

Johanna Barbara Kohlhaas
Dr. med.

Der funktionelle Einfluss von Endothelzellen auf glatte Gefäßmuskelzellen

Fach/Einrichtung: Physiologie

Doktorvater: apl. Prof. Dr. rer. Physiol. Thomas Korff

Für eine physiologische Funktion adulter Gefäße ist die Kommunikation zwischen Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen essentiell. Dabei ist Tonus-Regulation der glatten Muskelzellen direkt von Endothel-vermittelte Parametern abhängig. Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass die Endothelzell-glatte Gefäßmuskelzell-Kommunikation reziprok zur Aufrechterhaltung des ruhenden Phänotyps der jeweiligen Zellen beiträgt. In glatten Gefäßmuskelzellen bedeutet dies die Ausbildung eines kontraktilem Apparates, sowie kaum vorhandene Migration und Proliferation. In pathologischen Situationen wie bei Endothel-Dysfunktion oder der Depletion von Endothel nach Stenting, Ballon-Dilatation oder in venösen Bypass-Grafts vollziehen die glatten Muskelzellen hingegen einen Wechsel hin zu einem synthetisch aktiven Phänotyp mit Neointima-Proliferation bis hin zur Gefäß-Okklusion. Dies zeigt die Relevanz der Phänotyp-Regulierung für glatte Gefäßmuskelzellen durch Endothelzellen im klinischen Alltag. Da Abseits der Ausprägung des kontraktilem Apparates wenig über den genauen Einfluss bekannt ist, den Endothelzellen auf glatte Gefäßmuskelzellen haben, sollten in dieser Arbeit die intrazellulären Veränderungen in glatten Gefäßmuskelzellen in An- oder Abwesenheit von Endothelzellen genauer untersucht werden.

Zur Untersuchung des Einflusses von Endothelzellen auf glatte Gefäßmuskelzellen wurde eine dreidimensionale Sphäroid-Kokultur gewählt. Dazu wurden *human umbilical artery smooth muscle cells* (HUASMCs) und *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) in *hanging drops* kultiviert. Ohne die Verwendung von künstlichen Matrices ordnen sich die Zellen dabei spontan zu sphäroidalen Aggregaten, deren Kern von mehreren Schichten übereinanderliegender HUAMCs gebildet wird, die von einer einzelnen Schicht HUVECs umhüllt werden. Die Sphäroide stellen somit eine Art invertiertes Modell der Arterienwand dar. Durch diese organotypische, möglichst physiologisch gestaltete Anordnung der Zellen erlangen Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen einen ruhenden, nicht-proliferativen Phänotyp. Im Vergleich zu reinen glatte Gefäßmuskelzell-Sphäroiden sollte so der additive Einfluss der Bedeckung durch Endothelzellen untersucht werden.

In diesem Setting zeigte sich in einer *Microarray*-basierten Transkriptom-Analyse die verminderte Expression vieler mit metabolischen Stoffwechselwegen assoziierten Gensets. Dies deutet auf eine übergeordnete Kontrolle des glatten Gefäßmuskelzell-Metabolismus durch Endothelzellen hin. Im speziellen waren Sets, die mit der Cholesterol-Biosynthese assoziiert waren, besonders stark reguliert. Im dreidimensionalen Sphäroid, nicht jedoch in zweidimensionalen Kokulturmodellen konnte die Relevanz dieser Regulation auf Transkriptionsebene mittels Polymerase-Kettenreaktion, und mittels Kapillarelektrophorese auf Proteinebene bestätigt werden. Funktionell war der Cholesterolgehalt von glatten Gefäßmuskelzellen in Kokultur-Sphäroiden mit Endothelzellen erniedrigt. Die Regulation der Cholesterol-Biosynthese drückte sich auf Proteinebene durch eine signifikante Verminderung des Enzyms 24-Dehydrocholesterol-Reduktase (DHCR24) aus. Die Inhibition von DHCR24 in aktivierten HUASMCs zeigte dessen Notwendigkeit für die Proliferation, Oberflächenhaftung und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen.

Es konnte gezeigt werden, dass das Prostacyclin-Analogon Iloprost in reinen vaskulären glatten Muskelzell-Sphäroiden die *DHCR24*-Expression vermindert, während der Cyclooxygenase-Inhibitor Diclofenac die Expression in Kokultur-Sphäroiden wieder steigern konnte. Prostacyclin ist also möglicherweise an der Endothelzell-vermittelten Regulation der Cholesterol-Biosynthese in glatten Gefäßmuskelzellen beteiligt. Zudem zeigten Analysen des intrazellulären Proteinkinase-Phosphorylierungsmusters der glatten Gefäßmuskelzellen in Kokultur-Sphäroiden die verminderte Aktivität verschiedener mit Migration und Proliferation assoziierter Signalwege. Dabei waren die mitogenaktivierten Proteinkinasen JNK und ERK, der Akt-Signalweg und Src-Familie-Kinasen betroffen. Dies weist darauf hin, dass Endothelzellen den Ruhezustand von glatten Gefäßmuskelzellen unterstützen, indem die Proteinkinase-Aktivität heruntergefahren wird. Diese Proteinkinase-abhängigen Signalwege könnten sowohl die Regulation von *DHCR24* durch Prostacyclin vermitteln, als auch die Hemmung von Proliferation und Migration bei einer verminderten *DHCR24*-Menge.

In dieser Arbeit konnte erstmalig ein grundlegender Einfluss von Endothelzellen auf den glatte Gefäßmuskelzell-Metabolismus nachgewiesen werden. Bezüglich des genauen Mechanismus dieser Regulation bleiben noch Fragen offen, jedoch könnten vom Endothel sezernierte Prostaglandine eine Rolle spielen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch endotheliale Regulation die Aktivität der glattmuskulären *DHCR24* heruntergefahren wird. Klinisch könnte die hier gezeigte Relevanz von *DHCR24* für Migration und Proliferation genutzt werden, um durch Endothel-Verletzung im Rahmen von Stent-Implantationen hervorgerufene Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und damit verbundene Restenose zu unterbinden. Dies könnte durch *Drug Eluting Stents* erreicht werden, die gezielt die übergeordnete metabolische Regulation oder die Cholesterol-Biosynthese über *DHCR24* in glatten Gefäßmuskelzellen ansprechen.