Einfluss des terminalen Komplementkomplexes auf das Transkriptionsverhalten untersucht.

3.2.1 Glatte Muskelzellen bilden beide Splicevarianten von PDGF-AA, jedoch unter Bevorzugung der kürzeren Variante und ohne Beeinflussung durch den MAK

Diese Untersuchung wurde mit Hilfe einer RT-PCR durchgeführt.

Hierfür wurden SMCs in Zellkulturflaschen ausplattiert und bei Erreichen der Subkonfluenz für 15 Stunden ausgehungert. Danach erfolgte der Angriff mit dem terminalen Komplementkomplex bei einer MHD von 100.

Nach vier, zwölf und vierundzwanzig Stunden wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert. Zusätzlich wurden unstimulierte, aber gleich lang ausgehungerte Zellen untersucht. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die für vier Stunden mit PMA stimuliert wurden.

Nachdem die RNA mittels der RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben wurde, wurde die PCR durchgeführt.

Hierbei zeigte sich, dass SMCs beide Splicevarianten bilden, unter Bevorzugung der kürzeren Spliceform PDGF-AAs. Die Bildung von PDGF-AA war sowohl ohne, als auch unter Komplementeinfluss nachzuweisen. Im Vergleich zur Negativkontrolle, zeigte sich keine Veränderung im Transkriptionsverhalten durch Komplement.

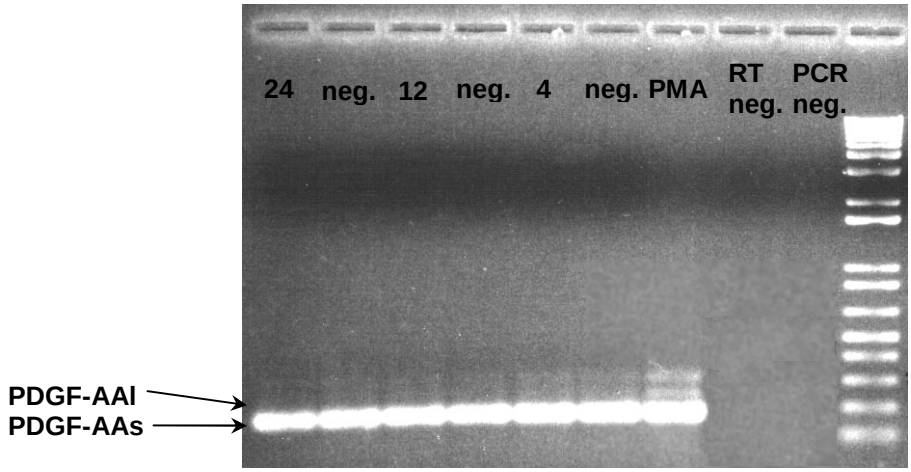

Abb. 9: RT-PCR (Reverse Transkriptase-polymerase chain reaction) zum Nachweis der Transkription zweier Splicevarianten von PDGF-AA (plateled derived growth factor AA) und ihre Beeinflussung durch den terminalen Komplementkomplex. Die Ziffern entsprechen der Stimulationsdauer mit Komplement in Stunden, dazwischen sind die Negativkontrollen (neg.), PMA-stimulierte Zellen (PMA = Phorbol 12–myristat 13–acetat) dienten als Positivkontrolle, RT neg. bedeutet Reverse Transkriptase-Reaktion ohne RNA (ribonucleic acid), PCR neg. bedeutet PCR (polymerase chain reaction) ohne DNA (deoxyribonucleic acid), rechts außen ist der Größenstandard.
PDGF-AAl/s = lange/kurze Splicevariante von plateled derived growth factor

3.3 Sekretion von PDGF-BB in den Zellkulturüberstand unter Einfluss des terminalen Komplementkomplexes: Untersuchung auf Proteinebene

Mit Hilfe von ELISA-Analysen wurde untersucht, ob die Sekretion von PDGF–BB in den Zellkulturüberstand aus SMCs durch den terminalen Komplementkomplex stimulierbar ist.

3.3.1 C5b-9 bewirkt keine Steigerung der Freisetzung von PDGF-BB aus SMCs.

Hierfür wurden SMCs 15 Stunden ausgehungert und danach mit C5b-9 stimuliert. Nach 4, 12, 24 und 48 Stunden wurden die Überstände abpipettiert, durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und schließlich der ELISA durchgeführt.

Zur Gewinnung der Positivkontrolle wurden die Zellen wieder mit PMA stimuliert, nun für 4 und 12 Stunden. Als Negativkontrolle diente der Zellkulturüberstand unstimulierter Zellen.

Es konnte keine Steigerung der Freisetzung von PDGF-BB aus SMCs durch Stimulation mit dem terminalen Komplementkomplex nachgewiesen werden (n=2).

4 Diskussion

Die Proliferation glatter Muskelzellen ist ein Schlüsselereignis in der Bildung arteriosklerotischer Läsionen [62]. In der frühen Atherogenese beginnt die Proliferation dieser Muskelzellen in der Lamina fibromuscularis, ein Gebiet wo auch SMCs vorkommen. Nach gängiger Lehrmeinung geht man davon aus, dass die Proliferation der SMCs überwiegend durch Wachstumsfaktoren vermittelt wird, welche durch Zellen der Arterienwand lokal freigesetzt werden. [62, 89] Die Mechanismen, die die Expression und Freisetzung der Wachstumsfaktoren induzieren, sind jedoch nur teilweise geklärt. Welche Rolle der terminale Komplementkomplex dabei spielt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

C5b-9, der terminale Komplementkomplex scheint eng in die Bildung arteriosklerotischer Läsionen involviert zu sein [65, 81]. Zellgebundenes C5b-9 generiert transmembranäre Poren, die zur Zelllyse führen können oder agiert bei einem Angriff auf kernhaltige Zellen als Mediator einer Reihe zellulärer Prozesse [5, 47, 49]. C6–defiziente Tiere, die unfähig sind, den terminalen Komplementkomplex zu generieren, zeigten weniger Cholesterol–induzierte arteriosklerotische Läsionen [28, 65]. C5b-9 konnte in der Intima arteriosklerotischer Läsionen bei Mensch und Tier nachgewiesen werden [68, 81] und wurde auch in Kolokalisation mit SMCs in der Lamina fibromuscularis früher arteriosklerotischer Läsionen in humanen Koronararterien detektiert [81]. Beides, die Tatsache, dass C5b-9-Komplexe mit SMCs kolokalisieren, sowie die Tatsache, dass SMCs kaum vor einem Komplementangriff geschützt sind, da sie das CD 59–Molekül nicht exprimieren [69], unterstreicht die Bedeutung der Aufklärung der Interaktionen von SMCs und C5b-9.

Eine C5b-9–induzierte Stimulation der Proliferation glatter Muskelzellen wurde bereits von Niculescu et al. demonstriert [51]. Weiterhin induziert C5b-9 die Freisetzung von Wachstumsfaktoren. Dieser Effekt wurde bei Endothelzellen beobachtet [5].
Dies führt zu der Frage, ob der terminale Komplementkomplex C5b-9, die Expression und Freisetzung der Wachstumsfaktoren PDGF-AA und PDGF-BB aus SMCs im Sinne eines autokrinen Loops induziert, um so durch einen Liganden-

abhängigen Effekt auf den PDGF-ß–Rezeptor die Proliferation der SMCs zu stimulieren.

In dieser Arbeit wurden keine Evidenzen dafür gefunden, dass C5b-9 die Synthese von PDGF-AA und PDGF-BB in SMCs stimuliert.

Weiterhin konnte der Nachweis erbracht werden, dass SMCs beide Splicevarianten von PDGF-AA bilden können, unter Bevorzugung der kürzeren Variante PDGF-AA_s. Diese ist im Gegensatz zur längeren Variante PDGF-AA_l, welche an extrazelluläre Matrix gebunden ist, löslich und ins Medium sezernierbar [52]. An extrazelluläre Matrix gebundenes PDGF-AA ist für die Bindung an seinen Rezeptor unzugänglich. Nur freies PDGF-AA ist fähig, seinen Rezeptor zu aktivieren.

Als weiteres konnte kein PDGF–BB im Überstand C5b-9–stimulierter SMCs nachgewiesen werden. Kleine Mengen an potentiell freigesetztem PDGF-BB jedoch, könnten direkt an seinen Rezeptor gebunden sein und deshalb im Überstand nicht nachgewiesen werden.

Zur kritischen Wertung der Experimente ist zu bemerken, daß die Northern Blots mit technischen Schwierigkeiten verbunden waren. Dennoch sind die Ergebnisse der Northern Blots verwertbar, sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen sind richtig.

Die oben genannten Tatsachen führen zu der Annahme, dass zur Stimulation der SMC–Proliferation durch C5b-9, Liganden–unabhängige Mechanismen involviert sind. Hierbei müssen drei Überlegungen in Erwägung gezogen werden:

1. Es ist bekannt, dass C5b-9 einen transienten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt [49]. Calcium bindet an Calmodulin. Dieser Ca^{2+} /Calmodulin Komplex aktiviert Ca^{2+} /Calmodulin–abhängige Proteinkinasen. Dieses Enzym ist in der Lage, Wachstumsfaktorrezeptoren direkt oder über zwischengeschaltete Kaskaden zu phosphorylieren [12].

2. C5b-9 kann Koimmunopräzipitate mit aktiven G–Proteinen bilden [50]. Dies führt möglicherweise zur Aktivierung heterotrimerer G–Proteine und folglich zur Kreuzreaktion der G–Proteine mit dem PDGF–Rezeptor, was dann in seine Autophosphorylierung resultiert [38, 98].

3. C5b-9 könnte an spezifische Rezeptoren auf SMCs binden, die mit dem PDGF–Rezeptor kreuzreagieren.

Weitere Studien sind also notwendig, um endgültig zu klären, ob Liganden–abhängige oder Liganden–unabhängige Mechanismen beteiligt sind.
Zusammenfassend lassen diese Daten einen alternativen Mechanismus vermuten, über den eine Entzündung zu proliferativen Reaktionen in der Atherogenese führt. Dies zeigt eine Verbindung zwischen dem neuen Konzept der Komplementaktivierung und der bereits etablierteren Hypothese der Wachstumsfaktoraktivierung in der Atherogenese.

Klinische Relevanz und Perspektiven

Die Erkenntniss, dass die Komplementaktivierung zu einer Vielzahl vaskulärer und proinflammatorischer Krankheitsstadien, einschließlich Arteriosklerose und Ischämie, beiträgt [95], ist bei der Entwicklung neuer Therapiestrategien sowie bei der Etablierung neuer Biomarker zur Risikoeinschätzung für zukünftige vaskuläre Ereignisse von klinischer Relevanz.
So beschäftigte sich eine Studie mit der Expression und Funktion membrangebundener Komplementregulatoren auf aortalen SMCs von Meerschweinchen [16]. Eine beschleunigte Arteriosklerose wird nach Transplantation beobachtet und ist durch Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen im Transplantat charakterisiert. Meerschweinchenzellen werden regelmäßig in Modellen der Arteriosklerose verwendet. In dieser Studie zeigte sich, dass Meerschweinchen-SMCs die Komplementregulatoren *membrane cofactor protein* und das CD 59-Molekül auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Es fiel weiterhin eine deutlich stärkere Empfindlichkeit dieser glatten Gefäßmuskelzellen gegenüber humanem Komplement auf als bei Endothelzellen, was wiederum die wichtige Rolle glatter Gefäßmuskelzellen in der Pathogenese der Arteriosklerose unterstreicht. Ursächlich hierfür ist vor allem die geringere Expression von CD 59 durch SMCs. Um eine beschleunigte Arteriosklerose in Transplantaten zu verhindern, müssen also erhöhte Mengen an Komplementregulatoren besonders auf SMCs erreicht werden.
Yun et al. bewiesen ebenfalls die wichtige Rolle des CD 59-Moleküls: In ihren Versuchen zeigten CD 59-defiziente Mäuse eine schnellere Entwicklung

arteriosklerotischer Läsionen und eine erhöhte Anzahl vaskulärer SMCs. Die Hauptfunktion des CD 59-Moleküls ist es also die Bildung des C5b-9 Membranangriffskomplexes zu verhindern, was die Bedeutung der Komplementregulierung unterstreicht [97].

Fosbrink et al. identifizierten den PI_3-Kinase/Akt (die im Englischen üblichere Bezeichnung für die Proteinkinase B) Pathway als Signaltransduktionsweg in aortalen Endothelzellen, über den C5b-9 die Proliferation und Migration dieser Zellen aktiviert [25]. Durch Vorbehandlung mit einem PI_3-Kinase-Inhibitor und einem Akt-Inhibitor (LY294002) wurde der C5b-9-Einfluss gehemmt. Damit könnte also auch durch Inhibition der C5b-9-vermittelten Signaltransduktionswege der Einfluss des terminalen Komplementkomplexes auf die Zellproliferation, und damit auf die Enstehung und Progression der arteriosklerotischen Läsion, reduziert werden.

Auch C1q wurde eine protektive Rolle in der Bildung früher arteriosklerotischer Läsionen zugewiesen, und Crry-Ig zeigte therapeutische Effekte in arteriosklerotischen Modellen bei Mäusen [32].

Somit ist die Komplementaktivierung als pathogenetische Komponente in der Arteriosklerose ein neues therapeutisches Ziel [36] und Gegenstand gegenwärtiger Forschung.

Ein weiterer praktischer Nutzen dieser Erkenntisse besteht in der Etablierung neuer Biomarker.

Einige inflammtorische Biomarker sind bereits dafür bekannt mit dem kardiovaskulären Risiko assoziiert zu sein. So zum Beispiel Antikörper gegen Chlamydia pneumoniae und gegen das Cytomegalievirus, erhöhte Plasmakonzentrationen von E-Selectin, Myeloperoxidase, Endothelin-1 und vascular cell adhesion molecule-1 [83].

Videm et al. untersuchten zwei neue Marker, Lactoferrin und den terminalen Komplementkomplex, bei Patienten, die sich erstmalig einer Koronarangiografie unterzogen [83]. Sie analysierten Blutproben von Patienten mit und ohne signifikante Koronararterienstenose. Es zeigte sich, dass sowohl Lactoferrin als auch der terminale Komplementkomplex Variablen sind, die mit Koronararterienstenose assoziiert sind.

Die Rolle des terminalen Komplementkomplexes ist also unumstritten, womit sich neue therapeutische Konzepte und möglicherweise auch neue Methoden zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos ergeben.

5 Zusammenfassung

Die Proliferation glatter Muskelzellen in der Lamina fibromuscularis der Arterienwand ist ein wichtiger Schritt in der Atherogenese und wird unter anderem durch das Zusammenwirken von Wachstumsfaktoren wie PDGF-AA und PDGF-BB (plateled derived growth factor AA und BB) und deren Rezeptoren reguliert. Diese Wachstumsfaktoren werden durch Zellen der Arterienwand lokal freigesetzt. Welche Mechanismen zur Expression und Freisetzung der Wachstumsfaktoren führen, ist noch nicht ausreichend geklärt.

Nach gängiger Lehrmeinung kann die Arteriosklerose als inflammatorischer Prozess angesehen werden. Es existieren Hinweise darauf, dass der terminale Komplementkomplex, als Endstrecke proinflammatorischer Reaktionen, an der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen beteiligt ist. So zeigte sich, dass C6–defiziente Kaninchen keine Diät–induzierte Arteriosklerose entwickeln. Weiterhin kann der C5b-9–Komplex, der mit glatten Gefäßmuskelzellen in frühen humanen arteriosklerotischen Plaques kolokalisiert ist, die Proliferation glatter Muskelzellen über bisher noch unbekannte Mechanismen in vitro stimulieren.

Diese Beobachtungen lassen auf eine Verbindung zwischen dem Konzept der Wachstumsfaktoraktivierung und der modernen Hypothese der Komplementaktivierung in der Atherogenese schließen.

Die Aktivierung des PDGF-Rezeptors kann über einen Liganden–abhängigen, autokrinen oder parakrinen oder über einen Liganden–unabhängigen Mechanismus geschehen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane glatte Gefäßmuskelzellen prinzipiell in der Lage sind, PDGF zu exprimieren. Bei PDGF-AA werden beide Splicevarianten gebildet, jedoch unter Bevorzugung der kürzeren Variante PDGF-AA_S.

Ein Angriff mit dem terminalen Komplementkomplex auf die Muskelzellen führte jedoch zu keiner Steigerung im Expressionsverhalten. Auch eine Freisetzung von PDGF-BB, nach Stimulation der Zellen mit C5b-9 konnte nicht beobachtet werden.

Damit kommt eine Liganden–abhängige Aktivierung des PDGF-β-Rezeptors im Sinne eines auto–oder parakrinen Mechanismus eher nicht in Frage. Man muss also eine Liganden–unabhängige Aktivierung des Rezeptors annehmen.

6 Literaturverzeichnis

1. Alving CR, Richards RL, Guirguis AA: Cholesterol-dependent human complement activation resulting in damage to liposomal model membranes. J Immunol 118: 342-347 (1977)

2. Andersson M, Östman A, Westermark B, Heldin CH: Characterisation of the retention motif in the C-terminal part of the long splice form of plateled-derived growth factor A-chain. J Biol Chem 269: 926-930 (1994)

3. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L: Coronary atherosclerosis: a multifactorial disease. Circulation 87: Suppl II: 3-16 (1993)

4. Benditt EP, Benditt JM: Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. Proc Natl Acad Sci 70: 1753-1756 (1973)

5. Benzaquen LR, Nicholson-Weller A, Halperin JA: Terminal complement protein C5b-9 release bFGF and PDGF from endothelial cells. J Exp Med 179: 985-992 (1994)

6. Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, Esterson M, Fogelman AM: Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocytes endothelial interactions. J Clin Invest 85: 1260-1266 (1990)

7. Berliner JA, Gerrity RG: Pathology of atherogenesis. Monogr Hum Genet 14: 1-17 (1992)

8. Bhakdi S, Hugo F, Tranum-Jensen J: Functions and relevance of the terminal complement sequence. Immun Infekt 18: 71-79 (1990)

9. Bhakdi S, Dorweiler B, Kirchmann R, Torzewski J, Weise E, Tranum-Jensen J, Walev I, Wieland E: On the pathogenesis of atherosclerosis: Enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. J Exp Med 182: 1959-1971 (1995)

10. Bhakdi S: An alternative hypothesis of the pathogenesis of atherosclerosis. Herz 23: 163-167 (1998)

11. Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M: Complement and Atherogenesis: Binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 2348-2354 (1999)

12. Braun AP, Schulman H: The multifunctional calcium/calmodulin–dependent protein kinase: from form to function. Annu Rev Physiol 57: 417-445 (1995)

13. Braunwald E: Shattuck Lecture-cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns and opportunities. N Engl J Med 337: 1360-1369 (1997)

14. Breslow JL: Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. Nat Med 3: 600-601 (1997)

15. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S: Oncogenes and signal transduction. Cell 64: 281-302 (1991)

16. Capey S, van den Berg CW: Porcine complement regulators protect aortic smooth muscle cells poorly against human complement-induced lysis and proliferation: consequences for xenotransplantation. Xenotransplantation 12: 217-226 (2005)

17. Carew TE, Schwenke DC, Steinberg D: Antiatherogenic effects of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophages-rich fatty-streaks slowing the progression of atherosclerosis in the WHHL rabbit. Proc Natl Acad Sci USA 84: 7725-7729 (1987)

18. Chang MY, Sasahara M, Chait A, Raines EW, Ross R: Inhibition of hypercholesterolemia- induced atherosclerosis in the honhuman primate by probucol II. Cellular composition and proliferation. Arteriosclerol Thromb Vasc Biol 15: 1631-1640 (1995)

19. Claesson-Welsh L: PDGF Receptors: Structure and mechanism of action. Cytokines 5: 31-43 (1993)

20. Claus DR, Siegel J, Petras K, Osmand AP, Gewurz H: Interactions of C-reactive protein with the first component of human complement. J Immunol 119: 187-192 (1977)

21. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM: Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. Smooth muscle cell growth in the absence of endothelium. Lab Invest 49: 327-333 (1983)

22. Clowes AW, Schwartz SM: Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. Circ Res 56: 139-145 (1985)

23. Fantl WJ, Escobedo JA, Martin GA, Turck CW, del Rosario M, McCormick F, Williams LT: Distinct phosphotyrosines on a growth factor receptor bind to specific molecules that mediate different intracellular signaling pathways. Cell 69: 413-423 (1992)

24. Fearon DT: The complement system and adaptive immunity. Semin Immunol 10: 355-361 (1998)

25. Fosbrink M, Niculescu F, Rus V, Shin ML, Rus H: C5b-9-induced endothelial cell proliferation and migration are dependent on Akt inactivation of forkhead transcription factor FOXO1. J Biol Chem 281: 19009-19018 (2006)

26. Fosse E, Pillgram-Larsen J, Svennevig JL, Nordby C, Skulberg A, Mollnes TE, Abdelnoor M: Complement activation in injured patients occurs immediately and is dependent on the severity of the trauma. Injury 29: 509-514 (1998)

27. Geertinger P, Soerensen H: Complement and atherosclerosis. Atherosclerosis 18: 65-71 (1973)

28. Geertinger P, Soerensen H: On the reduced atherogenic effects of cholesterol feeding on rabbits with congenital complement (C6) deficiency. Artery 1: 177-184 (1977)

29. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ: Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. N Engl J Med 316: 1371-1375 (1987)

30. Grotendorst GR, Seppa HEJ, Kleinman HK, Martin GR: Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward plateled-derived growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 78: 3669-3672 (1981)

31. Hammerschmidt DE, Greenberg CS, Yamada O, Craddock PR, Jacob HS: Cholesterol and atheroma lipids activate complement and stimulate granulocytes. A possible mechanism for amplification of ischemic injury in atherosclerotic states. J Lab Clin Med 98: 68-77 (1981)

32. Haskard DO, Boyle JJ, Mason JC: The role of complement in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 19: 478-482 (2008)

33. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB: Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. Lancet 349: 462-466 (1997)

34. Heldin CH, Bäckström G, Östman A, Hammacher A, Rönnstrand L, Rubin K, Nister M, Westermark B: Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: evidence for two separate receptor types. EMBO J 7: 1387-1394 (1988)

35. Heldin CH, Östman A, Rönnstrand L: Signal transduction via plateled-derived growth factor receptors. Biochem Biophys Acta 1378: F79-F113 (1998)

36. Helske S, Oksjoki R, Lindstedt KA, Lommi J, Turto H, Werkkala K, Kupari M, Kovanen PT: Complement system is activated in stenotic aortic valves. Atherosclerosis 196: 190-200 (2008)

37. Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D: Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells. Recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. Proc Natl Acad Sci USA 78: 6499- 6503 (1981)

38. Herrlich A, Daub H, Knebel A, Herrlich P, Ullrich A, Schultz G, Guderman T: Ligand–independent activation of plateled–derived growth factor is a necessary intermediate in lysophosphatidic, acid–stimulated mitogenic activity in L cells. Proc Natl Acad Sci USA 95: 8985–8990 (1998)

39. Inui H, Kitami Y, Kondo T, Inagami T: Transduction of mitogenic activity of platelet-derived growth factor (PDGF) AB by PDGF-β receptor without participation of PDGF-alpha receptor in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 268: 17045-17050 (1993)

40. Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, Hutchinson WL, Pepys MB: C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. Circulation 99: 237-242 (1999)

41. Koyama N, Hart CE, Clowes AW: Different functions of the plateled-derived growth factor-α and -β receptors for the migration and proliferation of cultured baboon smooth muscle cells. Circ Res 75: 682-691 (1994)

42. Lachmann PJ, Thompson MB: Reactive lysis: the complement–mediated lysis of unsensitized cells II. J Exp Med 131: 642-655 (1970)

43. Lagrand WK, Niessen HW, Wolbink GJ, Jaspars LH, Visser CA, Verheugt FW, Meijer CJ, Hack CE: C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. Circulation 95: 97-103 (1997)

44. Libby P, Warner SJC, Salomon RN, Birinyi LK: Production of plateled-derived growth factor-like mitogen by smooth muscle cells from human atheroma. N Engl J Med 318: 1493-1498 (1988)

45. Libby P, Ross R: Cytokines and growth regulatory proteins. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ (Hrsg.): Atherosclerosis and coronary artery disease, Bd 1, Lippincott-Raven, S. 585-594 (1996)

46. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL; Rebuzzi AG, Pepys MB, Maseri A: The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. N Engl J Med 331: 417-424 (1994)

47. Lovett DH, Haensch GM, Goppelt M, Resch K, Gemsa F: Activation of glomerular mesangial cells by the terminal membrane attack complex of complement. J Immunol 138: 2473-2480 (1987)

48. Martin GM. Sprague CA: Clonal senescense and atherosclerosis. Lancet 11: 1370-1371 (1972)

49. Morgan BP: Effects of the membrane attack complex on nucleated cells. Curr Top Microbiol Immunol 178: 115-140 (1992)

50. Niculescu F, Rus H, Shin ML: Receptor – independent activation of guanine nucleotide – binding regulatory proteins by terminal complement complexes. J Biol Chem 269: 4417-4423 (1994)

51. Niculescu F, Badea T, Rus H: Sublytic C5b-9 induces proliferation of human aortic smooth muscle cells: role of mitogen activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. Atherosclerosis 142: 47-56 (1999)

52. Raines EW, Ross R: Compartmentalisation of PDGF on extracellular binding sites dependend on exon 6-encoded sequences. J Cell Biol 116: 533-543 (1992)

53. Raines EW, Rosenfeld ME, Ross R: The role of macrophages. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ (Hrsg.): Atherosclerosis and coronary artery disease, Bd 1, Lippincott-Raven, S. 539-555 (1996)

54. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH: Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. Circulation 97: 425-428 (1998)

55. Riede UN, Müntefering H, Drexler H, Ihling C, Schaefer HE: Kardiovaskuläres System. In: Riede UN, Schaefer HE (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Auflage, Thieme, Stuttgart New York, S. 435-523 (1995)

56. Rieger H, Greten H, Sinzinger H, Standl E, Windler E: Arteriosklerose. In: Rieger H, Schoop W (Hrsg.): Klinische Angiologie, Springer, Berlin Heidelberg New York, S. 34-74 (1998)

57. Rorsman F, Leveen P, Betsholtz C: Characterisation of the mouse PDGF A gene. Evolutionary conservation of gene structure, nucleotide sequence and alternative splicing. Growth Factors 2: 5103-5123 (1992)

58. Ross R, Glomset JA: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. Science 180: 1332-1338 (1973)

59. Ross R, Masuda J, Raines EW, Gown AM, Katsuda S, Sasahara M, Malden LT, Masuko H, Sato H: Localisation of PDGF B protein in macrophages in all phases of atherogenesis. Science 248: 1009-1012 (1990 a)

60. Ross R, Masuda J, Raines EW: Cellular interactions, growth factors and smooth muscle cell proliferation in atherogenesis. Ann NY Acad Sci 598: 102-112 (1990 b)

61. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 362: 801-809 (1993)

62. Ross R: Atherosclerosis-an inflammatory disease. N Engl J Med 340: 115-126 (1999)

63. Rubin K, Tingstrom A, Hansson GK, Larsson E, Ronnstrand L, Klareskog L, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Fellstrom B, Terracio L: Induction of B-type receptors for plateled-derived growth factor in vascular inflammation: possible implications for development of vascular proliferative lesion. Lancet 1: 1353-1356 (1988)

64. Saltis J, Thomas AC, Agrotis A, Campbell JH, Campbell GR, Bobik A: Expression of growth factor receptors on arterial smooth muscle cells. Dependency on cell phenotype and serum factors. Atherosclerosis 118: 77-87 (1995)

65. Schmiedt W, Kinscherf R, Deigner HP, Kamenic H, Nauen O, Kilo J, Oelert H, Metz J, Bhakdi S: Complement C6–deficiency protects against diet–induced atherosclerosis in rabbits. Arterioscler Thromb Vasc Biol 18: 1790-1795 (1998)

66. Seifert PS, Kazatchkine MD: The complement system in atherosclerosis. Atherosclerosis 73: 91-104 (1988)

67. Seifert PS, Hansson GK: Decay accelerating factor is expressed on vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic lesions. J Clin Invest 84: 597-604 (1989)

68. Seifert PS, Hugo F, Hansson GK, Bhakdi S: Prelesional complement activation in experimental atherosclerosis. Terminal C5b-9 complement deposition coincides with cholesterol accumulation in the aortic intima of hypercholesterolemic rabbits. Lab Invest 60: 747-754 (1989)

69. Seifert PS, Roth I, Schmiedt W, Oelert H, Okada N, Okada H, Bhakdi S: CD 59 (homologous restriction factor 20), a plasma membrane protein that protects against complement C5b-9 attack in human atherosclerotic lesions. Atherosclerosis 96: 135-145 (1992)

70. Smith EB, Thompson WD: Fibrin as a factor in atherogenesis. Thromb Res 73: 1-19 (1994)

71. Smith EB: Fibrinogen, Fibrin and the arterial wall. Eur Heart J 16 Suppl A: 11-14 (1995)

72. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Richardson M, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerotic–prone regions. Circulation 85: 391-405 (1992)

73. Stary HC: Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. Basic Res Cardiol 89: Suppl 1: 17-32 (1994)

74. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol: Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N Engl J Med 320: 915-924 (1989)

75. Stiles CD, Capone GT, Scher CD, Antoniades HN, van Wyk JJ, Pledger WJ: Dual control of cell growth by somatomedins and plateled-derived growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 76: 1279-1283 (1979)

76. Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaeble W, Laursen SB, Poulsen K, Willis AC, Eggleton P, Hansen S, Holmskov U, Reid KB, Jensenius JC: A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. Nature 386: 506-510 (1997)

77. Thyberg J, Hedin U, Sjölund M, Palmberg L, Bottger BA: Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cell. Arteriosclerosis 10: 966–990 (1990)

78. Torzewski J, Oldroyd R, Lachmann P, Fitzsimmons C, Proudfoot D, Bowyer D: Complement-induced release of monocyte chemotactic protein-1 from human smooth muscle cells: a possible initiating event in atherosclerotic lesion formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 16: 673-677 (1996)

79. Torzewski J, Bowyer DE, Waltenberger J, Fitzsimmons C: Processes in atherogenesis: complement activation. Atherosclerosis 132: 129-136 (1997)

80. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Frohlich M, Koenig W, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V: C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. Arterioscler Thromb Vasc Biol 18: 1386-1392 (1998)

81. Torzewski M, Torzewski J, Bowyer DE, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V, Gabbert HE: Immunohistochemical colocalisation of the terminal complex of human complement and smooth muscle cell α-actin in early atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17: 2448-2452 (1997)

82. Tsutsui H, Tomoike H, Nakamura M: Heterogeneous distribution of a diffusional tracer in the aortic wall of normal and atherosclerotic rabbits. Circ Res 67: 368-375 (1990)

83. Videm V, Wiseth R, Gunnes S, Madsen HO, Garred P: Multiple inflammatory markers in patients with significant coronary artery disease. Int J Cardiol 118: 81-87 (2007)

84. Virchow R: Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem. In: Virchow R (Hrsg.): Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin, Meidinger u. Sohn, Frankfurt/M., S. 458-463 (1856)

85. Vlaicu R, Niculescu F, Rus HG, Cristea A: Immunohistochemical localisation of the terminal C5b-9 complement complex in human aortic fibrous plaques. Atherosclerosis 57: 163-167 (1985)

86. Vlaicu R, Rus HG, Niculescu F, Cristea A: Immunoglobulins and complement components in human aortic atherosclerotic intima. Atherosclerosis 55: 35-50 (1985)

87. Volanakis JE: Complement activation by C-reactive protein complexes. Ann N Y Acad Sci 389: 235-250 (1982)

88. Von Rokitansky C: A Manual of Pathological Anatomy. 4. Auflage, The Sydenham Society, London (1852)

89. Waltenberger J: Modulation of growth factor action: implications for treatment of cardiovascular diseases. Circulation 96: 4083-4094 (1997)

90. Wilcox JN, Smith KM, Williams LT, Schwartz SM, Gordon DJ: Plateled-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridisation. J Clin Invest 82: 1134-1143 (1988)

91. Witztum JL, Steinberg D: Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. J Clin Invest 88: 1785-1792 (1991)

92. Wolbink GJ, Brouwer MC, Buysmann S, ten Berge IJ, Hack CE: CRP-mediated activation of complement in vivo: assessment by measuring circulating complement-C-reactive protein complexes. J Immunol 157: 473-479 (1996)

93. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL: Complement components, but not complement inhibitors, are upregulated in atherosclerotic plaques. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21: 1214-1219 (2001 a)

94. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL: Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. Am J Pathol 158: 1039-1051 (2001 b)

95. Yin W, Ghebrehiwet B, Peerschke EI: Expression of complement components and inhibitors on platelet microparticles. Platelets 19: 225-233 (2008)

96. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarthy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D: Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. J Clin Invest 84: 1086- 1095 (1989)

97. Yun S, Leung VW, Botto M, Boyle JJ, Haskard DO: Brief report: accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice lacking the membrane-bound complement regulator CD 59. Arterioscler Thromb Vasc Biol 28: 1714-1716 (2008)

98. Zick Y, Sagi–Eisenberg R, Pines M, Gierschik P, Spiegel AM: Multisite phosphorylation of the alpha subunit of transducin by the insulin receptor kinase and protein kinase C. Proc Natl Acad Sci USA 83: 9294-9297 (1986)

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. V. Hombach bedanken, der mir die wissenschaftliche Arbeit und die Promotion in seiner Abteilung ermöglicht hat.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jan Torzewski für die Überlassung des Themas, seine ständige Hilfsbereitschaft, die anregenden Ideen und die ausdauernde Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Weiterhin danken möchte ich auch Herrn Dr. Thomas Zwaka, der mich mit seinem großen Fachwissen in die verschiedenen Methoden der Laborarbeit eingearbeitet hat und für alle Fragen stets ein offenes Ohr hatte.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Nikolaus Marx für die zur Verfügung gestellten Plasmide und seinem Team für die kollegiale Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Magdalena Bienek für die vielen hilfreichen Ratschläge und die geduldige Unterstützung bei der Zellkultur.

Für die unermüdliche Hilfe und wertvolle Unterstützung in allen EDV–Fragen, sowie für die formale Korrektur bedanke ich mich bei Herrn Dipl.–Ing. Eberhard Strobel.

Zuletzt gilt mein Dank noch Herrn Dr. Oliver Zimmermann, Herrn Dr. Dimitar Manolov und Frau Dr. Marion Grimm für die freundschaftliche und nette Zusammenarbeit sowie die stete Hilfsbereitschaft.