Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Vinzenz Hombach

Signalwege der C-Peptid-induzierten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

Dissertation

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

von
Paulina Poletek
aus Krakau
2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Daniel Walcher

2. Berichterstatter: PD Dr. Georg von Boyen

Tag der Promotion: 19.06.2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung 1
1.1 Atherosklerose 1
1.2 Glatte Gefäßmuskelzellen und Atherosklerose 5
1.3 Diabetes mellitus Typ 2 und Atherosklerose 9
1.4 C-Peptid und Atherosklerose 11
1.5 Fragestellung und Zielsetzung 14

2. Material und Methoden 15
2.1 Material 15
2.1.1 Substanzen und Lösungen 15
2.1.2 Geräte und Kits 18
2.2 Methoden 19
2.2.1 Zellkultur 19
2.2.2 Western Blot Analysen 19
2.2.3 Densitometrische Auswertung 23
2.2.4 Statistische Analyse 23

3. Ergebnisse 24
3.1 C-Peptid aktiviert die Src-Kinase in glatten Gefäßmuskelzellen 24
3.2 C-Peptid aktiviert die PI3-Kinase in glatten Gefäßmuskelzellen 26
3.3 C-Peptid aktiviert die MAP-Kinase ERK1/2 in glatten Gefäßmuskelzellen 29
3.4 C-Peptid aktiviert den MAP-Kinase Signalweg in glatten Gefäßmuskelzellen über die Src- und die PI3-Kinase 32
3.5 Zusammenfassung aller Ergebnisse 36

4. Diskussion **37**
4.1 C-Peptid 37
4.2 Src-Kinase 39
4.3 PI3-Kinase 40
4.4 MAP-Kinase ERK1/2 41
4.5 Der intrazelluläre Signalweg bei der durch C-Peptid induzierten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen 42
4.6 Pathophysiologische Relevanz 45

5. Zusammenfassung **48**

6. Literaturverzeichnis **49**

7. Danksagung **61**

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGE	Nicht-enzymatisch glykierte Endprodukte *(advanced glycation endproducts)*
AKT	Proteinkinase B
ANOVA	Varianzanalyse *(analysis of variance)*
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basaler Fibroblastenwachstumsfaktor *(basic fibroblast growth factor)*
BSA	Rinderserumalbumin *(bovine serum albumine)*
CD	Differenzierungsantigen *(cluster of differentiation)*
Co	Kontrolle *(control)*
C-Peptid	Verbindungspeptid *(connecting peptide)*
c-Src	zelluläre Sarkom-Kinase (*cellular-sarcoma-kinase)*
ERK	Extrazellulär Signal-regulierte Kinase, =MAPK
et al.	und andere *(et alii)*
FAK	Fokale Adhäsions-Kinase
HI	Hitzeinaktiviert
HRP	Meerrettichperoxidase *(horse radish peroxidase)*
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül *(intercellular adhesion molecule)*
IFN-γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor *(insulin-like growth factor)*
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDL	Lipoproteine geringer Dichte *(low-density-lipoproteins)*
LY294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one, Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinase

MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase Kinase Kinase
MCP	Chemotaktisches Monozytenprotein *(monocyte chemotactic protein)*
MEK	=MAPK
µg	Mykrogramm
min	Minute
µl	Mykroliter
µmol	Mykromol
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
n	Fallzahl
nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
NP40	Nonyl-phenoxy-polyethoxy-ethanol 40
p	Signifikanzniveau
p-	phospho
PBS	Phosphate Buffered Saline, Pufferlösung
PD98059	2'-Amino-3'-methoxyflavone, Inhibitor der Extrazellulär Signal-regulierten Kinase
PDGF	Plättchenabhängiger Wachstumsfaktor *(platelet derived growth factor)*
PDGFR	Plättchenabhängiger Wachstumsfaktor-Rezeptor *(platelet derived growth factor receptor)*
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2	4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine, Inhibitor der Sarkom-Kinase
Raf	=MAPKKK
Ras	Ratten-Sarkom assoziierte GTPase

RASMC	Glatte aortale Rattenmuskelzelle *(rat aortal smooth muscle cell)*
RPM	Umdrehungen pro Minute *(rounds per minute)*
RSV	Rous-Sarkom-Virus
SDS	Natriumdodecylsulfat *(sodium dodecyl sulphate)*
SEM	Standardfehler des Mittelwertes *(standard error of the mean)*
SMC	Glatte Muskelzelle *(smooth muscle cell)*
Src	Sarkom-Kinase *(sarcoma-kinase)*
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
Tween	Polyoxyethylene-sorbitan-monolaurate
V	Volt
VCAM	Vaskuläres Adhäsionsmolekül *(vascular cell adhesion molecule)*
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzelle *(vascular smooth muscle cell)*
v-Src	virale Sarkom-Kinase *(viral sarcoma-kinase)*

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose beschreibt einen über Jahrzehnte ablaufenden stenosierenden Prozess, der lokalisiert an großen und mittelgroßen arteriellen Gefäßen im gesamten Körper auftritt und zu Organischämie oder Infarkt im entsprechenden Versorgungsgebiet des arteriellen Stromgebietes führt.
In Abhängigkeit von der betroffenen Gefäßregion äußert sich die Atherosklerose klinisch als koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit sowie zerebrale oder viszerale Durchblutungsstörung (49).
Die Faktoren, welche die Entstehung der Atherosklerose begünstigen, werden in zwei Klassen unterteilt. Die Hauptrisikofaktoren, welche eine hohe Korrelation mit dem Ausmaß der atherosklerotisch bedingten Gefäßschädigung aufweisen, umfassen die arterielle Hypertonie, den Diabetes mellitus, die Hyperlipidämie sowie den Zigarettenkonsum. In der Klasse II sind Risikofaktoren mit einer geringeren Korrelation, wie zum Beispiel Bewegungsmangel, Adipositas, Stress und Veränderungen der Gerinnungsfaktoren vertreten. Des Weiteren lässt sich noch eine Gruppe unbeeinflussbarer Risikofaktoren wie das Lebensalter, das Geschlecht sowie genetische Ursachen beschreiben (8).

Kardiovaskuläre Erkrankungen als klinische Manifestation der Atherosklerose zählen weltweit in entwickelten Ländern zu den häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität (33).
In Deutschland stellen die ischämischen Herzerkrankungen mit 148 641 Gestorbenen die häufigsten spezifischen Todesursachen dar, wie die Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2006 belegt (73). Heutigen Vorhersagen zufolge, werden im Jahr 2020

kardiovaskuläre Erkrankungen, vor allem die Atherosklerose, die führende Ursache für die Gesamtkrankheitsbelastung darstellen (57).

Die Atherosklerose wird nach heutigem Wissensstand als chronisch entzündliche Erkrankung beschrieben. Sie entsteht bereits im jugendlichen Alter und durchläuft ein mehrere Jahrzehnte dauerndes, asymptomatisches Stadium, bevor es durch stenosierende Veränderungen oder akute thrombotische Prozesse zu klinischen Manifestationen kommt (69,70).
Nach unserem gegenwärtigen Verständnis handelt es sich bei der Atherogenese um einen aktiven inflammatorischen Prozess in der Gefäßwand, der in verschiedenen Phasen verläuft und klassische inflammatorische Zellen wie Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten sowie inflammatorische Mediatoren involviert (54,55).

Das frühe Stadium: Endotheliale Dysfunktion

Die frühe Phase der Atherogenese ist gekennzeichnet durch die sogenannte endotheliale Dysfunktion, welche als kausaler Faktor die spätere Entstehung von atherosklerotischen Läsionen initiiert und begünstigt (29,64).
Erhöhte LDL-Spiegel, freie Radikale, welche beim Zigarettenkonsum entstehen, Hypertension, Diabetes mellitus, genetische Veränderungen, erhöhte Homozysteinspiegel und Infektionen gelten als mögliche Trigger für die endotheliale Dysfunktion (70).
Charakteristisch für diese Phase der Atherogenese sind eine veränderte Vasoreaktivität mit einer Einschränkung der endothelabhängigen Relaxation sowie eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwand für Plasmabestandteile (68). Hierbei ist das Low-Density-Lipoprotein (LDL) von besonderer Bedeutung, welches nach Einwanderung in die Intima akkumuliert und chemischen Modifikationen, wie der Oxidation und insbesondere bei Diabetikern der nicht-enzymatischen Glykosylierung unterliegt. Derart veränderte Lipoproteinpartikel können eine lokale Entzündungsreaktion

auslösen, die zahlreiche weitere Schritte in der Ausbildung einer atherosklerotischen Läsion verursacht (56). Ferner führt die endotheliale Dysfunktion zu einer Aktivierung der Endothelzellen, welche in der Folge zum einen vermehrt chemotaktisch wirksame Proteine (Chemokine) freisetzen und zum anderen leukozytäre Adhäsionsmoleküle (ICAM, VCAM) auf der Zelloberfläche exprimieren, woraus eine selektive Hyperadhäsivität für T-Lymphozyten und Monozyten resultiert (68). Die auf diese Weise angelockten mononukleären Entzündungszellen penetrieren nach Interaktion mit den Adhäsionsrezeptoren die Endothelschicht und breiten sich in der Intima aus. Hier differenzieren sich die eingewanderten Monozyten zu Makrophagen.

Die frühe atherosklerotische Plaque: „Fatty streak“

Im weiteren Verlauf akkumulieren die Makrophagen mittels sogenannter „scavenger“-Rezeptoren das subintimal abgelagerte oxidierte LDL und entwickeln sich zu Schaumzellen, dem charakteristischen Substrat der frühen atherosklerotischen Plaque (70).
Im Rahmen dieses Differenzierungsprozesses setzen die lipidbeladenen Makrophagen sowie die eingewanderten T-Lymphozyten vermehrt proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-α), Interleukine und Wachstumsfaktoren frei und protegieren auf diese Weise die Läsionsentstehung in der Gefäßwand. So aktiviert diese inflammatorische Umgebung in einem weiteren Schritt unter anderem glatte Gefäßmuskelzellen, welche unter dem Einfluss der freigesetzten Mediatoren aus der Media in die Intima migrieren und proliferieren (36,37,55). Die eingewanderten glatten Muskelzellen sind außerdem dazu befähigt, selbst proinflammatorische Botenstoffe sowie Matrixproteine zu sezernieren und halten damit im Zusammenspiel mit den Makrophagen und den aktivierten T-Lymphozyten den inflammatorischen Prozess der Plaqueentstehung in entscheidender Weise in Gang (36,59).

Die fortgeschrittene Läsion und die instabile Plaque

Weitere Lipidakkumulation sowie Apoptose führen zur Ausbildung eines nekrotischen Lipidkerns der Plaque, bestehend aus Zelldetritus untergegangener Schaumzellen und Lipiden. Kennzeichnend für die stabile Plaque ist eine fibröse Kappe, die aus eingewanderten glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix besteht und das zirkulierende Blut und die atherosklerotische Plaque voneinander trennt (59). Kommt es zur verminderten Bildung extrazellulärer Matrix durch glatte Muskelzellen, zum Beispiel infolge der Einwirkung von IFN-γ, einem Produkt der aktivierten T-Lymphozyten, sowie des vermehrten enzymatischen Abbaus der Muskelzellen oder der Degradation der Matrix durch Metalloproteinasen (MMPs), die von Schaumzellen freigesetzt werden, kann eine stabile in eine instabile Plaque übergehen. Letztere ist durch einen ausgedehnten Lipidkern, eine große Zahl von Schaumzellen und eine dünne fibröse Kappe mit nur wenigen glatten Gefäßmuskelzellen charakterisiert (2,70).

Plaqueruptur und Thrombusformation

Unter dem Einfluss von Scherkräften im Rahmen einer Blutdruckkrise kann die dünne fibröse Kappe schließlich rupturieren und somit den thrombogenen Lipidkern der Plaque freilegen (36). Konsekutiv kommt es durch den Kontakt zwischen dem zirkulierenden Blut und dem thrombogenen Material zur Aktivierung der Gerinnungskaskade, die in der Formation eines okkludierenden oder nicht okkludierenden Thrombus resultieren kann (54). Das klinische Korrelat einer solchen Plaqueruptur ist eine instabile Angina pectoris oder ein akuter Myokardinfarkt (59).

1.2 Glatte Gefäßmuskelzellen und Atherosklerose

Glatte Gefäßmuskelzellen spielen in vielerlei Hinsicht eine entscheidende Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen und nehmen bei der Restenosebildung nach Koronarintervention einen zentralen Stellenwert ein (19,70).
Im Rahmen der Atherogenese tragen sie zur Plaquebildung bei, indem sie zum einen proinflammatorische Mediatoren, wie das Chemokin MCP-1 sowie leukozytäre Adhäsionsmoleküle produzieren und zum anderen Matrix-Moleküle erzeugen, welche die Retention von Lipoproteinen begünstigen. Des Weiteren sind sie von eminenter Bedeutung im Hinblick auf die Formation einer stabilen Plaque durch die Bildung einer widerstandsfähigen fibrösen Kappe (19). In der fibrösen Plaque stellen glatte Gefäßmuskelzellen den vorherrschenden Zelltyp dar und bestimmen mittels Migration, Akkumulation und Proliferation auf entscheidende Weise das Ausmaß, die Charakteristika und die möglichen Spätkomplikationen dieser fortgeschrittenen Läsionen (65).
Die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen nimmt somit neben der Inflammation einen zentralen Stellenwert in der Atherogenese ein.

Neuere Forschungsarbeiten geben einen Einblick in den Mechanismus, welcher die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen innerhalb einer Intimaläsion triggert. Zytokine und Wachstumsfaktoren, die von modifizierten Lipoproteinen stimuliert werden, sowie andere Faktoren aus der Gefäßzellwand und den infiltrierenden Leukozyten können die Funktion der glatten Muskelzellen modulieren. So kann der plättchenabhängige Wachstumsfaktor (PDGF), der von aktivierten Endothelzellen gebildet wird, die Proliferation der Gefäßmuskelzellen stimulieren. Verschiedene lokal produzierte Wachstumsfaktoren können die Proliferation sowohl der ursprünglichen glatten Muskelzellen als auch jener, die in die Intima eingewandert sind, induzieren (56). Eine derartige proliferative Wirkung auf

die glatten Gefäßmuskelzellen wurde beispielsweise unter dem Einfluss des Insulinähnlichen Wachstumsfaktors-1 (IGF-1), des TNF-α sowie den Interleukinen 1 und 6 nachgewiesen (65). Diese Mediatoren werden in gesunden humanen Arterien zwar nur in äußerst geringen Mengen gebildet, unterliegen jedoch in atherosklerotischen Läsionen einer gesteigerten Produktion (66). Im Rattenmodell konnte ferner der von untergehenden Gefäßzellen freigesetzte basale Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) als weiterer Initiator der Muskelzellproliferation identifiziert werden. Schließlich trägt auch eine verminderte Bildung von NO durch die Endothelzellen im Rahmen der Atherogenese zu einer gesteigerten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen bei (19).

Die folgenden intrazellulären Signalmoleküle sind an dem Prozess der Gefäßmuskelzellproliferation auf molekularer Ebene beteiligt (6,12,82).

Sarkom-Kinase (Src-Kinase)

Die Src-Kinase gehört zur Familie der Tyrosin-Kinasen und wurde als erster Vertreter dieser Gruppe identifiziert (52).
Der Grundstein für die Erforschung von Src wurde durch die Entdeckung des Rous-Sarkom-Virus (RSV), dem ersten isolierten kanzerogenen Retrovirus, von Peyton Rous im Jahre 1910 gelegt. Im Rahmen der Analyse des RSV-Genoms gelang die Ermittlung des v-Src-Gens, dem ersten Onkogen, welches aus einem Virus isoliert wurde und für das starke kanzerogene Potential des RSV verantwortlich ist.
C-Src stellt das zelluläre Pendant zu v-Src dar und ist ein Protein, welches an der Signalübertragung bei einer Vielzahl von Vorgängen, wie der Proliferation, der Differenzierung und der Adhäsion in eukaryontischen Zellen beteiligt ist (76). Im Unterschied zu v-Src fehlen bei c-Src die Punktmutationen, welche zu der starken Zelltransformationsfähigkeit des viralen Proteins beitragen.

Die Aktivität der Src-Kinase wird in entscheidendem Maße über ihren Phosphorylierungszustand reguliert. Die Tyrosin-Kinase mit einer molekularen Masse von 60 kDa ist aus mehreren Domänen aufgebaut und besitzt zwei unterschiedlich lokalisierte Tyrosinreste, die je nach Phosphorylierungsstatus zu einer Steigerung oder einer Drosselung der Enzymaktivität von Src führen.
Mehrere Studien ergaben hinsichtlich der Lokalisation von Src eine enge Assoziation der Tyrosin-Kinase mit Zellmembranen, insbesondere mit der Plasmamembran, der perinukleären sowie der endosomalen Membran. An der Plasmamembran ist die Src-Kinase über aktivierte Wachstumsfaktor-Rezeptoren an wichtigen Prozessen der Signaltransduktion beteiligt, die das Zellwachstum und die Proliferation regulieren.
Substanzen, welche die Src-Kinase aktivieren, sind zum Beispiel der Plättchenabhängige Wachstumsfaktor-Rezeptor (PDGFR), das Low-Density-Lipoprotein (12) und die Fokale Adhäsions-Kinase (FAK), welche über weitere Signalschritte unter anderem zur Aktivierung des ERK-Signalweges führt (5).

Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase)

Die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) koordiniert über ihre Phosphorylierungsaktivität verschiedene zelluläre Vorgänge, wie die Reorganisation des Zytoskeletts, den Zellmetabolismus und das Zellwachstum und reguliert auf diese Weise die Migration, den Eintritt in den Zellzyklus sowie den allgemeinen Fortbestand der Zelle.

Die PI3-Kinase besteht aus zwei Untereinheiten und katalysiert bei den oben genannten Regulationsprozessen unter anderem die Produktion des Second Messengers Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat mittels der Phosphorylierung von Phosphatidylinositol, Phosphatidylinositol-4-Phosphat

sowie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Forschungsergebnisse zeigten, dass die PI3-Kinase Eigenschaften einer Lipid- sowie einer Protein-Kinase in sich vereinigt.

Diverse Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel PDGF, sowie Hormone aktivieren die PI3-Kinase und triggern dadurch die Phosphorylierungsvorgänge (10,34).

Dabei konnte in verschiedenen Studien AKT mit einer molekularen Masse von 60 kDa als direktes downstream-Produkt der PI3-Kinase nach deren Aktivierung durch Wachstumsfaktoren identifiziert werden. AKT ist ein Protoonkogen, welches für eine Serin/Threonin-Kinase kodiert, die ubiquitär vorkommt und den Zellzyklus sowie die Apoptose reguliert (27,28).

Extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1 und 2 (ERK1/2)

Die Extrazellulär Signal-regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1 und ERK2) gehören zur Gruppe der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK), die in allen Eukaryonten vorkommen. Sie zählen gemäß ihrer modifizierten Gruppen zu den Serin/Threonin-Kinasen. Die beiden Isoformen ERK1 und ERK2 mit einer molekularen Masse von jeweils 44 bzw. 42 kDa sind hochgradig homolog und agieren in derselben Signalkaskade, sodass sie oft zusammenfassend als ERK1/2 oder p44/p42 MAP-Kinase bezeichnet werden.
Die Signalkaskade, an der ERK1/2 beteiligt ist, spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellwachstums sowie der Zelldifferenzierung und -proliferation. Bei 30 Prozent aller Krebsarten ist dieser Signalweg hyperaktiviert (63).
Die Induktion der intrazellulären Signaltransduktion über die ERK1/2-Kaskade erfolgt vornehmlich durch Wachstumsfaktoren und andere Mitogene und umfasst mehrere in Serie geschaltete Kinasen, wie Ras, Raf und MEK, die ERK1/2 mittels Phosphorylierung ihrer Tyrosin- und Threonin-

Reste aktivieren. Die MAP-Kinase phosphoryliert nun ihrerseits eine Reihe regulatorisch wirksamer zytosolischer und nukleärer Proteine an ihren Serin- und Threonin-Resten und beeinflusst auf diese Weise unter anderem die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen, welche im Zellzyklus eine Rolle spielen (14,71).

1.3 Diabetes mellitus Typ 2 und Atherosklerose

Der Typ 2 Diabetes stellt mit ca. 90 Prozent die häufigste Form des Diabetes mellitus in Deutschland dar und ist hinsichtlich seines Pathomechanismus durch eine gestörte Insulinsekretion und/oder eine periphere Insulinresistenz der Zielorgane Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe charakterisiert. Die Insulinresistenz äußert sich dabei in einer eingeschränkten Sensitivität gegenüber endogenem bzw. exogen zugeführtem Insulin und geht der Manifestation des Typ 2 Diabetes bereits um Jahre voraus (16).
Die Prävalenz des bekannten Diabetes mellitus betrug 2001 in Deutschland 6,9 Prozent und ist somit im Zeitraum von 1988 bis 2001 um 43 Relativprozent angestiegen (32). Hochrechnungen entsprechend ist weltweit zwischen den Jahren 1995 und 2025 mit einer Verdoppelung der Diabetikerzahl zu rechnen (42).
Die Faktoren, welche die Entstehung eines Typ 2 Diabetes begünstigen, umfassen neben einer genetischen Disposition das Übergwicht, die falsche Ernährung sowie mangelnde körperliche Aktivität und ein höheres Lebensalter (16).

Die meist lange vor dem Auftreten eines manifesten Typ 2 Diabetes bestehende periphere Insulinresistenz geht mit klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie essenzieller Hypertonie, abdomineller Adipositas und Dyslipidämie einher. Dieses Insulinresistenzsyndrom oder

auch “Metabolisches Syndrom” zeichnet sich durch eine deutlich erhöhte Inzidenz für atherosklerotische Gefäßerkrankungen aus.
Das Insulinresistenzsyndrom und der Typ 2 Diabetes stellen unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose dar (40).
So erhöht sich das Risiko für das Auftreten einer koronaren Herzkrankheit bei Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 auf das 3- bis 4-fache gegenüber demjenigen von Nichtdiabetikern (22). Ferner stellen Gefäßkomplikationen mit bis zu 80 Prozent die Haupttodesursache der Typ-2-Diabetiker dar, wobei 75 Prozent der Todesfälle durch Komplikationen der koronaren Herzkrankheit bedingt sind (72).
Diese Fakten legen nahe, dass Typ-2-Diabetiker bereits lange vor der klinischen Diagnosestellung unter einer vaskulären Erkrankung im Sinne der Atherosklerose leiden und das kardiovaskuläre Risiko bereits im Stadium der gestörten Glucosetoleranz erhöht ist (15,31).

Die Atherosklerose weist beim Diabetiker einige strukturelle Besonderheiten auf. So zeigten pathologische und angiographische Studien, dass sich der Diabetes durch eine diffuse und akzelerierte Form der Atherosklerose auszeichnet und über eine größere Anzahl komplexer Plaques mit einer höheren Komplikationsrate verfügt. Des Weiteren ergaben Untersuchungen an Diabetikern mit instabiler Angina pectoris eine höhere Inzidenz von Plaquerupturen und Thrombenbildung sowie ein gesteigertes Risiko der Restenose nach koronarer Intervention (20,60).

Charakteristische pathophysiologische Merkmale zeigen sich beim Diabetiker auch im Hinblick auf die Atherogenese. Das wichtigste Kriterium in der Pathogenese der akzelerierten Atherosklerose ist dabei der Anstieg der nicht-enzymatischen Glykosylierung von Proteinen und Lipiden mit der Bildung und Ablagerung von „advanced glycation endproducts“ (AGE), die eine atherogene Wirkung auf vaskuläre Zellen aufweisen und deren Konzentration mit dem Schweregrad der atherosklerotischen Läsionen korreliert (31). Des Weiteren tragen erhöhte Glucosekonzentrationen zur

Entstehung der endothelialen Dysfunktion bei, indem sie die Konfluenz der Endothelzellen limitieren und begünstigen die Leukozytenadhäsion an das Endothel durch die Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen (21,39). Ferner führt der Diabetes zu einer verminderten endothelabhängigen Vasodilatation sowie einer Alteration der Thrombozytenfunktion, die einen zusätzlichen Aspekt für das thrombogene Potential bei Diabetikern darstellt (4,17).
In Bezug auf die glatten Gefäßmuskelzellen kommt es im Rahmen des Diabetes zu einer verminderten vasodilatierenden Antwort auf NO sowie zu einer erhöhten Proliferation der SMCs. Darüber hinaus zeigen die glatten Muskelzellen eine verstärkte Migration in entstehende atherosklerotische Plaques mit Bildung von extrazellulärer Matrix. Gleichzeitig kommt es bei Diabetikern jedoch auch zu einer verstärkten Apoptose der SMCs sowie einer Reduktion der Kollagensynthese mit einer konsekutiven Destabilisierung der Plaques mit Plaqueruptur (31).
Die genaueren Mechanismen, die der Dysfunktion sowie der erhöhten proliferativen Aktivität glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen der Atherogenese beim Typ 2 Diabetes zu Grunde liegen, sind derzeit noch nicht näher bekannt.

1.4 C-Peptid und Atherosklerose

Patienten, die an einer Insulinresistenz und einem beginnenden Diabetes mellitus Typ 2 leiden und somit einem gesteigerten Risiko für die Entstehung einer Atherosklerose ausgesetzt sind, verfügen typischerweise über hohe Spiegel von Insulin und C-Peptid im Blut.
Das C-Peptid („connecting peptide“) ist ein einkettiges Polypeptid aus 31 Aminosäuren und entsteht als Nebenprodukt bei der Insulinproduktion durch enzymatische Abspaltung von Proinsulin. Es wird zeitgleich und äquimolar zum Insulin in die Blutbahn sezerniert und fungiert dadurch als Marker für die Funktion der β-Zellen des Pancreas. Bedingt durch den schnellen

Abbau des Insulins in der Leber, findet man im Plasma in der Regel eine 5- bis 15-fach höhere molare Konzentration von C-Peptid gegenüber Insulin (62,75).
Neben der diagnostischen Bedeutung fand C-Peptid in der Medizin bis vor wenigen Jahren kaum Beachtung und galt als biologisch inerte Substanz. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass C-Peptid über die Bindung an einen bisher noch nicht identifizierten Oberflächenrezeptor in renalen Tubuluszellen, Pancreaszellen, Fibroblasten, Erythrozyten und Endothelzellen intrazelluläre Signalprozesse, wie z.B. die Aktivierung der Na-K-ATPase, oder die Steigerung der NO-Sekretion initiieren kann (24,25,50,61,67,78).
Neue Studienergebnisse postulieren, dass C-Peptid seine Wirkung über eine Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) in einem Prozess entfaltet, der über die Phospholipase C, die Proteinkinase C sowie die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) vermittelt wird (44,84).

Im Hinblick auf die vaskulären Effekte bei Diabetes mellitus Typ 1 konnte durch eine Substitution mit C-Peptid tierexperimentell eine Verbesserung der Mikroperfusion im Bereich der Retina und der peripheren Nerven demonstriert werden (13,35). Ferner bewirkte C-Peptid bei Typ 1 Diabetikern eine Steigerung der Skelettmuskelperfusion, des kutanen nutritiven Kapillarblutflusses sowie der Erythrozytenverformbarkeit, woraus eine Reduktion der Blutviskosität resultierte (26,38,51).

Die Wirkung des C-Peptids auf vaskuläre Zellen im Rahmen der Atherogenese bei diabetischen Typ 2 Patienten war bislang noch weitestgehend unklar. Neuere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch, dass sich C-Peptid bei diesen Patienten in der Frühphase der Atherogenese verstärkt subendothelial in der Gefäßwand ablagert und dort mit inflammatorischen Zellen kolokalisiert. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass C-Peptid *in-vitro* einen chemotaktischen Effekt auf humane Monozyten und CD4-positive Lymphozyten besitzt und

konzentrationsabhängig deren Migration in frühe atherosklerotische Läsionen induziert (58,80).

Bezüglich der Wirkung, die C-Peptid im Frühstadium der Atherogenese auf die bei diesem Prozess entscheidenden glatten Gefäßmuskelzellen entfaltet, konnten *in-vitro* Analysen unserer Arbeitsgruppe bis dato demonstrieren, dass sich C-Peptid bei Diabetikern in der Media ablagert, dort mit glatten aortalen Gefäßmuskelzellen kolokalisiert und konzentrationsabhängig deren Proliferation induziert (81).

Darüber hinaus konnte mit Hilfe von Inhibitions-Experimenten ermittelt werden, dass die Src-Kinase, die PI3-Kinase sowie die MAP-Kinase ERK1/2 in den Prozess der C-Peptid-induzierten Proliferation der SMCs involviert zu sein scheinen, da die Hemmung dieser Signalmoleküle mit deren Inhibitoren PP2, LY294002 sowie PD98059 eine Abschwächung der Proliferation dieser Zellen zur Folge hatte (81).

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Die vorliegende Studie untersucht die molekularen Mechanismen, die der Proliferationsinduktion glatter Gefäßmuskelzellen durch C-Peptid zu Grunde liegen.

Im Einzelnen ergeben sich dabei folgende Fragestellungen:

a. Aktiviert C-Peptid die Src-Kinase in glatten Gefäßmuskelzellen?
b. Aktiviert C-Peptid die PI3-Kinase in glatten Gefäßmuskelzellen?
c. Aktiviert C-Peptid die MAP-Kinase ERK1/2 in glatten Gefäßmuskelzellen?
d. Wie sieht der genaue Ablauf der Signalkaskade aus, die bei der Proliferationsinduktion glatter Gefäßmuskelzellen durch C-Peptid aktiviert wird?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Substanzen und Lösungen

Tabelle 1: Verwendete Substanzen und Lösungen

Accutase	PAA Laboratories GmbH, Austria
Acrylamid	Bio-Rad, USA
Anti-rabbit-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-rat-AKT-IgG	Cell Signaling Technologies
Anti-rat-ERK-IgG	Promega, Madison, USA
Anti-rat-Src-IgG	Cell Signaling Technologies
Anti-rat-phospho-AKT-IgG	Cell Signaling Technologies
Anti-rat-phospho-ERK-IgG	Cell Signaling Technologies
Anti-rat-phospho-Src-IgG	Cell Signaling Technologies
Aortale glatte Muskelzellen, Ratte (RASMCs)	Cell Applications, San Diego, Calif, CA 92121
APS	1 g Ammonium Persulfate (Sigma Diagnostics, USA) ad 10 ml H_20
Aqua Spüllösung	Delta-Pharma, Germany
BCA	Pierce Biotechnology, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma Diagnostics, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Austria
Bromphenolblau	Sigma Diagnostics, USA
Chemolumineszenzlösung	Pierce Biotechnology, USA
C-Peptid, Ratte	Thermo Hybaid, Germany
Glycerol	Sigma Diagnostics, USA
Glycin	Sigma Diagnostics, USA

Größenmarker Western Blot („Bench Mark Protein Ladder“)	Invitrogen, life technologies
Hungermedium RASMCs	Basalmedium ad 2,5 mg Transferrin, 2,5 mg Insulin, Penicillin und Streptomycin
Loading Buffer Western Blot	5 ml 0,5 M Trizma Base, 4 ml Glycerol, 0,8 g SDS, 0,5 ml β-Mercaptoethanol, 25 mg Bromphenolblau, ad 10 ml H_20
LY294002	Calbiochem, Germany
Lysepuffer	Nonidet P40: 50 mmol/l Tris-HCl pH 8,0, 150 mmol/l NaCl, 1 % NP-40
Kulturmedium RASMCs (“RatSMC Growth Medium Kit”)	Cell Applications, USA: 450 ml Basalmedium, 50 ml Wachstumsfaktoren, 10 % fetales bovines Serum, Penicillin (100 IU/ml), Streptomycin (100 µg/ml)
Methanol	Merck, Germany
NP40	Sigma Diagnostics, USA
PBS	PAA Laboratories GmbH, Austria
PD98059	Sigma Diagnostics, USA
PDGF	Perprotech, USA
PMA	Sigma Diagnostics, USA
PMSF	Sigma Diagnostics, USA
PP2	Calbiochem, Germany, 529 573
Protease Inhibitor	Sigma Diagnostics, USA
Running Buffer 10x Western Blot	30,3 g Trizma Base, 141 g Glycin, 10 g SDS, ad 1000 ml H_20, pH 8,3
Samplegel Western Blot	60 ml 30%iges Acrylamid, 45 ml 1,5 M Trizma Base, 1,8 ml 10%iges SDS, 71,04 ml H_20

SDS	Roth, Germany
Stackgel Western Blot	15 ml 30%iges Acrylamid, 11,25 ml 1,0 M Trizma Base, 0,9 ml 10%iges SDS
TBS	24,2 g Tris base, 80 g NaCl ad 1 l H_20, pH 7,6
TEMED	Sigma-Aldrich, USA
Transferpuffer Western Blot	Carl Roth GmbH & Co., Germany
Trizma Base	USB, USA
Tween 20	Sigma Diagnostics, USA

2.1.2 Geräte und Kits

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Kits

Blotgerät Western Blot	Bio-Rad, USA
Brutschrank	Heraeus, Germany
Chromatographiepapier	Whatman International, England
Gelkammer Western Blot	Biometra, Germany
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf
Hybridisierungsofen	Biometra, Germany
Laminar Air Flow Bench	Heraeus, Germany
Mikroskop	Axioskop 2plus, Zeiss, Germany
Netzgerät	Biometra, Germany
Nylonmembran Western Blot	Hybond, amersham pharmacia, UK
Pipetten	Gilson, France
Polypropylenröhrchen	FALCON, Becton Dickinson, USA
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Safe Lock, Eppendorf, Germany
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	FALCON, Becton Dickinson, USA
Reaktionsplatten	96-well, Greiner, Germany
Röntgenfilme	Hyperfilm, amersham pharmacia, UK
Röntgenkassetten	rego, Germany
Thermocycler	Biometra, Germany
Zellkultur Mikroskop	DMIL, Leica
Zellkulturplatten	MULTIWELL, Becton Dickinson, USA
Zellkulturschalen 100 mm	FALCON, Becton Dickinson, USA
Zentrifuge	Varifuge 3.0R, Heraeus, Germany

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Als Zellkultur bezeichnet man das Kultivieren von Zellen höherer eukaryontischer Lebewesen in einem Nährmedium außerhalb des Organismus. Die Zellkultur ist in der biomedizinischen Forschung ein wertvolles Werkzeug zur Ermittlung reproduzierbarer Daten und bietet Ansätze als Ersatz- und Ergänzungsmethode zum herkömmlichen Tierversuch. Die Kultur glatter Muskelzellen wurde zuerst von Champy, Laqueur und Lewis beschrieben.

Bei den vorliegenden Experimenten wurden aus der Ratte isolierte glatte aortale Muskelzellen von der Firma Cell Applications käuflich erworben. Die Anzüchtung der glatten Muskelzellen erfolgte auf kollagenbeschichteten Zellkulturplatten in einem spezifischen Kulturmedium, welches Wachstumsfaktoren, 10%iges fetales bovines Serum sowie Penicillin und Streptomycin enthielt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C mit 5%igem CO_2. Für die weiteren Analysen wurden Zellen der Passagen zwei bis sieben verwendet.

2.2.2 Western Blot Analysen

Der Western Blot oder auch SDS-PAGE (SDS Polyacrylamid-Gel Elektrophorese) genannt, beschreibt eine Methode, deren Ziel es ist Proteine elektrophoretisch zu trennen und dauerhaft auf einer Membran zu fixieren. Durch spezifische Antikörpernachweisreaktionen können diese Proteine anschließend sichtbar gemacht werden. Mit der Western Blot Analyse können Größe und relative Menge der exprimierten Proteine bestimmt werden. Zudem ermöglicht es diese Methode durch

entsprechende Antikörperwahl den Phosphorylierungszustand der Proteine zu ermitteln.

Mit Hilfe der Western Blot Analyse wurde zunächst die durch C-Peptid in VSMCs induzierte Aktivierung der Src-Kinase, der PI3-Kinase sowie der MAP-Kinase ERK1/2 auf Proteinbasis gezeigt.
Im nächsten Schritt konnte unter Einsatz von Inhibitoren der oben genannten Signalmoleküle die genauere Lokalisation letzterer in der Signalkaskade ermittelt werden, welche bei der C-Peptid-induzierten Proliferation glatter Muskelzellen aktiviert wird.

Um die Aktivierung der Src-Kinase nachweisen zu können wurden die wie zuvor beschrieben kultivierten RASMCs mit Ratten-C-Peptid stimuliert, das eine Konzentration von 0,5 nmol/l aufwies. Die Stimulation erfolgte dabei über einen Zeitraum von einer, drei, fünf bzw. zehn Minuten. Anschließend wurde die Phosphorylierung von Src ermittelt. PDGF (10 ng/ml) diente als Positivkontrolle.

Die Aktivierung der PI3-Kinase wurde mittels AKT, einem direkten downstream-Produkt dieser, untersucht. Nach Stimulation der RASMCs mit C-Peptid über zehn Minuten wurde die Phosphorylierung von AKT ermittelt. PDGF (10 ng/ml) diente erneut als Ladungskontrolle.

Beim Nachweis der Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 wurde die durch C-Peptid induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer (1 – 60 Minuten) bzw. der unterschiedlichen Konzentrationen des C-Peptids (0,05 – 1,0 nmol/l) ermittelt. Hitzeinaktiviertes C-Peptid (0,5 nmol/l) diente hierbei als Negativ-, PDGF (10 ng/ml) als Positivkontrolle.

Zur abschließend durchgeführten Ermittlung der Signalkaskade, welche bei der Proliferationsinduktion glatter Muskelzellen durch C-Peptid aktiviert wird,

wurden die RASMCs 30 Minuten lang bei 37°C mit dem Src-Kinase Inhibitor PP2, dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 sowie dem ERK1/2 Inhibitor PD98059 vorbehandelt. Alle drei Inhibitoren wiesen eine Konzentration von 5 µmol/l auf. Anschließend wurden die Zellen zehn Minuten lang mit Ratten-C-Peptid (0,5 nmol/l) inkubiert und die Phosphorylierung von AKT bzw. ERK1/2 wurde bestimmt.

Die Untersuchung der Phosphorylierung der verschiedenen Signalmoleküle mittels Western Blot verlief anschließend analog wie im Folgenden beschrieben; nach der Stimulation wurden die Zellen auf Eis gelegt, mit 10 ml PBS gewaschen und mit 180 µl Lysepuffer Nonidet P40 behandelt. Anschließend erfolgte die Überführung in vorgekühlte Reaktionsgefäße und eine Zentrifugation von 14000 RPM über zehn Minuten bei 4°C, deren Resultat eine Trennung zwischen den Zellkernen im Pellet und dem Zytosolextrakt im Überstand war.

Gelelektrophorese

Die Proteinmengen des zytosolischen Extraktes wurden mit Hilfe der photometrischen Konzentrationsbestimmung auf ein gleiches Volumen eingestellt. Ein Viertel des nun vorhandenen Volumens wurde als Loading Buffer hinzugegeben. Anschließendes Erhitzen bei 100°C über zehn Minuten führte zu einer Denaturierung und Reduzierung der Beschaffenheit der Proteinproben.
Die auf diese Weise vorbereiteten Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, welches zuvor unter Verwendung eines 12%igen Sample- sowie eines 5%igen Stackgels hergestellt wurde. Schließlich erfolgte die Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V über einen Zeitraum von zweieinhalb Stunden.

Blotting

Die aufgetrennten Proteine wurden im „wet-Verfahren“ auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierbei werden die Membran und das Trenngel aufeinander zwischen zwei Lagen Whatman Chromatographiepapier und zwei Support-Pads in eine Kassette eingespannt. Sowohl die Membran als auch das Gel und das Chromatographiepapier wurden zuvor in Transferpuffer eingelegt, wobei die Membran außerdem noch mit Methanol behandelt wurde. Die auf diese Weise gefüllte Kassette wird in das Blot-Gerät gestellt, welches mit Transferpuffer gefüllt ist. Durch die Anlage einer Spannung von 90 V über 60 Minuten wandern die Proteine vom Gel auf die Membran. Für die anschließend durchgeführten Nachweisreaktionen ist es essenziell unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch eine einstündige Inkubation in 5%iger Milch bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C abzusättigen.

Staining

Um die durch C-Peptid induzierte Phosphorylierung von Src, AKT und ERK1/2 auf der Membran sichtbar zu machen erfolgte im weiteren Verlauf eine 24-stündige Inkubation der Membran in 5%igem BSA mit einem „rabbit-anti-rat-p-Src“-, „rabbit-anti-rat-p-AKT“- bzw. „rabbit-anti-rat-p-ERK1/2“-Antikörper bei 4°C. Als Ladungskontrolle diente nach durchgeführtem Stripping jeweils die unphosphorylierte Form der Proteine.
Nach drei Waschvorgängen mit TBST wurde anschließend die Inkubation mit dem Sekundärantikörper durchgeführt. Dieser „goat-anti-rabbit“-Antikörper ist gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und zur Detektion an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt.
Die Antigendetektion erfolgte schließlich nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST mit einer Chemolumineszenzlösung, in welche die Membran eingetaucht wurde. Dadurch kommt es zu einer durch die

Peroxidase hervorgerufenen Oxidation des in der Lösung enthaltenen Luminols. Diese Reaktion führt zu einer Lichtemission mit einer maximalen Wellenlänge von 428 nm, die im letzten Schritt in einer Dunkelkammer mit Hilfe eines Entwicklergerätes und eines Röntgenfilmes die spezifischen Proteinbanden sichtbar werden lässt.

2.2.3 Densitometrische Auswertung

Die durchgeführten Western Blots wurden zunächst gescannt und bei Bedarf mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes ImageJ aufgearbeitet. Anschließend erfolgte die densitometrische Auswertung sowie die graphische Darstellung.

2.2.4 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden in Microsoft Excel verarbeitet und als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Die Unterschiede wurden mittels 1-way-ANOVA und nachfolgendem Duncan's post-hoc-test analysiert. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 C-Peptid aktiviert die Src-Kinase in glatten Gefäßmuskelzellen

Es wurde mittels Western Blot Analysen untersucht, ob C-Peptid eine aktivierende Wirkung auf die Src-Kinase in glatten Gefäßmuskelzellen besitzt.
Hierzu wurden RASMCs über einen Zeitraum von einer, drei, fünf bzw. zehn Minuten mit Ratten-C-Peptid (0,5 nmol/l) stimuliert. Anschließend wurde die Phosphorylierung von Src ermittelt.
C-Peptid induzierte nach einer Stimulationszeit von einer Minute die Phosphorylierung von Src in RASMCs signifikant ($p < 0,05$ im Vergleich zu unstimulierten Zellen; $n=4$), wie aus Abbildung 1 ersichtlich ist.

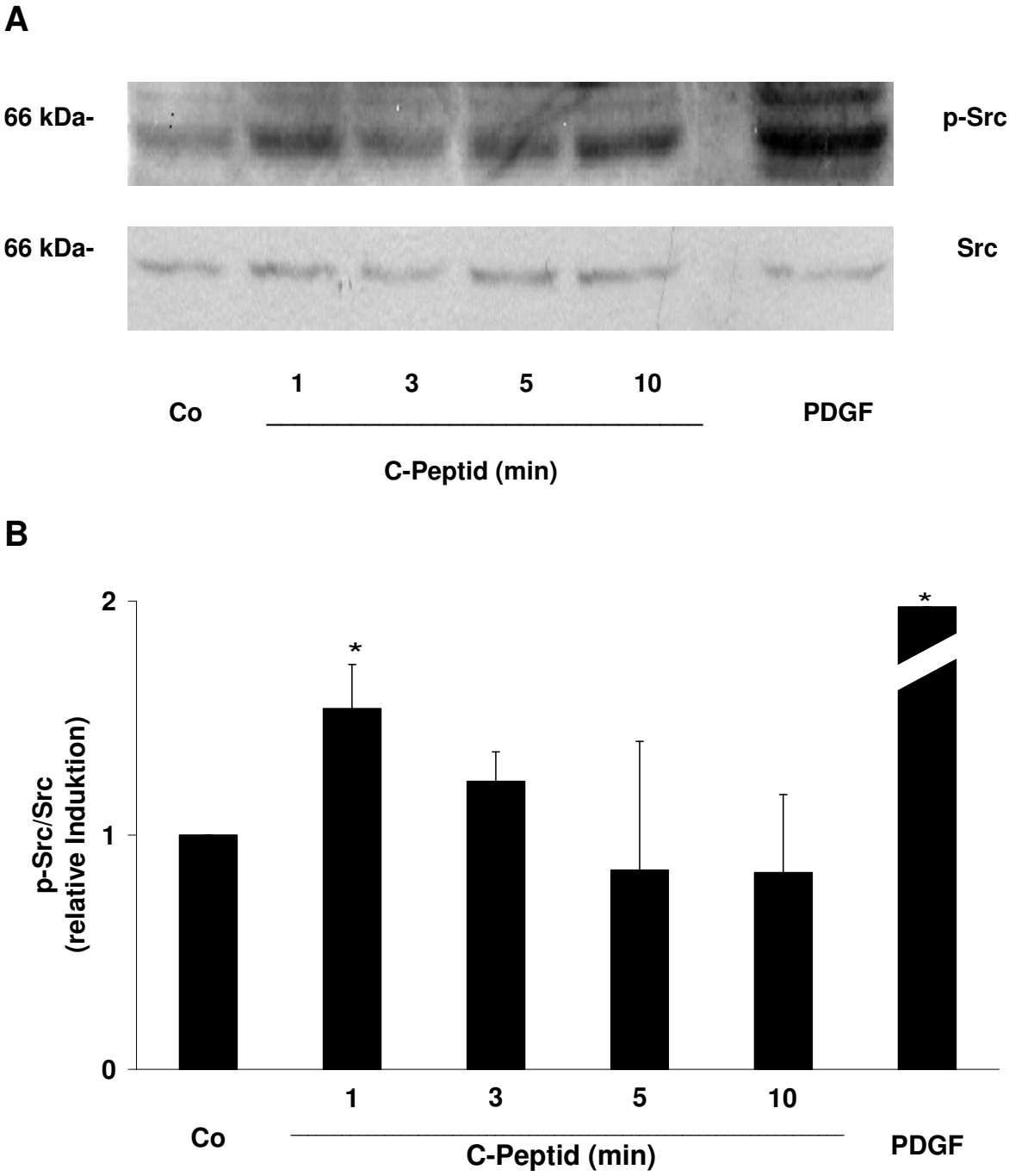
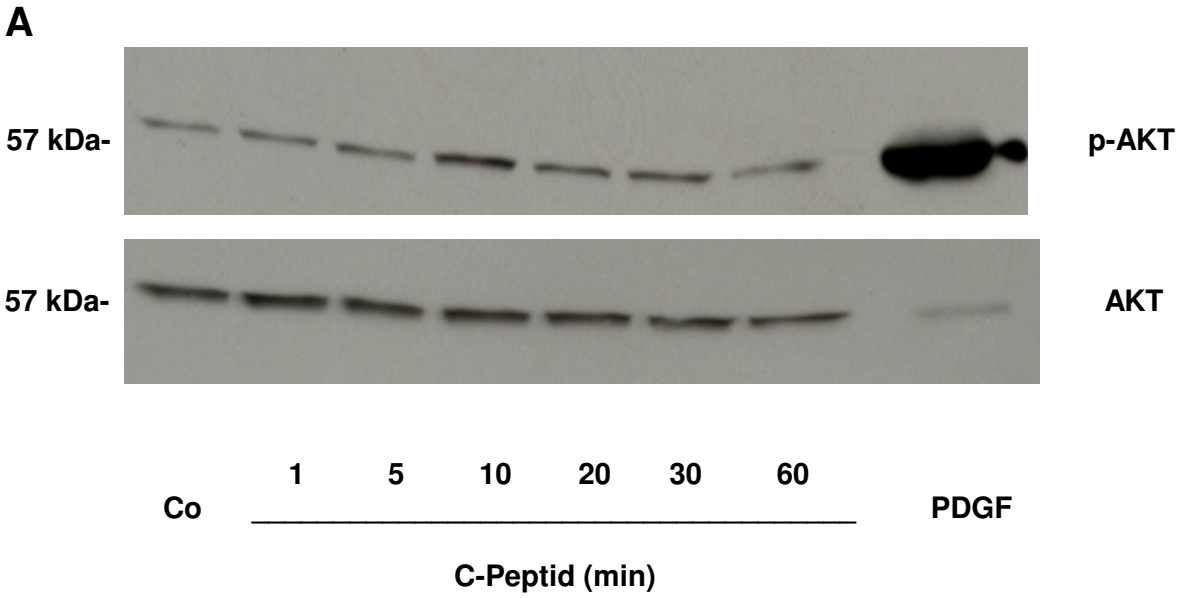


Abbildung 1: Western Blot Analyse zur Aktivierung der Src-Kinase (Sarkom-Kinase: 66 Kilodalton) in glatten Gefäßmuskelzellen durch C-Peptid.

A, Glatte aortale Rattenmuskelzellen wurden mit Ratten-C-Peptid (0,5 nmol/l) über einen Zeitraum von einer, drei, fünf bzw. zehn Minuten stimuliert. Anschließend wurde die Phosphorylierung von Src mit einem spezifischen Antikörper gegen p-Src (phospho-Src) ermittelt. PDGF (Plättchenabhängiger Wachstumsfaktor: 10 ng/ml) diente als Positivkontrolle. Die unphosphorylierte Form von Src wurde als Ladungskontrolle herangezogen. B, Densitometrische Analyse von vier unabhängigen Experimenten. Das Diagramm stellt die relative Induktion von p-Src zu Src im Vergleich zur Kontrolle (Co) dar. Die Säulen zeigen Mittelwert ±Standardfehler; *p <0,05 im Vergleich zu unstimulierten Zellen; n=4.

3.2 C-Peptid aktiviert die PI3-Kinase in glatten Gefäßmuskelzellen

Die Wirkung von C-Peptid auf die Aktivität der PI3-Kinase wurde in Western Blot Analysen mittels der Aktivitätsprüfung von AKT, einem direkten downstream-Produkt der PI3-Kinase untersucht.
RASMCs wurden mit C-Peptid stimuliert und die Phosphorylierung von AKT wurde zum einen in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer (1 – 60 Minuten) und zum anderen von der Konzentration des C-Peptids (0,05 – 1,0 nmol/l) ermittelt.
C-Peptid induzierte zeit- und konzentrationsabhängig (Abb. 2 und 3) die Phosphorylierung von AKT in RASMCs mit einer maximalen Induktion von 2,3 ±1,0 bei einer Stimulationsdauer von zehn Minuten sowie 2,0 ±0,5 bei einer C-Peptid-Konzentration von 0,5 nmol/l ($p < 0,05$ im Vergleich zu unstimulierten Zellen; $n=3$). Hierdurch konnte die Aktivierung der PI3-Kinase durch das C-Peptid belegt werden.



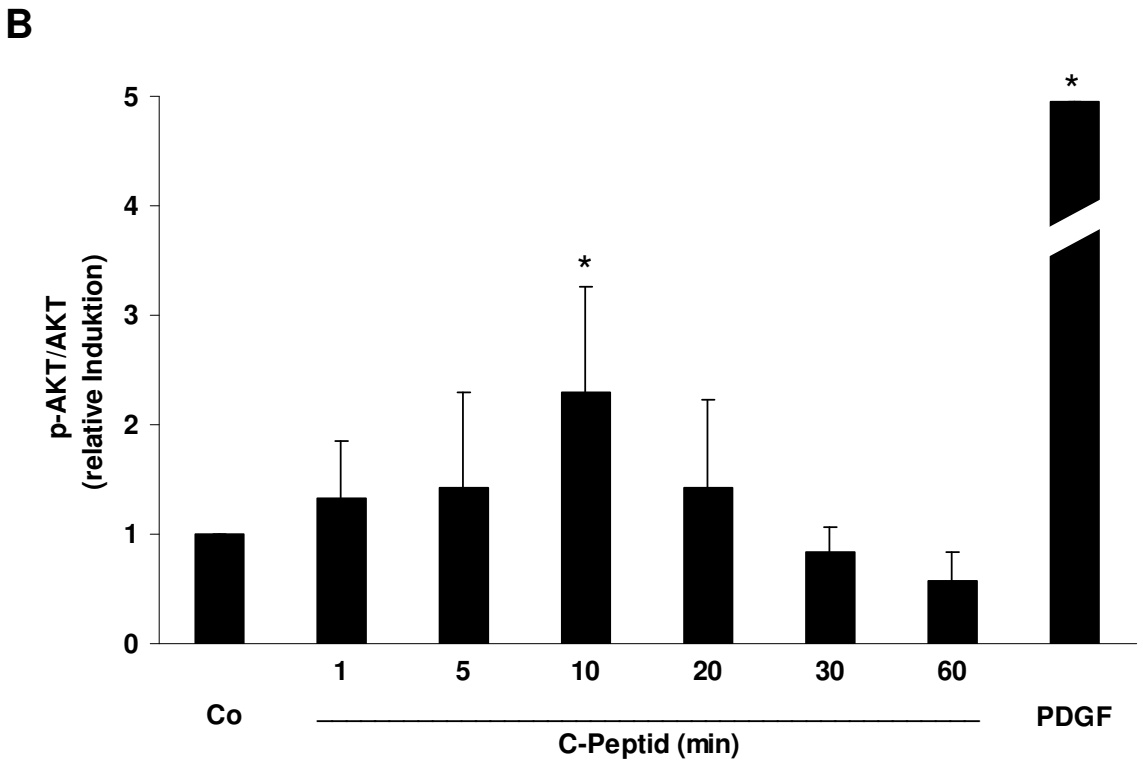


Abbildung 2: Western Blot Analyse zur Aktivierung der PI3-Kinase (Phosphatidylinositol 3-Kinase) in glatten Gefäßmuskelzellen durch C-Peptid in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer.
A, Nach Stimulation der glatten aortalen Rattenmuskelzellen mit Ratten-C-Peptid (0,5 nmol/l) für die Dauer von 1 bis 60 Minuten wurde die Phosphorylierung von AKT (Proteinkinase B: 57 Kilodalton) mit einem spezifischen Antikörper gegen p-AKT (phospho-AKT) ermittelt. PDGF (Plättchenabhängiger Wachstumsfaktor: 10 ng/ml) diente als Positivkontrolle, die unphosphorylierte Form von AKT als Ladungskontrolle. B, Densitometrische Analyse von drei unabhängigen Experimenten. Das Diagramm stellt die relative Induktion von p-AKT zu AKT im Vergleich zur Kontrolle (Co) dar. Die Säulen zeigen Mittelwert ±Standardfehler; *p <0,05 im Vergleich zu unstimulierten Zellen; n=3.

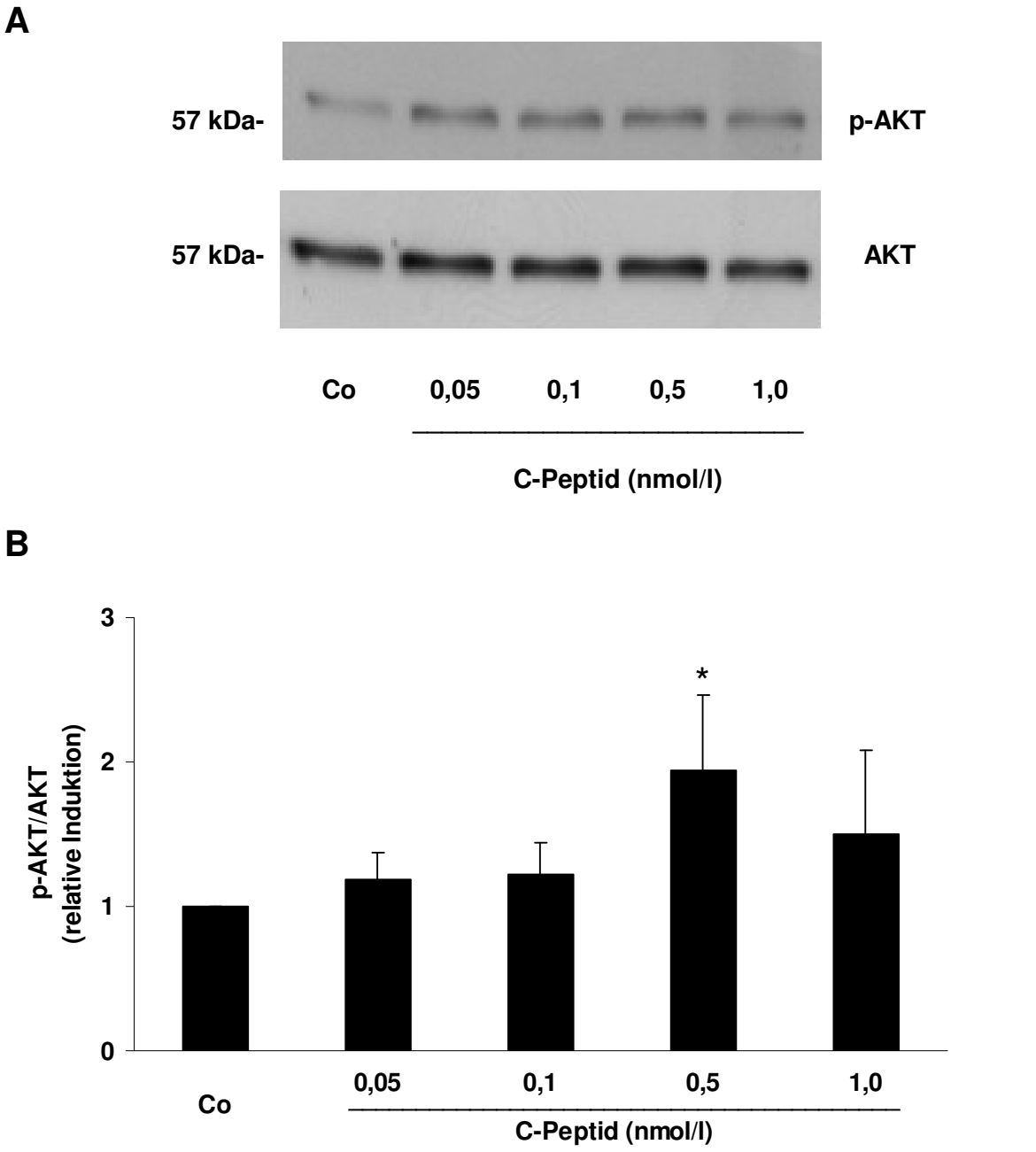


Abbildung 3: Western Blot Analyse zur Aktivierung der PI3-Kinase (Phosphatidylinositol 3-Kinase) in glatten Gefäßmuskelzellen durch C-Peptid in Abhängigkeit von der C-Peptid-Konzentration. A, Nach Stimulation der glatten aortalen Rattenmuskelzellen mit Ratten-C-Peptid in Konzentrationen von 0,05 bis 1,0 nmol/l über einen Zeitraum von zehn Minuten wurde die Phosphorylierung von AKT (Proteinkinase B: 57 Kilodalton) mit einem spezifischen Antikörper gegen p-AKT (phospho-AKT) ermittelt. Die unphosphorylierte Form von AKT diente als Ladungskontrolle. B, Densitometrische Analyse von drei unabhängigen Experimenten. Das Diagramm stellt die relative Induktion von p-AKT zu AKT im Vergleich zur Kontrolle (Co) dar. Die Säulen zeigen Mittelwert ±Standardfehler; *p <0,05 im Vergleich zu unstimulierten Zellen; n=3.

3.3 C-Peptid aktiviert die MAP-Kinase ERK1/2 in glatten Gefäßmuskelzellen

Mit Hilfe der nachfolgend dargestellten Western Blot Analysen sollte untersucht werden, ob C-Peptid bei der Proliferationsinduktion glatter Gefäßmuskelzellen einen direkten Einfluss auf die Aktivität der MAP-Kinase ERK1/2 nimmt.

Hierzu wurden RASMCs mit C-Peptid stimuliert und die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde zum einen in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer (1 – 60 Minuten) und zum anderen von der Konzentration des C-Peptids (0,05 – 1,0 nmol/l) ermittelt.

C-Peptid induzierte zeit- und konzentrationsabhängig die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 in RASMCs mit einer maximalen Induktion von 3,1 ±1,6 bei einer Stimulationsdauer von zehn Minuten sowie 2,0 ±0,4 bei einer C-Peptid-Konzentration von 0,5 nmol/l ($p < 0,05$ im Vergleich zu unstimulierten Zellen; $n=5$).

Hitzeinaktiviertes C-Peptid zeigte keinen derartigen Aktivierungseffekt.

Die Resultate der Zeit- und Konzentrationskinetik sind in Abb. 4 und 5 dargestellt.

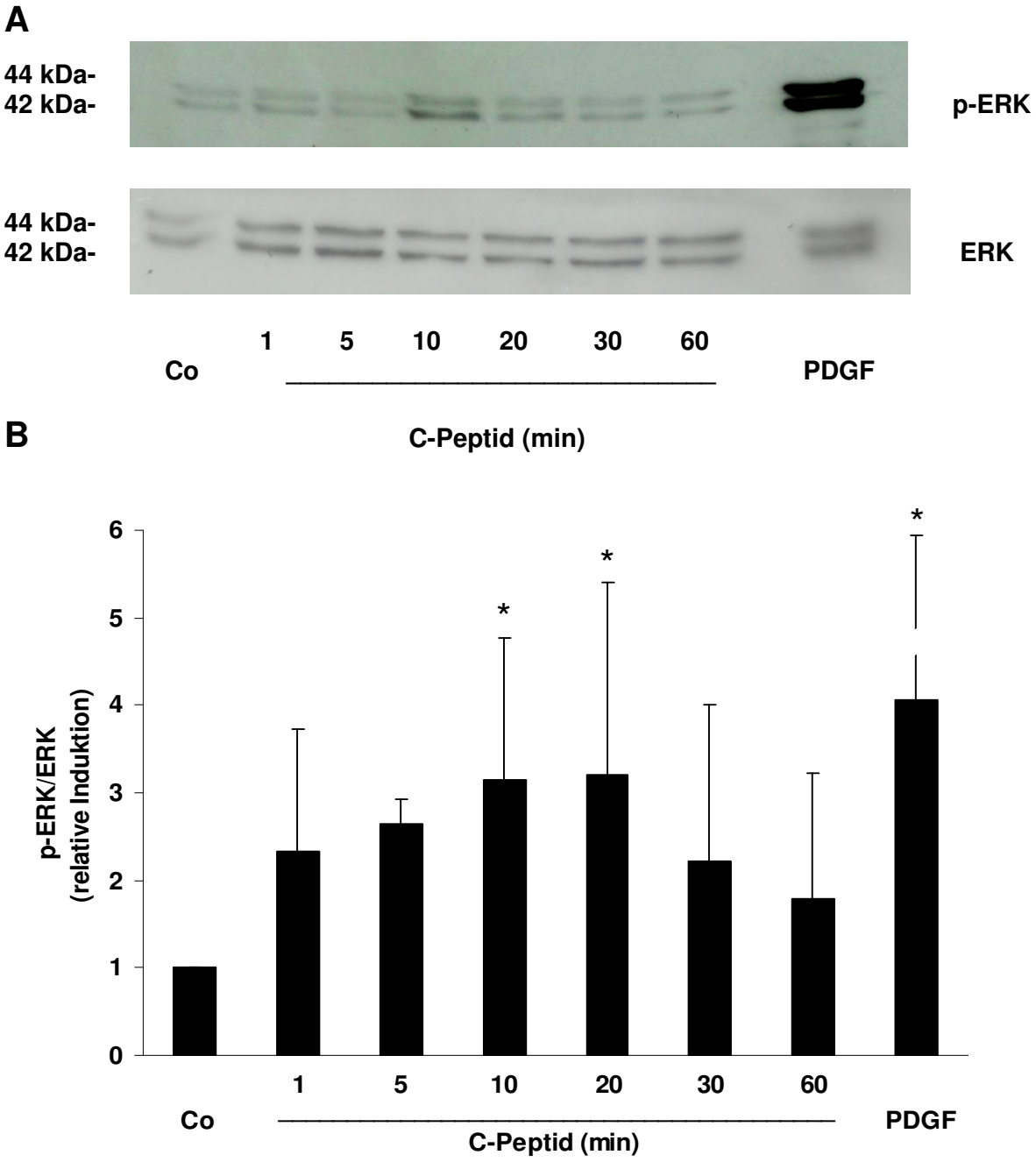


Abbildung 4: Western Blot Analyse zur Aktivierung von ERK1/2 (Extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1/2: 42/44 Kilodalton) in glatten Gefäßmuskelzellen durch C-Peptid in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer.

A, Glatte aortale Rattenmuskelzellen wurden über einen Zeitraum von 1 bis 60 Minuten mit Ratten-C-Peptid (0,5 nmol/l) stimuliert und die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen p-ERK (phospho-ERK) ermittelt. PDGF (Plättchenabhängiger Wachstumsfaktor: 10 ng/ml) diente hierbei als Positivkontrolle, die unphosphorylierte Form von ERK als Ladungskontrolle. B, Densitometrische Analyse von fünf unabhängigen Experimenten. Das Diagramm stellt die relative Induktion von p-ERK zu ERK im Vergleich zur Kontrolle (Co) dar. Die Säulen zeigen Mittelwert ±Standardfehler; *p <0,05 im Vergleich zu unstimulierten Zellen; n=5.

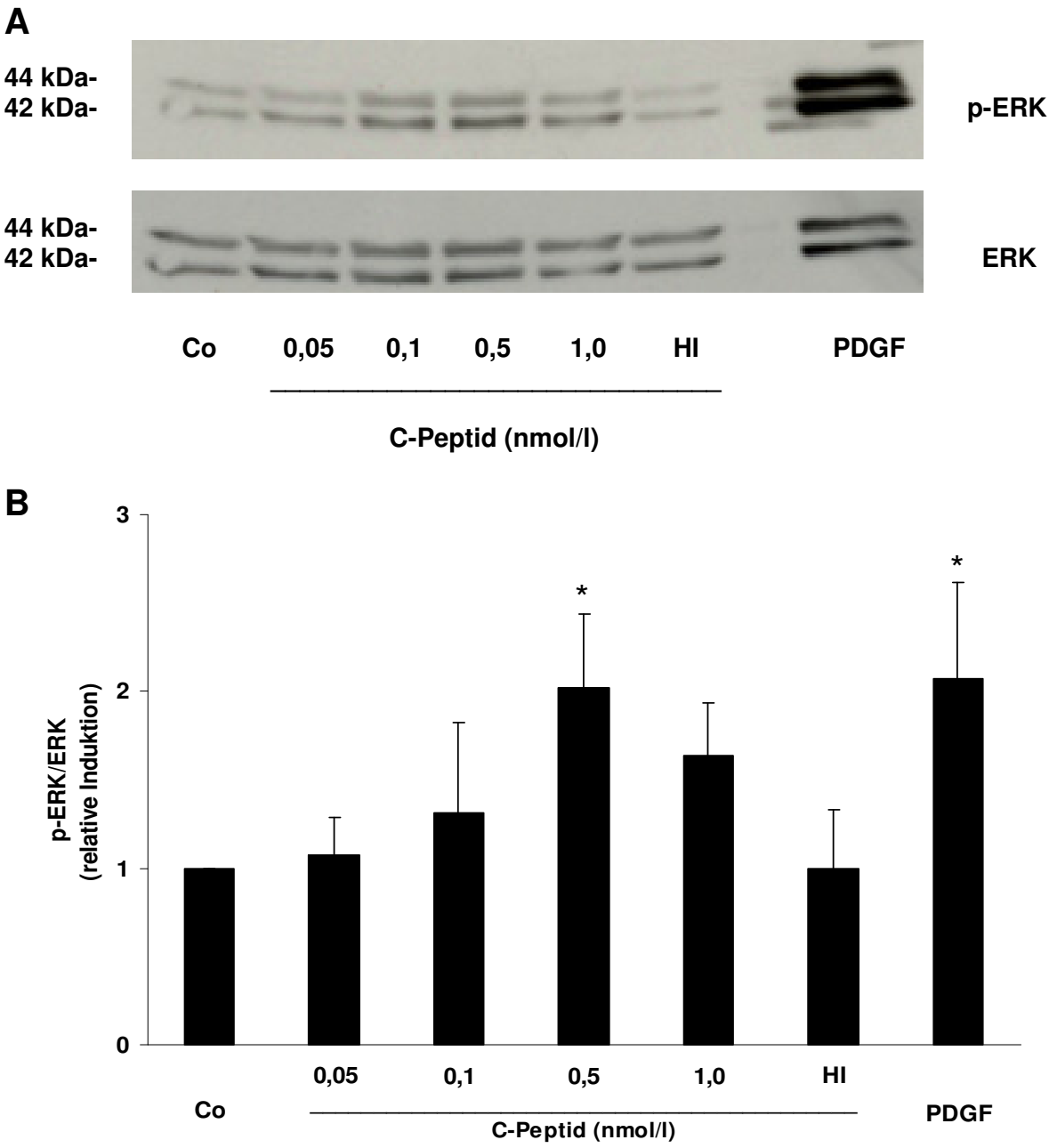


Abbildung 5: Western Blot Analyse zur Aktivierung von ERK1/2 (Extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1/2: 42/44 Kilodalton) in glatten Gefäßmuskelzellen durch C-Peptid in Abhängigkeit von der C-Peptid-Konzentration.

A, Glatte aortale Rattenmuskelzellen wurden zehn Minuten lang mit Ratten-C-Peptid in Konzentrationen von 0,05 bis 1,0 nmol/l stimuliert und die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen p-ERK (phospho-ERK) ermittelt. Hitzeinaktiviertes C-Peptid (HI: 0,5 nmol/l) diente hierbei als Negativ-, PDGF (Plättchenabhängiger Wachstumsfaktor: 10 ng/ml) als Positivkontrolle. Die unphosphorylierte Form von ERK fand als Ladungskontrolle Verwendung. B, Densitometrische Analyse von fünf unabhängigen Experimenten. Das Diagramm stellt die relative Induktion von p-ERK zu ERK im Vergleich zur Kontrolle (Co) dar. Die Säulen zeigen Mittelwert ±Standardfehler; *p <0,05 im Vergleich zu unstimulierten Zellen; n=5.

3.4 C-Peptid aktiviert den MAP-Kinase Signalweg in glatten Gefäßmuskelzellen über die Src- und die PI3-Kinase

Zur Ermittlung der genauen Lokalisation der Src-, PI3- sowie der MAP-Kinase ERK1/2 in der Signalkaskade, welche bei der Proliferationsinduktion glatter Gefäßmuskelzellen durch C-Peptid abläuft, wurde zunächst mittels Western Blot Analysen untersucht, ob die Src-Kinase upstream der PI3-Kinase agiert.
Hierzu wurden die RASMCs 30 Minuten lang mit dem Src-Kinase Inhibitor PP2 (5 µmol/l) sowie dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 (5 µmol/l) inkubiert. Nach erfolgter Stimulation der Zellen mit C-Peptid (0,5 nmol/l) über zehn Minuten wurde der Effekt dieser Vorbehandlung auf die Phosphorylierung von AKT, dem Substrat des aktivierten PI3-Kinase-Signalweges, ermittelt.
Der Versuch demonstrierte, dass die Hemmung der Src-Kinase eine Reduktion der C-Peptid-vermittelten Phosphorylierung von AKT zur Folge hat ($p < 0,05$, $n=5$), wie Abb.6 verdeutlicht. Hierdurch konnte belegt werden, dass die Aktivierung der Src-Kinase durch das C-Peptid upstream der PI3-Kinase erfolgt.

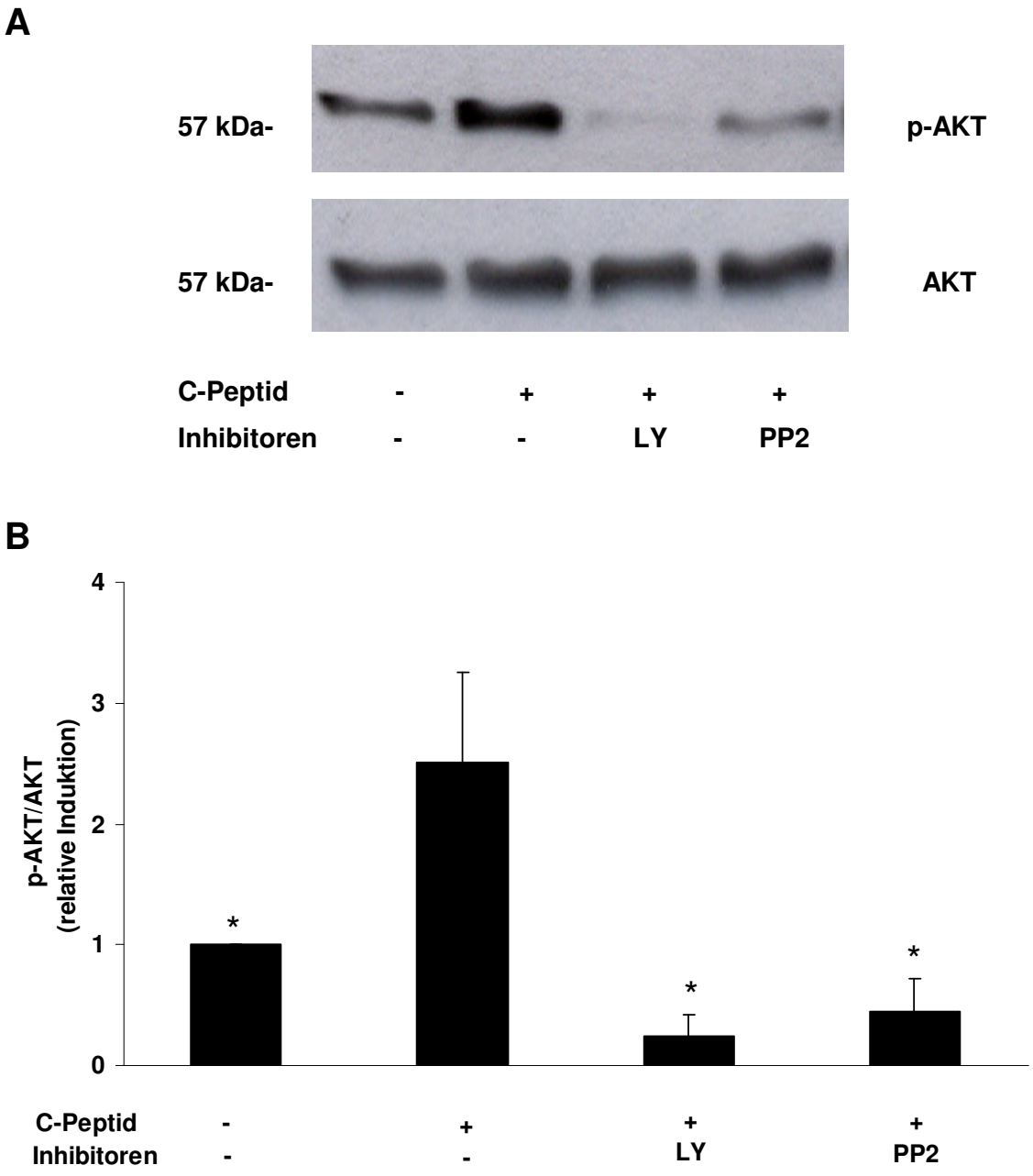


Abbildung 6: Western Blot Analyse zur Aktivierung des PI3-Kinase-Signalweges (Phosphatidylinositol 3-Kinase) in glatten Gefäßmuskelzellen durch C-Peptid downstream der Src-Kinase (Sarkom-Kinase).

A, Glatte aortale Rattenmuskelzellen wurden 30 Minuten lang bei 37°C mit dem Src-Kinase Inhibitor PP2 sowie dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 vorbehandelt. Die beiden Inhibitoren wiesen jeweils eine Konzentration von 5 µmol/l auf. Anschließend wurden die Zellen zehn Minuten lang mit Ratten-C-Peptid (0,5 nmol/l) inkubiert und die Phosphorylierung von AKT (Proteinkinase B: 57 Kilodalton) wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen p-AKT (phospho-AKT) ermittelt. Die unphosphorylierte Form von AKT diente als Ladungskontrolle. B, Densitometrische Analyse von fünf unabhängigen Experimenten. Das Diagramm stellt die relative Induktion von p-AKT zu AKT im Vergleich zur Kontrolle (Co) dar. Die Säulen zeigen Mittelwert ±Standardfehler; *p <0,05 im Vergleich zu C-Peptid-stimulierten Zellen; n=5.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Aktivierung der Src- sowie der PI3-Kinase upstream der durch C-Peptid induzierten Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 stattfindet.
Die RASMCs wurden dabei 30 Minuten lang mit PP2 (5 µmol/l), LY294002 (5 µmol/l) sowie PD98059, einem Inhibitor von ERK1/2, vorbehandelt. Nach der anschließenden Stimulation der Zellen mit C-Peptid (5 nmol/l) über zehn Minuten wurde eruiert, welche Auswirkung die Hemmung der Src- sowie der PI3-Kinase auf die Phosphorylierung von ERK1/2 hat.
Es zeigte sich, dass beide Inhibitoren die durch C-Peptid induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinase aufheben ($p < 0,05$, $n=7$) und demzufolge die Aktivierung der Src- sowie PI3-Kinase durch das C-Peptid upstream der MAP-Kinase ERK1/2 abläuft (Abb.7).

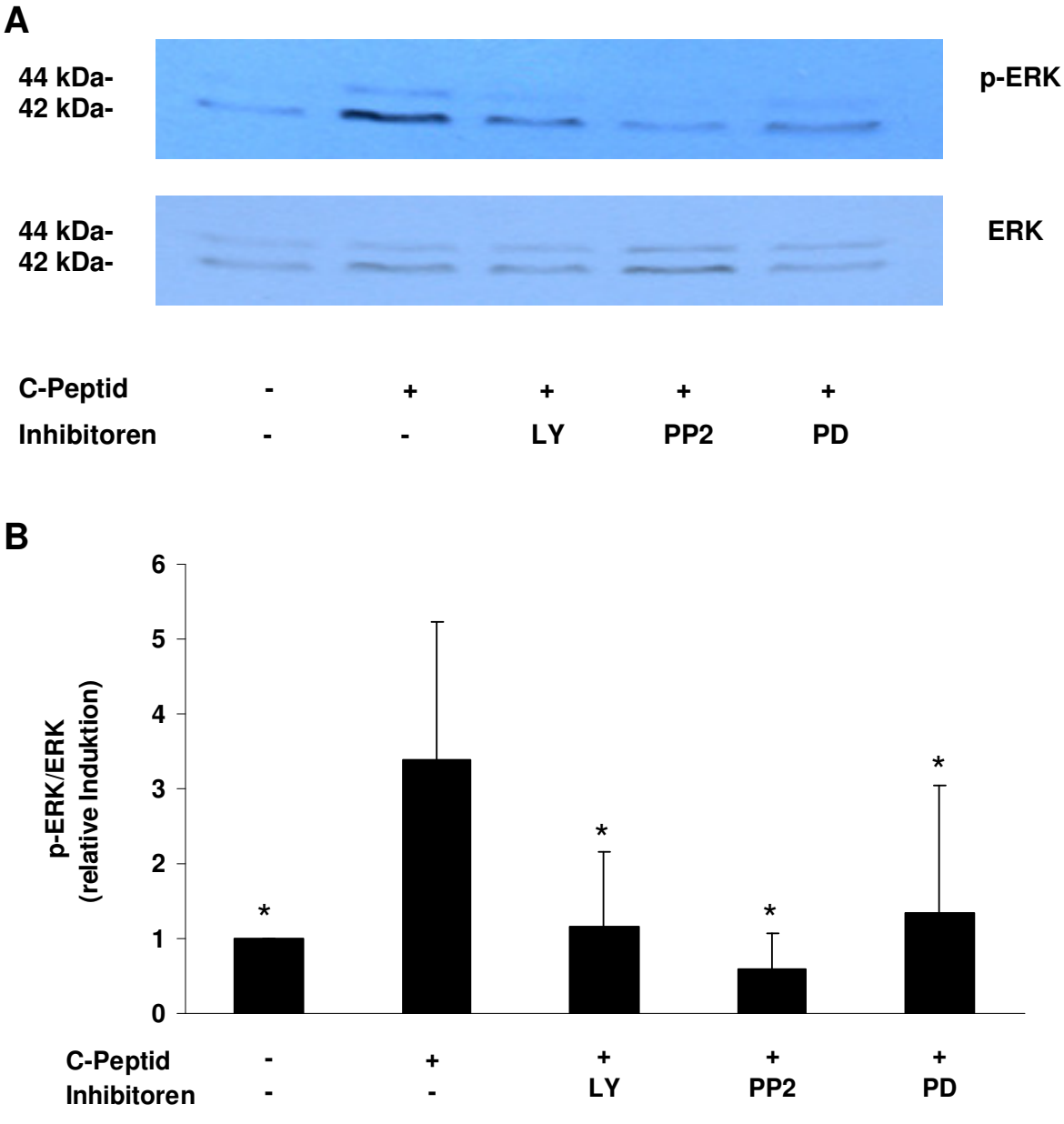


Abbildung 7: Western Blot Analyse zur Aktivierung des ERK1/2-Signalweges (Extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1/2: 42/44 Kilodalton) in glatten Gefäßmuskelzellen durch C-Peptid downstream der Src-Kinase (Sarkom-Kinase) sowie der PI3-Kinase (Phosphatidylinositol 3-Kinase).
A, Glatte aortale Rattenmuskelzellen wurden 30 Minuten lang bei 37°C mit dem Src-Kinase Inhibitor PP2, dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 sowie dem ERK1/2 Inhibitor PD98059 vorbehandelt. Alle drei Inhibitoren wiesen jeweils eine Konzentration von 5 µmol/l auf. Anschließend wurden die Zellen zehn Minuten lang mit Ratten-C-Peptid (0,5 nmol/l) inkubiert und die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen p-ERK (phospho-ERK) ermittelt. Die unphosphorylierte Form von ERK diente als Ladungskontrolle. B, Densitometrische Analyse von sieben unabhängigen Experimenten. Das Diagramm stellt die relative Induktion von p-ERK zu ERK im Vergleich zu unstimulierten Zellen dar. Die Säulen zeigen Mittelwert ±Standardfehler; *p <0,05 im Vergleich zu C-Peptid-stimulierten Zellen; n=7.

3.5 Zusammenfassung aller Ergebnisse

a. C-Peptid aktiviert die Src-Kinase in glatten Gefäßmuskelzellen.
b. C-Peptid aktiviert die PI3-Kinase in glatten Gefäßmuskelzellen.
c. C-Peptid aktiviert die MAP-Kinase ERK1/2 in glatten Gefäßmuskelzellen.
d. C-Peptid aktiviert den MAP-Kinase Signalweg in glatten Gefäßmuskelzellen über die Src- und die PI3-Kinase.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit analysiert den Signalweg, den C-Peptid, ein Proinsulin-Spaltprodukt, bei der Induktion der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen aktiviert. Die Ergebnisse zeigen, dass dieser Signalweg *in-vitro* durch die Stimulation der MAP-Kinase ERK1/2 charakterisiert ist, welcher eine Aktivierung der Src- sowie der PI3-Kinase vorausgeht.

Diese Daten legen nahe, auf welche Weise C-Peptid die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowohl bei der Atherogenese als auch im Rahmen der Restenose nach Koronarintervention bei diabetischen Typ 2 Patienten beeinflussen könnte.

4.1 C-Peptid

Trotz einiger Berichte aus den 70er Jahren, laut deren Aussage C-Peptid einen Einfluss auf die Insulin- und Glukagon-Ausschüttung in der Bauchspeicheldrüse der Ratte nehme, wurde dem „connecting peptide“ seit der Entdeckung der Insulinbiosynthese im Jahre 1967 lediglich eine Beteiligung an diesem Prozess zugesprochen; darüber hinaus galt es als biologisch inerte Substanz (43,61,77,79).
Neuere Arbeiten der vergangenen zehn Jahre demonstrierten jedoch, dass C-Peptid zur Initiierung intrazellulärer Prozesse in verschiedenen Zelltypen befähigt ist.
So konnte sowohl in proximalen Tubuluszellen der Niere als auch in Pancreaszellen und Erythrozyten eine Aktivierung der Na-K-ATPase durch C-Peptid belegt werden (24,61,78). Außerdem konnte dargestellt werden, dass C-Peptid in Endothelzellen eine Steigerung der NO-Sekretion bewirkt und die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) in 3T3 Fibroblasten stimuliert (44,50). Schließlich übt C-Peptid auch einen Einfluss auf inflammatorische Zellen, wie Monozyten und CD4-positive Lymphozyten

aus, indem es deren Migration in frühe atherosklerotische Läsionen induziert (58,80).
Die Erkenntnisse darüber, welche Wirkung C-Peptid auf Myozyten ausübt, konzentrierten sich bislang auf den Bereich der Skelettmuskulatur (30,38,85,86).
Die in der aktuellen Arbeit vorgestellten Daten erweitern das Wissen um die zellulären Effekte des C-Peptids, indem dessen proliferative Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen und die damit verbundene Aktivierung intrazellulärer Signalmoleküle aufgezeigt werden konnte.

Die vorliegenden Experimente ergaben einen maximalen Stimulationseffekt bei einer C-Peptid-Konzentration von 0,5 nmol/l. Dieser Wert liegt an der unteren Grenze der physiologischen humanen C-Peptid-Serumkonzentrationen, welche sich im Bereich von 0,5 - 1,5 nmol/l bewegen (79). Ratten weisen jedoch insgesamt geringere C-Peptid-Serumspiegel auf (0,1 - 0,5 nmol/l), wodurch sich oben genannter Maximaleffekt bei solch niedrigen Konzentrationen erklären lässt (81).

Der Aktivierungseffekt, welcher für die jeweiligen Signalmoleküle nach der Stimulation mit C-Peptid erzielt wurde, liegt bei einer 2- bis 3,5-fachen Induktion. Dies entspricht der proliferativen Wirkung von PDGF, einem bekannten Wachstumsfaktor, welcher die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen anregt.

Eine frühere Studie von Kobayashi et al. zeigte einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation der RASMCs nach dreitägiger Stimulation mit humanem C-Peptid (46).
Die Arbeit unterscheidet sich in folgenden Punkten von den vorliegenden Analysen. Zum einen stimulierten Kobayashi und seine Kollegen glatte Ratten-Gefäßmuskelzellen mit humanem C-Peptid, wohingegen unser Vorgehen nicht von einem C-Peptid-Gebrauch zwischen verschiedenen Arten gekennzeichnet war. Dies stellt insofern eine entscheidende

Divergenz dar, als die C-Peptid-Struktur verschiedener Arten Unterschiede aufweist (61) und C-Peptid artspezifisch agiert, wie in Beobachtungen mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie gezeigt werden konnte. So schlug eine Bindung von Ratten-C-Peptid an humane Zellen unter physiologischen Konzentrationen fehl (79).
Zum anderen fanden in der Studie von Kobayashi et al. mit bis zu 100 nmol/l sehr hohe C-Peptid-Konzentrationen Verwendung, sodass die jeweiligen Versuchsbedingungen in wichtigen Aspekten voneinander abweichen.

4.2 Src-Kinase

Die vorgestellten Daten legen dar, dass C-Peptid im Rahmen der VSMC-Stimulation eine Aktivierung der Src-Kinase induziert, wodurch es via PI3-Kinase zu einer Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 kommt.

Arbeiten, welche die Proliferationsinduktion glatter Gefäßmuskelzellen analysierten, zeigten, dass die Src-Kinase eine Rolle sowohl in der durch LDL als auch durch Bradykinin und Angiotensin II vermittelten Proliferation der RASMCs spielt (6,12,82). In der Studie von Yang et al. führte die Inkubation der VSMCs mit Bradykinin zu einer Phosphorylierung von Src mit einer maximalen Induktion innerhalb der ersten Minute. Diese Resultate stimmen mit dem von uns erzielten Phosphorylierungseffekt durch C-Peptid überein.

Frühere Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe demonstrierten ferner, dass eine Vorbehandlung der RASMCs mit PP2, einem spezifischen Inhibitor der Src-Kinase, die C-Peptid-induzierte Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen hemmt (81).

Die aktuellen Daten belegen somit, dass die Aktivierung der Src-Kinase auch in der C-Peptid-vermittelten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen von Bedeutung ist.

4.3 PI3-Kinase

In unseren Experimenten konnte die Aktivierung der PI3-Kinase durch C-Peptid mittels ihres direkten downstream-Produktes p-AKT als weiterer wichtiger Signalschritt in der C-Peptid-vermittelten Proliferation der RASMCs nachgewiesen werden.
Eine Hemmung der PI3-Kinase mit dem spezifischen Inhibitor LY294002 hatte eine Minderung der C-Peptid-induzierten Phosphorylierung von AKT zur Folge, wodurch obige Aussage erhärtet wird.

Begleitend zu oben genanntem Nachweis der PI3-Kinase-Aktivität wurde in unserer Arbeitsgruppe ein PI3-Kinase-Aktivitäts-Assay durchgeführt, welcher die direkte Aktivierung dieses Signalmoleküls durch C-Peptid bestätigen konnte (81).

In-vitro und *in-vivo* Untersuchungen an glatten Gefäßmuskelzellen ergaben, dass der PI3-Kinase-Signalweg von essenzieller Bedeutung für die Progression des Zellzyklus dieser Zellen ist, indem er die Translation regulatorischer Proteine fördert, welche den Zellzyklus positiv beeinflussen (7).

Die Aktivierung der PI3-Kinase durch C-Peptid konnte bereits in verschiedenen Zelltypen eruiert werden, wie mehrere aktuelle Studien belegen. So erfolgte eine Stimulation der PI3-Kinase durch das Proinsulin-Spaltprodukt sowohl in „swiss 3T3“ Fibroblasten als auch in inflammatorischen Zellen wie Monozyten und CD4-positiven Lymphozyten (44,58,80). Gleichermaßen wurde die Aktivierung des PI3-Kinase/AKT-

Signalweges als Konsequenz der C-Peptid-Stimulation in humanen und tierischen Tubuluszellen der Niere beobachtet (1,84).

Observationen anderer Arbeitsgruppen zufolge gilt die PI3-Kinase gemeinsam mit ihrem downstream-Partner AKT als Akteur in der Bradykinin-, Angiotensin II- sowie Resistin-vermittelten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (6,9,82).

Schließlich führten frühere Untersuchungen unserer Projektgruppe zu dem Ergebnis, dass eine Vorbehandlung der RASMCs mit LY294002, einem spezifischen Inhibitor der PI3-Kinase, die C-Peptid-vermittelte Proliferation der VSMCs hemmt (81), sodass zusammenfassend postuliert werden kann, dass bei der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen der Atherogenese die C-Peptid-induzierte Aktivierung des PI3-Kinase/AKT-Signalweges eine entscheidende Rolle spielt.

4.4 MAP-Kinase ERK1/2

Als drittes entscheidendes Signalmolekül, welches bei der C-Peptid-vermittelten Proliferation der VSMCs aktiviert wird, konnte in unserer Versuchsreihe die Extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1/2 identifiziert werden.

Es ist von allgemeiner Akzeptanz, dass die MAP-Kinase ERK1/2 grundlegende Prozesse wie die Proliferation, die Differenzierung sowie die Entwicklung von Zellen vermittelt (71).

Analog der zuvor beschriebenen Erkenntnisse in Bezug auf die PI3-Kinase ist die C-Peptid-induzierte Aktivierung von ERK1/2 ein Hergang, der bereits in „swiss 3T3“ Fibroblasten sowie humanen und tierischen Tubuluszellen der Niere nachgewiesen wurde (30,44,83,84). Darüber hinaus spielt die

Aktivierung der MAP-Kinase durch das „connecting peptide“ auch in Skelettmuskelzellen und Kapillarendothelzellen der Lunge eine Rolle, was tierexperimentell belegt werden konnte (30,45).

In einer Studie von Calabro et al. konnte ERK1/2 als wichtiges Signalmolekül in der Resistin-vermittelten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen identifiziert werden (9).
Außerdem zeigten neuere Arbeiten, welche Bradykinin, LDL bzw. Angiotensin II als Induktoren der RASMC-Proliferation ermittelten, dass neben der Src- und der PI3-Kinase auch der ERK1/2-Signalweg maßgeblich an diesem Proliferationsprozess beteiligt ist (6,12,82).

In Zusammenschau mit dem Faktum, dass die Hemmung des MAP-Kinase-Signalweges mit dem Inhibitor PD98059 einen Rückgang der C-Peptid-induzierten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen zum Ergebnis hatte (81), kann abschließend die Aussage getroffen werden, dass dieser Proliferationsprozess die Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 involviert.

4.5 Der intrazelluläre Signalweg bei der durch C-Peptid induzierten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

Die genaue Lokalisation der Src-, PI3- sowie MAP-Kinase ERK1/2 in der Signalkaskade, welche im Rahmen der Proliferationsinduktion der VSMCs durch C-Peptid aktiviert wird, konnte mit Hilfe von Inhibitions-Experimenten ermittelt werden.

Die Inkubation der RASMCs mit PP2, einem Inhibitor der Src-Kinase, resultierte in einer Hemmung der C-Peptid-vermittelten Phosphorylierung von AKT, dem Substrat des aktivierten PI3-Kinase-Signalweges. Dies impliziert, dass die Aktivierung der Src-Kinase bei der C-Peptid-induzierten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen upstream der PI3-Kinase stattfindet.

Diese Beobachtung wurde auch in der Versuchsreihe einer anderen Arbeitsgruppe gemacht, welche sich mit der Bradykinin-induzierten Proliferation der VSMCs beschäftigte. Eine Inhibition der Src-Kinase führte hier zur Aufhebung der Bradykinin-vermittelten Phosphorylierung von AKT (82). Die upstream-Position der Src-Kinase wurde ferner auch im Rahmen der Angiotensin II-induzierten RASMC-Proliferation beschrieben (6).

Die Inhibitions-Experimente der vorliegenden Arbeit ergaben außerdem, dass die Vorbehandlung der RASMCs mit PP2 sowie LY294002, einem Inhibitor der PI3-Kinase, eine Abschwächung der durch C-Peptid induzierten Phosphorylierung von ERK1/2 zur Folge hatte. Dieses Resultat führt zu der Annahme, dass die MAP-Kinase ERK1/2 bei der C-Peptid-vermittelten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen downstream der Src- sowie der PI3-Kinase agiert.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten überein, die sowohl in Bezug auf die Bradykinin- als auch auf die LDL-induzierte Proliferation der VSMCs erhoben wurden. Die Untersuchungen brachten gleichermaßen zum Ausdruck, dass die Hemmung der Src- bzw. der PI3-Kinase eine Phosphorylierungsminderung von ERK1/2 nach sich zieht (12,82).

Zusammenfassend legen die vorgestellten Daten nahe, dass C-Peptid den MAP-Kinase-Signalweg in glatten Gefäßmuskelzellen über die Src- und die PI3-Kinase aktiviert und mittels dieser Signalkaskade die Proliferation der VSMCs induziert.

Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass C-Peptid seine intrazellulären Signalprozesse über die Bindung an einen bis dato nicht identifizierten Oberflächenrezeptor vermittelt (67). Diese Stimulation war in renalen Tubuluszellen, Fibroblasten, Endothelzellen sowie in inflammatorischen Zellen, wie Monozyten und CD4-positiven Lymphozyten durch Pertussistoxin inhibierbar (44,58,67,80,84), welches die Funktion von G-

Protein-gekoppelten Rezeptoren modifiziert. Diese Befunde lassen eine Pertussistoxin-sensitive, G-Protein-abhängige Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch C-Peptid vermuten.
Die Identifizierung dieses Rezeptors und seiner Rolle in der C-Peptid-induzierten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen stellt die Aufgabe zukünftiger Studien dar.

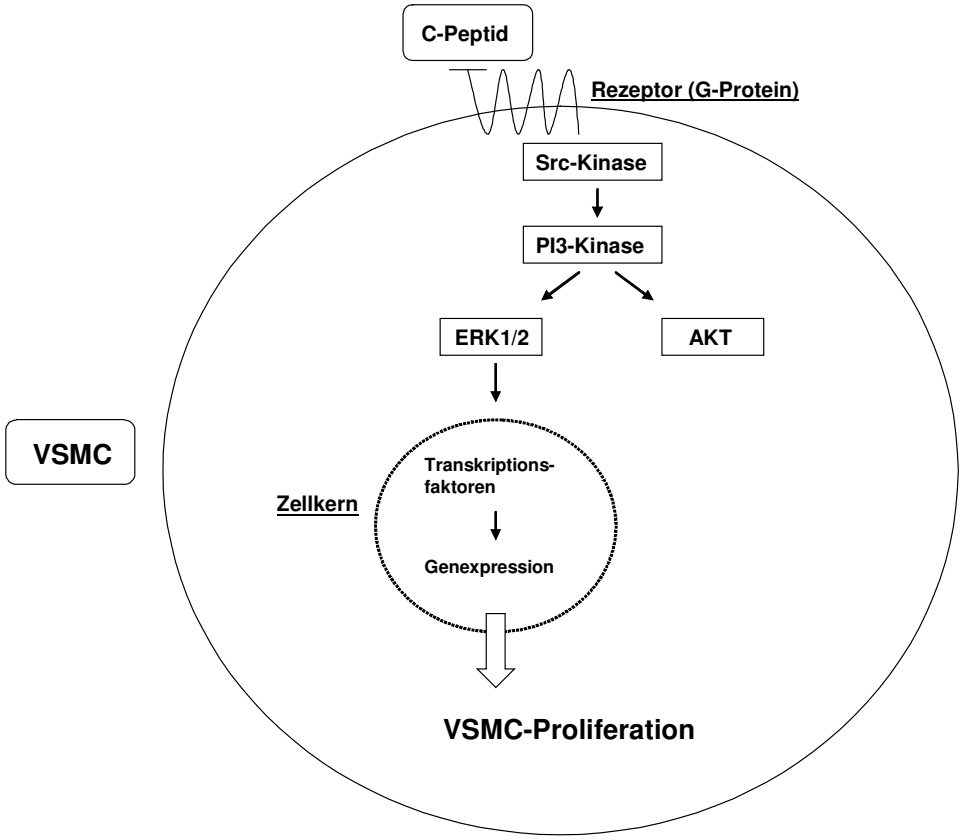


Abbildung 8: Der intrazelluläre Signalweg bei der durch C-Peptid vermittelten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs).
C-Peptid bindet an einen Oberflächenrezeptor und aktiviert den ERK1/2-Signalweg (Extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1/2) downstream der Src-Kinase (Sarkom-Kinase) sowie der PI3-Kinase (Phosphatidylinositol 3-Kinase). Mittels dieser Signalkaskade induziert C-Peptid *in-vitro* die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen.

4.6 Pathophysiologische Relevanz

Patienten mit einer Insulinresistenz und frühem Diabetes mellitus Typ 2 unterliegen einem deutlich erhöhten Risiko für das Auftreten einer diffusen und akzelerierten Atherosklerose und weisen gleichzeitig erhöhte Spiegel von C-Peptid im Blut auf. Hinsichtlich der Atherogenese zeichnet sich diese Patientengruppe durch charakteristische pathophysiologische Merkmale aus, wobei die erhöhte proliferative Aktivität glatter Gefäßmuskelzellen eine entscheidende Rolle spielt (22,31,40).
Die proliferative Wirkung des C-Peptids auf glatte Gefäßmuskelzellen, die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, könnte einen neuen Mechanismus darstellen um das ausgedehnte und komplexe Atherosklerose-Befallsmuster bei dieser Hochrisikopopulation zu erklären.

Daten anderer Studien, welche dem C-Peptid einen protektiven Einfluss auf die Atherogenese zuschreiben und in diesem Zusammenhang z.B. die Verbesserung der Mikroperfusion im Bereich der Retina und der peripheren Nerven durch das Insulin-Spaltprodukt sowie die C-Peptid-vermittelte Steigerung der endothelialen NO-Sekretion aufzeigen, wurden an Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 erhoben (13,38,79). Derartige anti-atherogene Effekte des C-Peptids konnten an gesunden Individuen nicht beobachtet werden und stehen deshalb nicht in Widerspruch zu unseren hier erhobenen Ergebnissen (38,79).

Die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen spielt nicht nur bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen eine wichtige Rolle; sie stellt darüber hinaus auch einen elementaren pathophysiologischen Mechanismus bei der Restenosebildung nach Koronarintervention dar (19). Die Entstehung der Restenose ist im Sinne einer Reaktion auf die vaskuläre Verletzung im Rahmen der Koronarintervention, insbesondere nach Stent-Einlage, durch eine übermäßige Intimahyperplasie der Koronararterie

gekennzeichnet. Zahlreiche sonographische, histologische, immunhistochemische und tierexperimentelle Studien belegen, dass die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in diesem Zusammenhang neben der Thrombozytenaggregation, der Infiltration von Entzündungszellen und der Freisetzung von Wachstumsfaktoren einen zentralen Stellenwert einnimmt (18,23,41,47).
Dabei werden die VSMCs der Media durch die vermehrt freigesetzten Wachstumsfaktoren und Entzündungszellen zur Proliferation und Emigration in die Intima angeregt. Anschließend kommt es durch Hyperplasie und Hypertrophie der glatten Gefäßmuskelzellen sowie der Produktion extrazellulärer Matrix zur Bildung einer Neo-Intima, was in einer Restenoseformation resultieren kann (3,53).

Patienten mit Insulinresistenz und Typ 2 Diabetiker weisen neben erhöhten C-Peptid-Spiegeln im Blut auch ein erhöhtes Risiko der Restenose nach koronarer Intervention auf, wie zahlreiche Studien belegen. So zeigte beispielsweise eine große Meta-Analyse bei 4800 Patienten, dass die Restenoserate rund 55 Prozent aller Diabetiker betrifft im Gegensatz zu nur 20 Prozent der Nicht-Diabetiker. Anderen Studien zufolge tritt die Restenosebildung bei diabetischen Patienten sogar in bis zu 75 Prozent der Fälle auf (11,20,74).
Eine intravaskuläre sonographische Studie von Kornowski et al. beschrieb die gesteigerte Intimahyperplasie als Hauptursache der erhöhten Restenoserate bei Diabetes mellitus (48).

Die vorgestellten Daten legen nahe, dass neben den bekannten inflammatorischen Mediatoren und Wachstumsfaktoren wie PDGF und IGF-1 (65) C-Peptid durch die Proliferationsinduktion glatter Gefäßmuskelzellen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Intimahyperplasie im Rahmen der Restenoseformation spielen könnte.

Vor dem Hintergrund früherer Studiendaten, welche aufzeigten, dass sich das „connecting peptide“ bei Patienten mit einer Insulinresistenz und frühem Typ 2 Diabetes vermehrt subendothelial ablagert und chemotaktisch auf inflammatorische Zellen wirkt, bringen die vorliegenden Erkenntnisse über seine proliferativen Effekte zum Ausdruck, welchen entscheidenden Einfluss C-Peptid sowohl auf die Atherogenese als auch die Restenosebildung nach Koronarintervention bei dieser Hochrisikopopulation haben könnte.

Die Bewertung der pathophysiologischen Relevanz der C-Peptid-induzierten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen im Hinblick auf die Atherogenese und Restenoseentstehung *in-vivo* stellt eine wichtige Aufgabe zukünftiger tierexperimenteller Studien dar.

5. Zusammenfassung

Die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen nimmt einen zentralen Stellenwert im Rahmen der Atherogenese und der Restenosebildung nach Koronarintervention ein. Patienten mit Insulinresistenz und beginnendem Diabetes mellitus Typ 2 zeigen eine akzelerierte Form der Atherosklerose und unterliegen einem gesteigerten Risiko der Restenose nach Koronarintervention. Diese Patienten weisen hohe Spiegel von C-Peptid im Blut auf. Analysen unserer Arbeitsgruppe zufolge induziert C-Peptid die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen der frühen Atherogenese.
Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von Western Blot Analysen an aus der Ratte isolierten und kultivierten glatten aortalen Muskelzellen die hierfür verantwortlichen Signalwege zu identifizieren.
Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass C-Peptid bei der Proliferationsinduktion glatter Gefäßmuskelzellen *in-vitro* die Src-Kinase (Sarkom-Kinase), die PI3-Kinase (Phosphatidylinositol 3-Kinase) sowie die MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase) ERK1/2 (Extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1/2) in glatten Rattenmuskelzellen aktiviert. Die nachfolgend ermittelte Signalkaskade demonstriert dabei, dass die Aktivierung der Src-Kinase den ersten Schritt in der C-Peptid-vermittelten Signaltransduktion darstellt, dem eine Stimulation der PI3-Kinase und abschließend der MAP-Kinase ERK1/2 folgt.
Die vorgestellten Daten bringen zum Ausdruck, auf welche Weise C-Peptid einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die Atherogenese als auch die Restenoseformation nach koronarer Intervention bei Patienten mit frühem Typ 2 Diabetes haben könnte. Die durch das Insulin-Spaltprodukt induzierte akzelerierte Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen könnte einen neuen Mechanismus darstellen, um das ausgedehnte Atherosklerosebefallsmuster sowie die erhöhte Restenoserate bei dieser Hochrisikogruppe zu erklären. Weiterführende tierexperimentelle Studien müssen zeigen, inwieweit sich diese Hypothese *in-vivo* bestätigt.

6. Literaturverzeichnis

1. Al-Rasheed NM, Meakin F, Royal EL, Lewington AJ, Brown J, Willars GB, Brunskill NJ. Potent activation of multiple signaling pathways by C-peptide in opossum kidney proximal tubular cells. Diabetologia 2004; 47: 987-997

2. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb 1991; 11: 1223–1230

3. Bauriedel G. Pathological mechanisms of restenosis after angioplasty. Cell and molecular biology findings- possible new therapeutic approaches. Fortschr Med 1994; 112: 322-323

4. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and Atherosclerosis-Epidemiology, Pathophysiology and Management. J Am Coll Cardiol 2002; 287: 2570-2581

5. Bjorge JD, Jakymiw A, Fujita DJ. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. Oncogene 2000; 19: 5620-5635

6. Bokemeyer D, Schmitz U, Kramer HJ. Angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells requires an Src-dependent activation of the epidermal growth factor receptor. Kidney Int 2000; 58: 549-558

7. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Seay U, Zhang L, von der Leyen HE, Morris RE, Dzau VJ. Cell cycle protein expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo is regulated through

Phosphatidylinositol 3-Kinase and mammalian target of rapamycin. Arterioscl Throm Vas 2001; 21: 1152-1158

8. Bühling KJ. Grundlagen zur Pathologie des Kreislaufes. In: Bühling KJ, Lepenies J, Witt K (Hrsg.). Allgemeine und spezielle Pathologie. München, Jena: Urban & Schwarzenberg, 2. Auflage, 2000: 101-120

9. Calabro P, Samudio I, Willerson JT, Yeh ETH. Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. Circulation 2004; 110: 3335-3340

10. Cantley LC. The Phosphoinositide 3-Kinase pathway. Science 2002; 296: 1655-1657

11. Carozza JP, Jr., Kuntz RE, Fishmann RF, Baim DS. Restenosis after arterial injury caused by coronary stenting in patients with diabetes mellitus. Ann Intern Med 1993; 118: 344-349

12. Cho HM, Choi SH, Hwang KC, Oh SY, Kim HG, Yoon DH, Choi MA, Lim S, Song H, Jang Y, Kim TW. The Src/PLC/PKC/MEK/ERK signaling pathway is involved in aortic smooth muscle cell proliferation induced by glycated LDL. Mol Cells 2005; 19: 60-66

13. Cotter MA, Cameron NE. C-peptide effects on nerve conduction and blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats: Modulation by nitric oxide synthase inhibition. Diabetes 2002; 50: A184 (Abstract)

14. Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. Science 1992; 258: 478-480

15. Deedwania PC. Diabetes and vascular disease: Common links in the emerging epidemic of coronary artery disease. Am J Cardiol 2003; 91: 68-71

16. Deutsche Diabetes Gesellschaft, 2004: Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus - Evidenzbasierte Leitlinie. http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/EBL_Klassifikation.pdf (Zugriffsdatum: 24.07.2007)

17. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. Br J Pharmacol 2000; 130: 963-974

18. Dussaillant GR, Mintz GS, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Popma JJ, Wong SC, Leon MB. Small stent size and intimal hyperplasia contribute to restenosis: a volumetric intravascular ultrasound analysis. J Am Coll Cardiol 1995; 26: 720-724

19. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. Nat Med 2002; 8: 1249-1256

20. Elezi S, Kastrati A, Pache J, Wehinger A, Hadamitzky M, Dirschinger J, Neumann FJ, Schomig A. Diabetes mellitus and the clinical and angiographic outcome after coronary stent placement. J Am Coll Cardiol 1998; 32: 1866-1873

21. Espito C, Fasoli G, Plati AR, Bellotti N, Conte MM, Cornacchia F, Foschi A, Mazzullo T, Semarero L, dal Canton A.
Longterm exposure to high glucose up-regulates VCAM-induced

endothelial cell adhesiveness to PBMC. Kidney Int 2001; 59: 1842-1849

22. Feskens EJ, Kromhout D. Glucose tolerance and the risk of cardiovascular disease: the Zutphen Study. J Clin Epidemiol 1992; 45: 1327-1334

23. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the developement of new preventive therapies. J Am Coll Cardiol 1991; 17: 758-769

24. Forst T, De La Tour DD, Kunt T, Pfützner A, Goitom K, Pohlmann T, Schneider S, Johansson BL, Wahren J, Löbig M, Engelbach M, Beyer J, Vague P. Effects of proinsulin C-peptide on nitric oxide, microvascular blood flow and erythrocyte Na+, K+-ATPase activity in diabetes mellitus type I. Clin Sci 2000; 98: 283-290

25. Forst T, Kunt T, Pfutzner A, Beyer J, Wahren J. New aspects on biological activity of C-peptide in IDDM patients. Exp Clin Endocr Diab 1998a; 106: 270-276

26. Forst T, Kunt T, Pohlmann T, Goitom K, Engelbach M, Beyer J, Pfützner A. Biological activity of C-peptide on the skin microcirculation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Invest 1998b; 101: 2036-2041

27. Franke TF, Yang S, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN. The protein kinase encoded by the Akt Proto-Oncogene is a target of the PDGF-activated Phosphatidylinositol 3-Kinase. Cell 1995; 81: 727-736

28. Franke TF. PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis. Cell 1997; 88: 435-437

29. Gimbrone MA, Topper JN. Biology of the vessel wall: endothelium. In: Chien KR (Hrsg.). Molecular basis of cardiovascular disease. Philadelphia, PA: Saunders, 1999: 331-348

30. Grunberger G, Qiang X, Li Z, Mathews ST, Sbrissa D, Shisheva A, Sima AAF. Molecular basis for the insulinomimetic effects of C-peptide. Diabetologia 2001; 44: 1247-1257

31. Haffner SM, Stern MP, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK. Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals: does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes? J Amer Med Assoc 1990; 263: 2893-2898

32. Hauner H, Köster I, von Ferber L. Prävalenz des Diabetes mellitus in Deutschland 1989-2001. Deut Med Wochenschr 2003; 128: 2632-2638

33. Henderson A. Coronary heart disease: Overview. Lancet 1996; 348: S1-S4

34. Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, Panayotou G, Ruiz-Larrea F, Thompson A, Totty NF. Phosphatidylinositol 3-Kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. Cell 1992; 70: 419-429

35. Ido Y, Vindigni A, Chang K, Stramm L, Chance R, Heath WF, Di Marchi RD, Di Cera E, Williamson JR. Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C- peptide. Science 1997; 277: 563-566

36. Imhof A, Koenig W. Atherosklerose als inflammatorischer Prozess. Cardiovasc 2003; 3: 30-32

37. Jianglin F, Teruo W. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. J Atheroscler Thromb 2003; 10: 63-71

38. Johansson BL, Linde B, Wahren J. Effects of C-peptide on blood flow, capillary diffusion capacity and glucose utilization in the exercising forearm of type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. Diabetologia 1992a; 35: 1151-1158

39. Kamal K, Du W, Mills I, Sumpio BE. Antiproliferative effect of elevated glucose in human microvascular endothelial cells. J Cell Biochem 1998; 71: 491-501

40. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. J Amer Med Assoc 1979; 241: 2035-2038

41. Karas SP, Gravanis MB, Santoian EC, Robinson KA, Anderberg KA, King 3rd SB. Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: an animal model of restenosis. J Am Coll Cardiol 1992; 20: 467-474

42. King IP, Aubert RE, Hermann WH. Global burden of diabetes, 1995-2025. Diabetes Care 1998; 21: 1414-1431

43. Kitabchi A. Proinsulin and C-peptide. Metabolis 1977; 26: 547-587

44. Kitamura T, Kimura K, Jung BD, Makondo K, Okamoto S, Canas X, Sakane N, Yoshida T, Saito M. Proinsulin C-peptide rapidly stimulates mitogen-activated protein kinases in Swiss 3T3 fibroblasts:

requirement of protein kinase C, phosphoinositide 3-kinase and pertussis toxin-sensitive G-protein. Biochem J 2001; 355: 123-129

45. Kitamura T, Kimura K, Jung BD, Makondo K, Sakane N, Yoshida T, Saito M. Proinsulin C-peptide activates cAMP response element-binding proteins through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in mouse lung capillary endothelial cells. Biochem J 2002; 366: 737-744

46. Kobayashi Y, Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Akiyama N, Kamiya H, Watarai A, Nakae M, Oiso Y, Nakamura J. Human proinsulin C-peptide prevents proliferation of rat aortic smooth muscle cells cultured in high-glucose conditions. Diabetologia 2005; 48: 2396-2401

47. Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans. Circulation 1998; 98: 224-233

48. Kornowski R, Mintz GS, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Bucher TA, Hong MK, Popma JJ, Leon MB. Increased restenosis in diabetes mellitus after coronary interventions is due to exaggerated intimal hyperplasia. A serial intravascular ultrasound study. Circulation 1997; 95: 1366-1369

49. Krautzig S, Kurowski V. Koronare Herzkrankheit. In: Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J (Hrsg.). Basislehrbuch Innere Medizin. München, Jena: Urban & Schwarzenberg, 3. Auflage, 2004: 62-75

50. Kunt T, Forst T, Closs E, Wallerath U, Förstermann R, Lehmann R, Pfützner A, Harzer O, Engelback M, Beyer J. Activation of endothelial

nitric oxide synthase (eNOS) by C-peptide. Diabetologia 1998; 41: A176 (Abstract)

51. Kunt T, Schneider S, Pfützner A, Goitum K, Engelbach M, Schauf B, Beyer J, Forst T. The effect of human proinsulin C-peptide on erythrocyte deformability in patients with type 1 diabetes mellitus. Diabetologia 1999; 42: 465-471

52. Kuriyan Lab - Structural biology of cell signaling and DNA replication, University of California, Berkeley, 1997: The Src Kinases. http://jkweb.mcb.berkeley.edu/external/research-in-progress/5-3/signaling/src_kinases.html (Zugriffsdatum: 18.07.2007)

53. Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. Circulation 1992; 86: 47-52

54. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. Circulation 2001; 104: 365-372

55. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation 2002; 105: 1135-1143

56. Libby P. Pathogenese der Atherosklerose. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (Hrsg.). Harrisons Innere Medizin. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH, 16. Auflage, 2005: 1528-1532

57. Libby P. Prävention und Behandlung der Atherosklerose. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (Hrsg.). Harrisons Innere Medizin. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH, 16. Auflage, 2005: 1533-1536

58. Marx N, Walcher D, Raichle C, Aleksic M, Bach H, Grüb M, Hombach V, Libby P, Zieske A, Homma S, Strong J. C-peptide colocalizes with macrophages in early arteriosclerotic lesions of diabetic subjects and induces monocyte chemotaxis in vitro. Arterioscl Throm Vas 2004; 24: 540-545

59. Marx N. Vaskuläre Effekte von Glitazonen. Cardiovasc 2005: 5 (Beilage TR 98)

60. Mulac K. Pathomechanismen der Atherosklerose bei Diabetes mellitus. Journal für Kardiologie 2005; 12: 9-14

61. Ohtomo Y, Bergmann T, Johansson BL, Jornvall H, Wahren J. Differential effects of proinsulin C-peptide fragments on Na+, K+-ATPase activity of renal tube segments. Diabetologia 1998; 41: 287-291

62. Oyer PE, Cho S, Peterson JD, Steiner DF. Studies on human proinsulin. Isolation and amino acid sequence of the human pancreatic C-peptide. J Biol Chem 1971; 246: 1375-1386

63. Pearson G, Robinson F. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev 2001; 22: 153-183

64. Pinkney JH, Stehouwer CD, Coppack SW, Yudkin JS. Endothelial dysfunction: cause of the insulin resistance syndrome. Diabetes 1997; 46 (Suppl 2): S9-S13

65. Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. Brit Heart J 1993a; 69: 30-37

66. Raines EW, Ross R. Vascular effects of cytokines and growth-regulatory molecules. In: Gearing AJH, Rossio JL, Oppenheim JJ (Hrsg.). The clinical applications of cytokines: role in pathogenesis, diagnosis and therapy. Oxford: Oxford University Press, 1993b: 275-282

67. Rigler R, Pramanik A, Jonasson B, Kratz G, Jansson OT, Nygren P, Stahl S, Ekberg K, Johansson B, Uhlen S, Uhlen M, Jornvall H, Wahren J. Specific binding of proinsuline C-peptide to human cell membranes. P Natl Acad Sci USA 1999; 96: 13318-13323

68. Rösen P. Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose. Journal für Kardiologie 2002; 9: 556-562

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

70. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340: 115-126

71. Seger G, Krebs E. The MAPK signaling cascade. Faseb J 1995; 9: 726-735

72. Sixt S, Schulter G, Niebauer J. Diabetes mellitus Typ 2 und koronare Herzkrankheit. Deut Med Wochenschr 2004; 129: 1385-1389

73. Statistisches Bundesamt Deutschland, 2006: Todesursache Herzinfarkt- Pressemitteilung Nr. 395. http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2006/09/PD06__395__232.psml (Zugriffsdatum: 12.07.2007)

74. Stein B, Weintraub WS, Gebhart SSP, Cohen-Bernstein CL, Grosswald R, Libermann HA, Douglas JS, Morris DC, King SB III. Influence of diabetes mellitus on early and late outcome after percutaneous transmural coronary angioplasty. Circulation 1995; 91: 979-989

75. Steiner DF, Cunningham D, Spigelman L, Aten B. Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. Science 1967; 157: 697-700

76. Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. Annu Rev Cell Dev Bi 1997; 13: 513-609

77. Toyota T, Abe K, Kudo M. Inhibitory action of rat insulin and synthetic rat C-peptide on insulin secretion in the perfused rat pancreas. Acta Diabetol Lat 1977; 14: 250-256

78. Wahren J, Owada S, Johansson B-L, Berggren P-O, Bertorello A. C-peptide stimulates ß-cell Na+K+ATPase activity: a negative feedback mechanism on insulin secretion. Diabetologia 1996; 39: A71 (Abstract)

79. Wahren J, Ekberg K, Johansson J, Henriksson M, Pramanik A, Johansson B, Rigler R, Jornvall H. Role of C-peptide in human physiology. Am J Physiol Endoc M 2000; 278: E759-E768

80. Walcher D, Aleksic M, Jerg V, Hombach V, Zieske A, Homma S, Strong J, Marx N. C-peptide induces chemotaxis of human CD4-positive cells- involvement of pertussis toxin-sensitive G-proteins and PI3-kinase. Diabetes 2004; 53: 1664-1670

81. Walcher D, Babiak C, Poletek P, Rosenkranz S, Bach H, Betz S, Durst R, Grüb M, Hombach V, Strong J, Marx N. C-Peptide induces vascular smooth muscle cell proliferation: Involvement of Src-Kinase, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2. Circ Res 2006; 99: 1181-1187

82. Yang CM, Lin MI, Hsieh HL, Sun CC, Ma YH, Hsiao LD. Bradykinin-induced p42/p44 MAPK phosphorylation and cell proliferation via Src, EGF receptors, and PI3-K/Akt in vascular smooth muscle cells. J Cell Physiol 2005; 203: 538-546

83. Zhong Z, Kotova O, Davidescu A, Ehrén I, Ekberg K, Jornvall H, Wahren J, Chibalin AV. C-peptide stimulates Na+,K+-ATPase via activation of ERK1/2 MAP kinase in human renal tubular cells. Cell Mol Life Sci 2004; 61: 2782-2790

84. Zhong Z, Davidescu A, Ehrén I, Ekberg K, Jörnvall H, Wahren J, Chibalin AV. C-peptide stimulates ERK1/2 and JNK MAP kinases via activation of protein kinase C in human renal tubular cells. Diabetologia 2005; 48: 187-197

85. Zierath JR, Galuska D, Johansson B-L, Wallberg-Henriksson H. Effect of human C-peptide on glucose transport in in vitro incubated human skeletal muscle. Diabetologia 1991; 34: 899-901

86. Zierath JR, Handberg A, Tally M, Wallberg-Henriksson H. C-peptide stimulates glucose transport in isolated human skeletal muscle independent of insulin receptor and tyrosine kinase activation. Diabetologia 1996; 39: 306-313

7. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Vinzenz Hombach für die Ermöglichung dieser Arbeit.

In besonderem Maße danke ich Herrn Prof. Dr. Nikolaus Marx für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die herausragende Betreuung während der Arbeit im Labor und der Anfertigung der Dissertation. Dank seiner wertvollen Ratschläge, seiner Hilfsbereitschaft sowie der motivierenden Worte habe ich sowohl im Hinblick auf das wissenschaftliche Arbeiten als auch in der klinischen Medizin und im zwischenmenschlichen Bereich sehr viel gelernt.

Herrn Dr. Daniel Walcher möchte ich sehr für seine zahlreichen guten Ideen und Tipps bei der Erstellung der Dissertation, für die Tatsache, dass er jederzeit zu sprechen war, für das Korrekturlesen und damit für eine rundum gute Betreuung danken.

Ganz herzlicher Dank gilt Frau Renate Durst, Frau Helga Bach, Frau Miriam Reuß sowie Frau Susanne Betz für die gute Einarbeitung in die Methodik meiner Arbeit sowie ihre außerordentliche Unterstützung während der Realisierung meiner Experimente.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die stets freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. Jochen Bauer möchte ich für seine unermüdliche Unterstützung, seine Geduld sowie seine aufmunternden Worte danken.