

Susanne Korff

Dr. med.

Charakterisierung der intrazellulären Signaltransduktion bei der Wachstumsfaktor-induzierten Synthese des Plasminogenaktivator-Inhibitors Typ-1 in humanen arteriellen glatten Muskelzellen

Geboren am 08.06.1976 in Heidelberg

Reifeprüfung am 27.06.1995 in Neckarbischofsheim

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1996 bis WS 2001/2002

Physikum am 25.03.1998 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 24.04.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Kardiologie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Th. K. Nordt

Unter den an der Atherogenese beteiligten Wachstumsfaktoren induzieren TGF- β , TNF- α , Thrombin und PDGF die Synthese des Plasminogenaktivator-Inhibitors Typ-1 (PAI-1) in humanen arteriellen glatten Muskelzellen (HASMC). Eine verminderte endogene Fibrinolyse als sekundäre Folge einer erhöhten PAI-1-Aktivität kann zu einer beschleunigten Entwicklung von Arteriosklerose führen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, die zugrundeliegenden Mechanismen der intrazellulären Signaltransduktion zu untersuchen. Dabei wurde die Rolle der zyklischen Mononukleotide cAMP und cGMP, der Proteinkinase C, der Tyrosinkinase und des Transkriptionsfaktors NF- κ B untersucht.

HASMC in Zellkultur wurden mit oben genannten Wachstumsfaktoren und mit mehreren Stoffen, die die intrazellulären Signaltransduktionsmoleküle beeinflussen, inkubiert und die Konzentration des PAI-1-Proteins im Zellüberstand sowie die Expression des PAI-1-Gens bestimmt.

Die Aktivatoren der Adenylatzyklase PGE 1 und Forskolin, das cAMP-Analogon Dibutyryl-cAMP und der Phosphodiesteraseinhibitor IBMX erhöhten die intrazelluläre cAMP-Konzentration und erniedrigten dadurch die basale PAI-1-Expression um bis zu 32, 65, 50 und 26%. Die TGF- β -stimulierte PAI-1-Expression wurde um maximal 30, 87, 40, 48% reduziert. Die Spezifität der Wirkung der einzelnen Stoffe wurde durch eine unveränderte Gesamtproteinsynthese im Zellkulturmedium nachgewiesen. Der gefundene Effekt war unabhängig von der TGF- β -Konzentration (0,1-10 ng/ml), dem eingesetzten Wachstumsfaktor und der Expositionszeit (0 - 48 Stunden).

Die kombinierte Gabe von IBMX und PGE 1 hemmte die PAI-1-Expression unter TGF- β -Stimulation additiv (50% vs. 33 bzw. 29%). Die Veränderungen in der PAI-1-Protein-Konzentration stimmten mit den Veränderungen der Expression des PAI-1-Gens überein, wie durch Bestimmung der Gesamt-mRNA nachgewiesen werden konnte. Dabei führten die cAMP-Agonisten in Anwesenheit von TGF- β zu einer Reduktion der Gesamt-PAI-1-mRNA, ohne das Verhältnis der beiden m-RNA-Formen zu beeinflussen.

Die Erniedrigung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Somatostatin hatte keinen Einfluss auf die PAI-1-Synthese. Auch die Modulation der intrazellulären cGMP-Konzentration mit Hilfe des indirekten Guanylatzyklaseaktivators Natrium-Nitroprussid, des cGMP-Analogons 8-Bromo-cGMP und des Guanylatzyklaseinhibitors ODQ blieb ohne Effekt. Die Inhibition der Proteinkinasen A und G durch H-8 führte ebenfalls zu keiner signifikanten Änderung der basalen und der durch TGF- β stimulierten PAI-1-Sekretion.

Die Inhibitoren der Proteinkinase C Staurosporin, RO-31-8220 und H-7 reduzierten die basale PAI-1-Expression um maximal 36, 72 und 37%. Die TGF- β -stimulierte PAI-1-Expression wurde um maximal 75, 90 und 62% erniedrigt. Auch hier blieb die Gesamtproteinsynthese unbeeinflusst. Die Reduktion der PAI-1-Synthese wurde auf PAI-1-mRNA-Ebene bestätigt. Die Aktivierung der Proteinkinase C durch PMA führte zu einem Anstieg der basalen PAI-1-Sekretion, der jedoch nicht signifikant war. Die TGF- β -stimulierte PAI-1-Proteinsynthese wurde durch PMA nicht beeinflusst, wohingegen die PAI-1-mRNA einen signifikanten Anstieg zeigte. Dies lässt sich wahr-

scheinlich auf eine zusätzliche Regulation der Translation zurückführen, die allerdings noch nicht vollständig geklärt ist.

Die Tyrosinkinaseinhibitoren Tyrphostin 51 und Genistein senkten die basale PAI-1-Sekretion in das konditionierte Medium über 24 Stunden um 73 bzw. 31% und die durch TGF- β gesteigerte PAI-1-Synthese um 70 bzw. 73%.

In Versuchen mit Gel Shift Assays konnte keine Beteiligung von NF- κ B an der PAI-1-Signaltransduktion nachgewiesen werden.

Die in HASMC durch TGF- β stimulierte PAI-1-Expression wird durch cAMP, Proteinkinase C und Tyrosinkinase, nicht jedoch durch cGMP und NF- κ B reguliert. Die durch Thrombin, PDGF und TNF- α vermittelte erhöhte PAI-1-Synthese wird durch cAMP, nicht aber cGMP gesteuert. Die pharmakologische Erhöhung des intrazellulären cAMP sowie die pharmakologische Beeinflussung der Proteinkinase C und der Tyrosinkinase könnten folglich pathologisch erhöhte PAI-1-Spiegel senken und so zur Senkung der Häufigkeit der Arteriosklerose und ihrer Komplikationen beitragen.