

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Medizinische Klinik IV- Schwerpunkt Nephrologie

PROLIFERATIONSSTUDIEN AN HUMANEN
GLATTEN MUSKELZELLEN ALS MÖGLICHES
MODELL CHRONISCHER ABSTOSSUNGSREAKTIONEN

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin des Fachbereiches Humanmedizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
KLAUS BECKELER
aus Freising

Frankfurt am Main, 1999

Dekan : Prof. Dr. med. G. v. Jagow
Referent : Prof. Dr. med. W. Schöppe
Korreferent 1 : Priv. Doz. Dr. med. W. Kramer

Tag der mündlichen Prüfung : 10.10.2000

PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit wurden bei der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie 1996 in Hamburg vorgestellt und wurden wie folgt publiziert:

1. BECKELER K, LÖW-FRIEDRICH I, MANDT N, SCHOEPPE W, WEISENSEE D. Differential effects of immunosuppressive cyclosporine A and inhibitors of protein kinases on cytokine induced cell proliferation of umbilical cord artery smooth muscle cells - the role of endothelial supernatants on TNF α effects. *Eur J Cell Biol* 69 (Suppl.42): 126, 1996.
2. MANDT N, LÖW-FRIEDRICH I, BECKELER K, SCHOEPPE W, WEISENSEE D. Antiproliferative effects on human endothelial cells are enhanced by TNF α -prestimulated smooth muscle cell supernatants in a model for chronic allograft rejection. *Eur J Cell Biol* 69 (Suppl.42): 137, 1996.
3. WEISENSEE D, MANDT N, BECKELER K, SCHOEPPE W, LÖW-FRIEDRICH I. Evidence for involvement of endothelial cell products in sensitizing human smooth muscle cells for TNF α induced proliferation. A model for chronic allograft rejection. *Eur J Cell Biol* 69 (Suppl.42): 144, 1996.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	
1.1.	Geschichtliche Entwicklung der Nierentransplantation	1
1.2.	Definition akute/chronische Abstoßung	3
1.2.1.	Akute Transplantatabstoßung	3
1.2.2.	Chronische Transplantatabstoßung	4
1.3.	Immunologische Gesichtspunkte	5
1.4.	Pathophysiologie der Abstoßungsreaktion	6
1.5.	Histologische Befunde	8
1.6.	Ziele dieser Arbeit	10
2.	MATERIAL UND METHODEN	
2.1.	Material	11
2.1.1.	Serum	11
2.1.2.	Chemikalien	12
2.1.3.	Geräte	12
2.2.	Methoden	13
2.2.1.	Isolation und Kultivierung humaner glatter Muskelzellen	13
2.2.2.	Zellaktivitätstest	14
2.2.3.	Zellwachstumskurve	15
2.2.3.1.	Bestimmung der Zellzahl	15
2.2.3.2.	Proteinbestimmung	16
2.2.4.	Zellcharakterisierung mittels Immunfluoreszenz	18
2.2.5.	Proliferationsstudien mittels [³ H]-Thymidineinbau	19
2.2.6.	Inkubation mit Stimulantien und Inhibitoren	21
2.2.6.1.	Stimulation mit Zytokinen	21
2.2.6.2.	Hemmstoffe	22
2.2.6.3.	Versuche mit L-NAME (N-nitro-L-Arginine-Methylester)	23

II

2.2.7.	Isolation und Kultivierung humaner Endothelzellen und Versuche mit Endothelzellüberständen	23
3.	ERGEBNISSE	
3.1.	Charakterisierung der Zellkultur	25
3.2.	Bestimmung der Proliferationsrate mittels Thymidineinbau	31
3.2.1.	Stimulationsexperimente	31
3.2.2.	Hemmungsexperimente	33
3.3.	Wirkung von Zytokinen nach Vorinkubation mit Hemmstoffen	36
3.4.	Wirkung von Hemmstoffen nach Vorinkubation mit Zytokinen	40
3.5.	Blockade der NO-Synthase durch L-NAME	46
3.6.	Einfluß von Endothelzellüberständen auf die Proliferation von SMC	51
3.7.	Einfluß von Überständen TNF α -aktivierter Endothelkulturen	53
4.	DISKUSSION	54
4.1.	Stimulationsversuche	55
4.2.	Hemmungsexperimente mit CSA, Genistein und Staurosporin	57
4.3.	Versuche mit L-NAME	59
4.4.	Besteht ein Synergismus zwischen den einzelnen Zytokinen ?	61
4.5.	Welchen Einfluß haben Genistein oder Staurosporin auf die zytokinvermittelte Zellproliferation ?	62
4.6.	Der Einfluß von Endothelzellüberständen mit und ohne TNF α auf die Proliferation glatter Muskelzellen	63
4.7.	Schlußfolgerung	66

5.	ZUSAMMENFASSUNG	67
6.	LITERATURVERZEICHNIS	69
7.	ANHANG	77
8.	ABKÜRZUNGEN	81

DANKSAGUNG

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

LEBENS LAUF

1. EINLEITUNG

1.1. Geschichtliche Entwicklung der Nierentransplantation

Für viele Menschen, die an einer mangelnden Nierenfunktion leiden, bleibt am Ende einer langdauernden medikamentösen Therapie oder Dialysebehandlung nur noch die Organtransplantation, um die Lebensqualität des betreffenden Patienten zu erhalten oder zu verbessern. Die Geschichte der Nierentransplantation beginnt im Jahre 1902. In Wien wurde damals die erste erfolgreiche tierexperimentelle Nierentransplantation von E. Ullmann (1861-1944) vorgenommen (Hamilton 1988). Es folgten weitere Versuche von Allo- und Xenotransplantationen von Nieren, die für eine kurze Zeit sogar etwas Urin produzierten (von Decastello 1902).

Damals wußte man noch nichts über den Temperatureinfluß auf das Transplantat und die immunologischen Abstoßungsreaktionen.

Alexis Carell (1873-1944) zeigte in seinen Veröffentlichungen 1902, daß Allotransplantate im Gegensatz zu Autotransplantaten schon nach kurzer Zeit ihre Funktion einstellten.

Mathieu Jaboulay (1860-1913) führte 1906 die erste Nierentransplantation am Menschen durch. Er verwendete dazu eine Niere von einem Schwein und die Ziege, die bei zwei Patientinnen mit chronischer Niereninsuffizienz jeweils in die Ellenbeuge implantierte. Beide Nieren stellten jedoch schon nach wenigen Stunden ihre Funktion ein (Jaboulay 1906).

Ernst Unger (1875-1938) versuchte 1909 die Niere eines toten Kindes in einen Affen zu transplantieren, und zwar eine Affenniere in den Menschen zu verpflanzen. Beide Male wurde kein Urin produziert und Unger folgerte, daß eine biochemische Barriere zwischen Mensch und Affe bestehen müsse, welche eine Transplantation unmöglich mache.

Im Jahre 1933 wurde von dem ukrainischen Chirurgen Voronoy (1896-1961) die erste menschliche Nierenallotransplantation an einer Patientin, die an einer durch Quecksilbervergiftung verursachten Niereninsuffizienz litt, durchgeführt.

Es wurde zwar etwas Urin produziert, die Patientin verstarb aber zwei Tage später wegen ABO-Blutgruppenunverträglichkeit, Ischämie und fortdauernder Quecksilberschädigung (Voronoy 1936).

In den folgenden Jahren stagnierte das Interesse an der Nierentransplantation, da kaum neue wissenschaftliche Erkenntnisse gewonnen wurden und die Therapie kaum Fortschritte machte. In den 1950er Jahren, in denen mit steigender Gewißheit immunologische Mechanismen als Ursache für die Abstoßungsreaktion angenommen wurden, stieg das Interesse an der Nierentransplantation wieder an. Zum ersten Mal wurden Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und Kortison als Immunsuppressiva eingesetzt, jedoch mit wenig Erfolg (Hume et al. 1955). Erst im Jahre 1954, als im Peter Bent Brigham Hospital in Boston die erste erfolgreiche Nierentransplantation an eineiigen Zwillingen vorgenommen wurde, wurde die Nierentransplantation zur therapeutischen Realität (Merrill et al. 1956; Murray, Merrill & Harrison 1958). Der transplantierte Patient überlebte den Eingriff neun Jahre, bevor er an einem Herzinfarkt verstarb. Joseph E. Murray verwendete dabei die in Paris durch Küss beschriebene Methode der extraperitonealen Transplantation mit Gefäßanastomose an die iliakalen Gefäße. Diese Methode sollte von nun an Standard werden. Murray erhielt für seine Arbeit im Jahre 1990 den Nobelpreis. Es klärten sich auch viele ungelöste Fragen, so zum Beispiel, daß durch die Transplantation die vorbestehende Anämie (mangelnde Erythropoietinbildung) und Urämie komplett verschwinden.

Mit Beginn des neu entwickelten Dialyseverfahrens in den 50er Jahren wuchs die Zahl der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Zwischen 1958 und 1962 wurde die Ganzkörperbestrahlung die einzige Möglichkeit der Immunsuppression. Diese, sowie die Kombination mit einer Knochenmarkstransplantation vom selben Spender zeigten nur wenig Erfolg (Hamilton & Carell 1988; Hamilton 1988). Im Jahre 1961 wurde Azathioprin, ein Imidazolderivat des 6-Mercaptopurin, ein Antimetabolit, entwickelt und erfolgreich am Menschen eingesetzt (Schwartz & Dameshek 1959). Die Kombination mit dem neu entwickelten synthetischen Kortikosteroid Prednisolon zeigte die ersten längerfristigen Erfolge und galt für längere Zeit als Standardimmunsuppressionstherapie.

Jean Dausset beschrieb als erster das Leukozytenantigen „MAC“, welches später als HLA-A₂-Antigen erkannt wurde (Dausset 1980).

Dadurch gelangte man zu der Erkenntnis, daß der Major Histocompatibility Complex (MHC) eine zentrale Rolle bei der Transplantationsimmunbiologie inne hat. Durch die HLA-Typisierung gelang es zunehmend, dem Organempfänger ein passendes Organ zukommen zu lassen. Im Jahre 1972 wurde bei der Firma Sandoz die immunsuppressive Wirkung des Pilzmetaboliten Cyclosporin A entdeckt und dessen Einsatz bei Nierentransplantation erstmals 1978 durch Calne beschrieben (Calne & White 1978). Durch Kombination verschiedener Immunsuppressiva konnte die Toxizität und die Dosierung der einzelnen Immunsuppressiva herabgesetzt werden. Sollte es in Zukunft gelingen, durch Manipulation des Immunsystems das fremde Organ als eigen anzuerkennen, könnten die mit schwerwiegenden Nebenwirkungen behafteten Immunsuppressiva vermieden werden.

1.2. Definition akute/chronische Abstoßung

1.2.1. Akute Transplantatabstoßung

Als akute Transplantatabstoßung wird eine spezifisch gegen Transplantatantigene gerichtete Immunreaktion bezeichnet, die zwischen zwölf Tagen und vier Monaten die Transplantatvitalität bedroht. Dauert die Abstoßungsreaktion nur einige Tage, so ist sie in erster Linie eine zellgebundene Immunreaktion zurückzuführen. Die humoralen Immunreaktionen manifestieren sich vor allem in einer Arteriitis (= *akute Transplantatvaskulopathie*), welche zur Thrombose kortikaler Gefäße mit Rindeninfarkten führt.

1.2.2. Chronische Transplantatabstoßung

Darunter ist ein meist schleichend fortschreitenden Schaden des transplantierten Organs zu entstehen, der sich mehrere Monate bis über ein Jahr nach der Nierentransplantation in Form einer eingeschränkten Nierenfunktion manifestiert.

Meist beruht diese chronische Abstoßungsreaktion vorwiegend auf einer obliterierenden Arteriopathie, bei welcher eine konzentrische, zwiebelschalenartige Intimafibrose im Vordergrund steht (Fig. 1). Diese Gefäßveränderung (= *chronische Transplantatvaskulopathie*) betrifft vor allem die Rindenarterien und führt zur renalen Ischämie mit tubulärer Atrophie, Nephrenzerstörung und interstitieller Nephrose bis hin zur Schrumpfung des Nierenparenchyms.

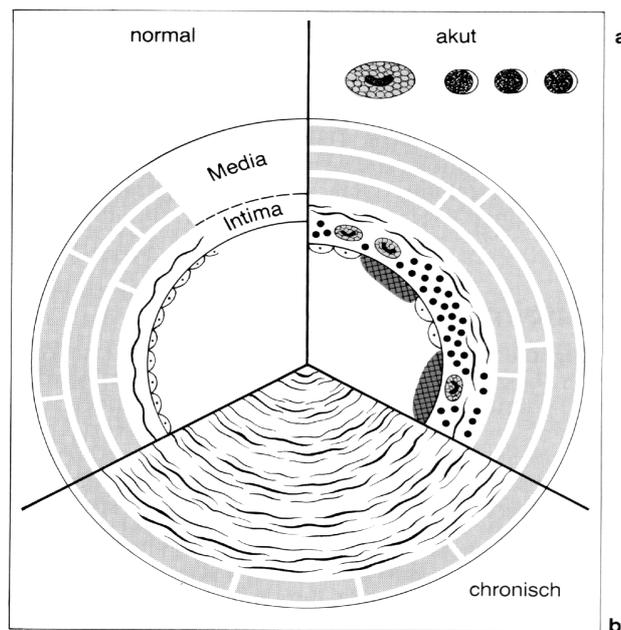


Fig. 1

Transplantatvaskulopathie-Stadien

a Im akuten Stadium finden sich Endotheldefekte mit Fibrinabscheidungen und ein subendotheliales lympho-histiozytäres Infiltrat mit einzelnen Schaumzellen.

b Im chronischen Stadium findet sich eine progressive konzentrisch-obliterierende Gefäßwandfibrose auf Kosten der Intima und der Media (Schaubild aus: Allgemeine und spezielle Pathologie, U.-N. Riede und H.-E. Schaefer, 1993)

1.3. Immunologische Gesichtspunkte

Unter den vielen Faktoren, die den Erfolg einer Nierentransplantation sichern, spielt die genetisch gesteuerte Immunantwort des Empfängers auf die Histokompatibilitätsantigene des Spenders wohl die größte Rolle. Diese stellen den Hauptangriffsort der Abstoßungsreaktion dar. Deshalb nimmt in der heutigen Transplantationsmedizin der HLA-Typisierung eine bevorzugte Stellung zu (Adams, Wyner & Karnowsky 1993).

Die Abstoßungsreaktion wird durch HLA-Antigene ausgelöst. Zellen des Immunsystems werden aktiviert und setzen Zytokine frei. Interleukin-1 zum Beispiel aktiviert T-Helferlymphozyten. Diese setzen weitere Zytokine, unter anderem $\text{TNF}\alpha$, frei. Während der Abstoßungsreaktion erhöhen sich die Spiegel von Interleukin-2- und $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren sowie die Serumspiegel dieser Zytokine selbst (Noronha et al. 1989).

$\text{TNF}\alpha$ aus aktivierten Monozyten bewirkt einen Anstieg der Expression von Zelladhäsionsmolekülen [E-Selektin und intrazelluläre Adhäsionsmoleküle (I-CAM)] auf der Endothelzelloberfläche (Bobik et al. 1990).

Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen halten die Proliferationsbestrebungen und Migration dieser Zelltypen in einem bestimmten Gleichgewicht (Häyry et al. 1986). Dies geschieht durch Substanzen wie Heparansulfat, Proteoglykane und dem Zytokin Transforming-growth-factor- β 1 (Fig. 2; Wrenn et al. 1993).

Es ist auch davon auszugehen, daß Moleküle, die vom Spenderorgan sezerniert werden, in diesen immunologischen Prozess involviert sind. Die persistierenden perivaskulären Infiltrate führen zur Zerstörung des Gefäßendothels, induzieren die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren und aktiver Hormone. Diese Moleküle stimulieren glatte Muskelzellen zur Proliferation (Oemer, Yang & Lüscher 1995).

1.4. Pathophysiologie der Abstoßungsreaktion

Die Hauptmanifestationsformen der chronischen Abstoßung sind anhaltende perivaskuläre Entzündungen und Arteriosklerose des Transplantates. Bei der Entstehung der Transplantationsarteriosklerose laufen mehrere inflammatorische Kaskaden innerhalb der Gefäßwände ab (Carrel 1994).

Bei Entzündungsreaktionen vermittelt das Endothel die Einwanderung von Leukozyten und Lymphozyten in das umliegende Gewebe und reguliert die Kapillarpermeabilität.

Das Endothel wird durch jede Läsion zur Proliferation stimuliert und setzt dabei Moleküle mit Adhäsionsfunktion frei. Durch diese Vorgänge sowie durch die am Endothel „entlangrollenden“ Leukozyten, welche Zytokine freisetzen, erfährt das Endothel eine Oberflächenveränderung (Lerman & Burnett 1992).

Es kommt zur Leukozytenadhäsion. Diese bewirkt eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endothelzelloberfläche (ICAM/E-LAM) und an den Leukozyten (CAM-1/LFA-1). Durch die weitere Veränderung der Zelloberfläche wandern Leukozyten durch die poröse gewordene Endothelzellschicht in das Wundgebiet ein (Robertson & Khairalla 1973). Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten, die wiederum ihrerseits Zytokine sezernieren, gelangen in die Gefäßwand. Dadurch wird die Proliferation der glatten Muskelzellen angeregt.

Um diese Leukozytenaktivierung nach einer erfolgten Transplantation zu unterdrücken, wird vorwiegend das Immunsuppressivum CSA eingesetzt. CSA wirkt zwar stark immunsuppressiv und anti-entzündlich, erhöht aber das Risiko der Transplantatarteriosklerose. Dieser Effekt ist aber nur in den ersten beiden Monaten nach der Transplantation zu beobachten und wird als Endotheliasis bezeichnet (Mennander et al. 1991).

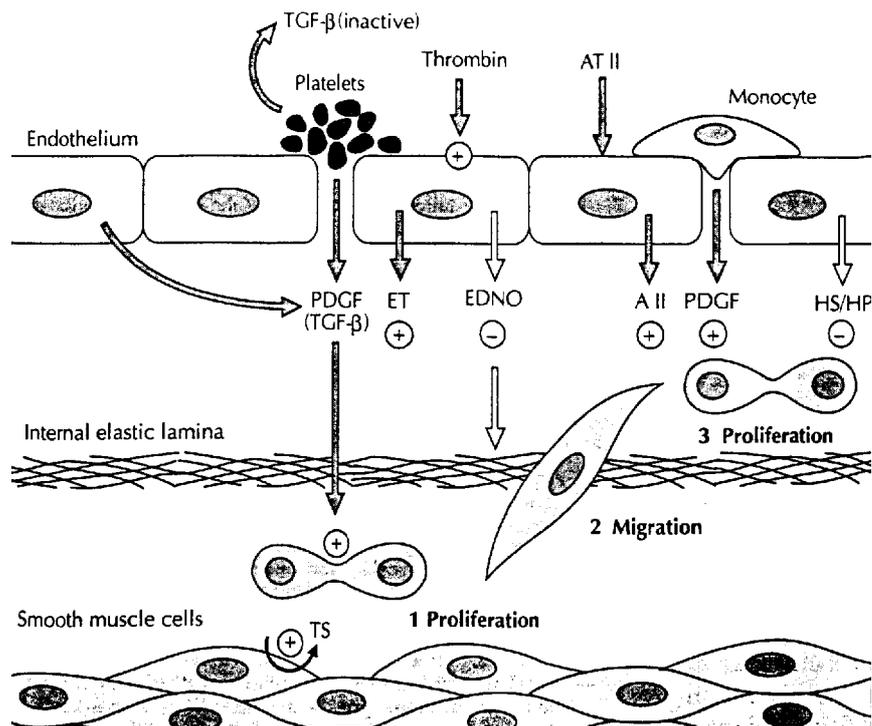


Fig. 2

Regulative Rolle des Endothels und zirkulierender Blutzellen *folie* proliferative Antwort glatter Muskelzellen. Das Endothel sezerniert eine Vielzahl wachstumsinhibierender Faktoren wie Heparin-Sulfat (HS/HP), endothelium-derived nitric oxide (EDNO) und transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). Desgleichen werden Wachstumsfaktoren wie basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet derived growth factor (PDGF), Angiotensin II (AII), Endothelin-1 (ET) von Endothelzellen produziert. Für die normale Funktion der Gefäße dienen diese Substanzen zur Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtszustandes; bei verschiedenen Krankheitsbildern wirken Wachstumsfaktoren eine übermäßige Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen. PGI₂, Prostacyclin; Thr, Thrombin; Ts, Trombospondin. Schaubild aus: Molecular and cellular mechanism of atherosclerosis, Barry S. et al., Curr. Op. Neph. Hyp 1995, 4:82-91.

Bei den Ursachen der Abstoßungsreaktion gibt es vielerlei Mechanismen, die zur Transplantatinsuffizienz und somit zur Abstoßung führen. Die genauen Mechanismen sind bis heute noch nicht ganz klar und es gibt noch keinen befriedigenden therapeutischen Ansatz. Viele Substanzen zur Hemmung der Proliferation in Gegenwart von Zytokinen wurden untersucht, um den intrazellulären Mechanismus der unkontrollierten Proliferation glatter Muskelzellen besser verstehen zu lernen, da Zytokine eine dominante Rolle bei der chronischen Abstoßungsreaktion zu haben scheinen (Bevilacqua et al. 1985).

1.5. Histologische Befunde

Der histologische Endpunkt der chronischen Abstoßung ist die Transplantatarteriosklerose. Sie ist charakterisiert durch fokale Läsionen der Lamina elastica interna, der Proliferation glatter Muskelzellen in der Media, und Einwanderung dieser Zellen in die Intima, die auch dort proliferieren (Mennander et al. 1991).

Verantwortlich hierfür ist eine persistierende perivaskuläre Entzündung, die eine arterielle Intimaverdickung, proliferative und sklerotische Veränderungen in den Glomeruli, interstitielle Fibrosierung und tubuläre Atrophie zur Folge hat (Häyry et al. 1992). Im Gegensatz zur einfachen Arteriosklerose, die diffus und exzentrisch verläuft, ist die gemeinsame Form der Transplantatarteriosklerose konzentrisch und generalisiert. Sie betrifft alle intramuralen Gefäße aller Arteriolen (Demetri, Zerbe & Banner 1989).

Mit einer geringen Variationsbreite läuft die Sklerose folgendermaßen ab:

Durch die Ausdünnung der Gefäßmedia gibt es fokale Brüche der Lamina elastica interna und zentrikontrale generalisierte Intimaverdickung. Durch die daraus resultierende Wandverdickung erfahren die Gefäße eine zunehmende Lumeneinengung (Geraghty et al. ; Vierbuchen 1996). Die Sauerstoffdiffusionsstrecke zur Parenchymzelle wird länger und führt somit zur Zellschädigung.

In der verdickten Intima sind glatte Muskelzellen, inflammatorische T-Zellen und Makrophagen, die Schaumzellen bezeichnet werden, eingewandert (Owens & Grisham 1993). Das Endstadium besteht in der Akkumulation von Thrombozyten im Transplantat. Diese binden an die Endothelzellen, reduzieren den Blutfluß, verursachen mikrovaskuläre Thromben und Nekrosen (van Neck & Bloemers 1992). Es ist anzunehmen, daß die chronische Transplantatabstoßung eine Fortsetzung der akuten Abstoßung darstellt, in welcher die Histoinkompatibilität eine dominante Rolle spielt, nicht zuletzt bei der Induktion der arteriosklerotischen Veränderungen (Häyry et al. 1992).

Es wurden in den vergangenen Jahren viele Experimente mit glatten Muskelzellen verschiedener Spezies (Hund, Hase, Ratte) durchgeführt (Crocer & Salomon 1989). Menschliche Zellen wurden bisher wenig verwendet, weil sie schwierig zu kultivieren sind. In histologischen Schnitten, die aus abgestoßenen Tierorganen gewonnen wurden, zeigten sich keine Unterschiede im Vergleich zu menschlichen Abstoßungstransplantaten. In der akuten Phase der Entzündung ist eine hohe Aktivität lymphoider Zellen nachweisbar.

Die Akutphase geht in die chronische Phase über, in welcher die Aktivität lymphoider Zellen geringer ist. Begleitet wird dieses Phänomen von einem Verlust glatter Muskelzellen in der Media (Medianekrose), partieller Fragmentation der lamina elastica interna, Proliferation der glatten Muskelzellen in der Gefäßintima und Intimasklerose (Mennander et al. 1991).

1.6. Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Substanzen der Proliferation glatter Muskelzellen *in vitro* entgegenwirken, um künftig einen therapeutischen Ansatz zur Unterdrückung des unkontrollierten Wachstums der Gefäßmuskelzellen zu entwickeln.

Zunächst wurden im *in vitro*-Test die glatten Muskelzellen mit solchen Zytokinen inkubiert, für die eine proliferative Wirkung zu erwarten war. Desweiteren wurde untersucht, inwieweit eine zytokin-induzierte Proliferation durch Hemmung intrazellulärer Signalwege zu unterbinden ist.

Dafür wurden verschiedene Substanzen eingesetzt, die eine Enzymhemmung der beiden wichtigsten intrazellulären Signalwege bewirken: Genistein, das die Tyrosinkinase inhibiert und Staurosporin, das die Proteinkinase C inhibiert (Kawahara, Kariya & Fukumoto 1988) sowie CSA, das für die Blockade der IL-2 - Synthese bei T-Zellen bekannt ist, nicht aber dessen direkte Wirkung auf die zytokin-induzierte Proliferation der glatten Muskelzellen.

Den glatten Muskelzellen wurde Endothelin zugesetzt, welches in der Phase der akuten Entzündungsreaktion Endothelzellen sezerniert wird, um die Wechselwirkung von Substanzen endothelialer Herkunft mit glatten Muskelzellen zu untersuchen. Darüber hinaus wurden Mediumüberstände aus Endothelzellkulturen verwendet und deren Auswirkung auf die Proliferationsrate der Muskelzellen beobachtet (Hirata et al. 1989). Um zu überprüfen, ob hemmende Effekte, welche zum Beispiel durch CSA hervorgerufen werden NO-vermittelt sind, wurde der Stickoxidhemmer L-NAME (N-nitro-L-Arginine-Methylester) eingesetzt. Von besonderem Interesse war dabei der Kulturmediumüberstand TNF α präinkubierter Endothelzellen, um damit eine der Entzündungsreaktion ähnliche Situation zu erzielen (Weisensee et al. 1996).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Medien und Reagentien

Dexamethason (0,1 ng/ml)	Sigma, Deisenhofen
FCS	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma, Deisenhofen
MCDB-131	Sigma, Deisenhofen
TNF α (2,5 ng/ml)	Pharma Biotechnologie Hannover
Interleukin-1 β (50 U/ml)	Pharma Biotechnologie Hannover
Interleukin-2 (50 U/ml)	Pharma Biotechnologie Hannover
Interleukin-6 (50 U/ml)	Promocell, Heidelberg
Genistein (1; 10; 15 und 50 μ g/ml)	Sigma, Deisenhofen
Staurosporin (10 und 50 nM)	Sigma, Deisenhofen
Cyclosporin A (1 mg/ml)	Sandoz, Schweiz
L-NAME	Sigma, Deisenhofen
IgG: smooth muscle Aktinantikörper (Maus)	Sigma, Deisenhofen
Anti-mouse IgG: FITC-konjugiert	Sigma, Deisenhofen
Phalloidin: TRITC-konjugiert	Sigma, Deisenhofen
Alpha-Chymotrase (Chymotrypsin)	Pharma Stroschein, Hamburg

2.1.2. Chemikalien

Penicillin (50 U/ml); Streptomycin (50 µg/ml)	BRL Gibco, Eggenstein
PBS	Biochrom, Berlin
Trypsin (0,05%) - EDTA (0,02%) - Lösung	Biochrom, Berlin
[³ H]-Thymidin (1 µCi/ml)	NEN Dupont, Dreieich
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
CuSO ₄	Merck, Darmstadt
K-Na-Tartrat	Merck, Darmstadt
Folinreagenz	Merck, Darmstadt
NaOH (1 N)	Merck, Darmstadt
Methanol-Azeton (1:1)	Merck, Darmstadt
Formalin	Merck, Darmstadt
Szintillatorflüssigkeit Ecoplus Rotiscint	Roth

2.1.3. Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Laminar Air flow	Heraeus, Hanau
Zellwaschgerät: Multiwash 2000	Dynatech Wesbard, England
Whatmanfilter	Maidstone, England
Szintillator β-Counter Tricarb 1500	Packard, Frankfurt
Zentrifuge Minifuge	Heraeus, Hanau
ELISA-Reader (Softmax)	DPC Biermann, Bad Nauheim
Neubauer-Zählkammer	BRAND
Gewebekulturflaschen	Greiner
24-Lochplatten	Greiner
96-Lochplatten	Nunc Intermed, Wiesbaden
Kamera (Canon AE 1)	Canon
Diafilm (Kodachrome 400 ASA Elite)	Kodak

Mikroskop IM 35 (Phasenkontrast, integrierte
 Kamera mit automatischer Belichtungszeit) Zeiss, Jena
 Fluoreszenzmikroskop Axioskop
 (integrierte Kamera mit autom. Belichtungszeit) Zeiss, Oberkochen

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation und Kultivierung humaner glatter Muskelzellen

Die Präparation findet unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur statt. Die zu bearbeitende Nabelschnur liegt dabei in einer mit PBS (ohne Kalzium und Magnesium) gefüllten Petrischale, um diese vor Austrocknung zu schützen. Aus einer humanen Nabelschnur wird ein ca. 2 cm langes Arterienstück freipräpariert und mit dem Skalpell excidiert. Die Außenhäutchen werden sorgfältig abgezupft. Anschließend wird dieses Stück in acht Teile zerlegt. Nach und nach wird jedes einzelne Stückchen kurz in FCS getaucht, um die Zellen vor dem Austrocknen zu bewahren und die Proteinschicht das Auswachsen der Zellen zu erleichtern (Nährstoffe). Das in FCS getränkte Material wird nun mit einem Skalpell in viele kleine Teilchen zerschnitten und das mögliche Gewebe in Petrischälchen (d=60 mm) ausgestrichen. Nach einer Antrocknungszeit von 2-10 Minuten werden die Explantate vorsichtig mit 4 ml Zellkulturmedium überschichtet und im Brutschrank weiterkultiviert.

Nach 1-2 Wochen regelmäßiger Nährstoffzuführung (alle zwei Tage) sind die Zellen ausgewachsen und können in die erste Passage überführt werden (kleine Kulturflasche).

Die Gewebestückchen werden selbst eliminiert, da sie nicht anwachsen und eben den Medienwechseln nach und nach ausgeschwemmt werden.

Die weiteren Zellpassagen werden in große Kulturflaschen überführt und von nun an im Verhältnis 1:3 gesplittet. Die Medienzusammensetzung ist: MCDB-131 mit L-Glutamin, NaCO₃, HEPES 20 mM, 10% FCS, 0,1g/ml Dexamethason, 0,5 P/S (Penicillin 50 U/ml, Streptomycin 50 µg/ml).

2.2.2. Zellaktivitätstest

Der Zellaktivitätstest EZ4U (Biozol, Eching) basiert auf der Umwandlung von schwach gelblichen Tetrazoliumsalzen in stark rot gefärbte Formazan-Derivate durch lebende Zellen.

Dieser Farbumschlag ist abhängig von intakten und funktionellen Mitochondrien und ist proportional zur Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen. Dieser Test wird häufig eingesetzt zur Bestimmung der Zellzahl bzw. der Zellproliferation. In etwas abgewandelter Form in Bezug auf die Meßintervalle diente er bei gleicher Zellzahl zur Registrierung unterschiedlicher mitochondrialer Stoffwechselzustände. Es wurden $\times 10^4$ Zellen/cm² in alle Vertiefungen einer 96-Lochplatte ausgegärt mit Ausnahme der vier äußersten Reihen. Diese äußeren Löcher wurden wegen verstärkter Verdunstung des Mediums nicht mit Zellen, sondern mit PBS beschickt. Folgendes Protokoll wurde angewendet:

- Die Kultivierung der SMC erfolgte 5-6 Tage (100 µl/Vertiefung) lang.
- Danach wurde ein Wechsel von Kultur- auf Testmedium (100 µl) durchgeführt.
- Die Inkubationsdauer betrug 3,5-5 Stunden.
- Die letzten 2,5 Stunden wurde das Gemisch aus Substrat (Tetrazoliumsalz) und einem nicht näher bezeichneten Aktivator (10 µl) in jedes Loch pipettiert und die Kulturplatte im Brutschrank bei 37⁰ Celsius aufbewahrt.
- Nun konnte die Kulturplatte alle 0,5 Stunden im ELISA-Reader (siehe Proteinbestimmung) bei 450 nm gegen eine 620 nm Referenz gemessen werden.

Das Gerät verfügt über eine integrierte Schüttelvorrichtung, so daß sich der gebildete Farbstoff direkt vor jeder Messung gleichmäßig verteilt. Als Leerwert diente Testmedium mit Substrat/Aktivatorgemisch ohne Zellen. Die verwendete Software wurde so eingestellt, daß die Extinktion des mittleren Leerwertes von den Extinktionen der einzelnen Vertiefungen abgezogen wurde. Als Resultat wurden Extinktionswerte (n=6) erhalten, deren Änderung innerhalb eines 1,5 Stundenintervalls prozentual zur Kontrolle berechnet wurde. Parallel dazu wurde der [³H]-Thymidineinbau als etwasmal für die Proliferation angewendet um beide Ergebnisse zu vergleichen bzw. beide Testmethoden miteinander zu korrelieren.

Aufgrund großer Schwankungen der Ergebnisse beim EZ4U-Test, wurden diese Ergebnisse nicht vorgestellt. Da der Thymidineinbau die direkte Methode zur Messung der DNA-Synthese darstellt und zudem eine geringe Streubreite der Meßwerte liefert, wurde von jetzt an dieser Test als Standardverfahren angewendet. Der [³H]-Thymidineinbau wird unter Punkt 2.2.5. noch genauer vorgestellt.

2.2.3. Zellwachstumskurve

2.2.3.1. Bestimmung der Zellzahl

Das Medium (10% FCS) wird zunächst aus der mit einem Zellrasen (Monolayer) bewachsenen Kulturflasche abgegossen und die Flasche zweimal mit PBS (ohne Calcium und Magnesium) gespült, um Mediumreste zu entfernen. Es werden 5 ml Trypsin zugegeben, um die Zellen von der Unterlage zu lösen. Dabei wird die Kulturflasche 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich alle Zellen vom Untergrund gelöst haben, werden 5 ml 10% FCS zugesetzt. Die Zellsuspension wird nun in ein steriles Zentrifugenröhrchen abpipettiert und 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Von der Suspension werden jetzt 10 µl abpipettiert und auf eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer überführt. Unter dem Mikroskop werden die nun als kleine Kügelchen sichtbaren Zellen ausgezählt und nach folgender Formel die Zellzahl pro ml ermittelt:

$$\frac{\text{Zellen (64 Felder)}}{\text{-----}} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Die für die Wachstumskurve benötigten Zellen werden abpipettiert und mit der entsprechenden Menge Medium versetzt, so daß am Ende eine Suspension von 2×10^4 Zellen/ml herauskommt. Je 1 ml dieser Zellsuspension wird nun eine kleine Petrischale überführt ($\varnothing=35\text{mm}$). Sieben dieser Petrischalen werden so vorbereitet und in den Brutschrank gegeben. Alle 24 Stunden wird eine Schale entnommen, unter das Mikroskop gelegt und die Zellen im sichtbaren Flächenabschnitt gezählt. Der Flächenabschnitt wurde hierbei mit einer Videokamera aufgenommen und das Bild auf einen Monitor übertragen. Die Gesamtzellzahl errechnet sich nach der Eichung mit einem Mikrometer wie folgt:

Fläche des Mikroskopausschnittes: $0,196 \text{ mm} \times 0,27 \text{ mm} = 0,0529 \text{ mm}^2$

Fläche der Schale: $9,61 \text{ cm}^2$

Der Multiplikationsfaktor (F) beträgt demnach 18178.

Es zeigt sich, daß die Zellen nach einem Zeitraum von ca. 48 Stunden in ein Stadium verstärkter Proliferation treten.

Dieser Versuch wurde doppelt angesetzt, um gleichzeitig zur Wachstumskurve die Zunahme der Proteinmenge zu bestimmen.

2.2.3.2. Proteinbestimmung

Wie im vorangegangenen Versuch wurden auch hier sieben kleine Petrischalen mit einer Ausgangszellzahl von 2×10^4 Zellen/ml vorbereitet, deren Proteingehalt ermittelt wurde.

Die Bestimmung des zellulären Proteingehalts erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951). Das Nährmedium der mit humanen glatten Muskelzellen bewachsenen Petrischälchen wird abgegossen und das Monolayer für 10 Minuten mit PBS gespült. Nach Absaugen des Puffers wird das Schälchen zur Denaturierung der Proteine mit 1 ml 1 N NaOH überschichtet. Bei Raumtemperatur wurde die proteinreiche Lösung nach 15 Minuten auf dem Rüttler vorsichtig in ein Reaktionsgefäß pipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20° Celsius aufbewahrt.

Photometrische Messung:

Verwendete Lösungen:

- L1: 10 ml 2% (w/v) Na_2CO_3
 100 ml 1% (w/v) CuSO_4
 100 ml 2% (w/v) K-Na-Tartrat
- L2: 50 % Folinreagenz in a.d.
- L3: 1 N NaOH
- L4: 1 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin) in 1 N NaOH

100 μl der Probenlösung (NaOH) werden in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 1 ml L1 gemischt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur werden 100 μl Folinreagenz (L2) dazugegeben, sofort gut in einem Vortex gemischt und für weitere 60 Minuten bei RT inkubiert. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit werden Leerwerte, Standards und Proben, die jeweils doppelt angesetzt wurden, auf 96-Lochplatten überführt (300 μl /Well) und die Extinktion bei 660 nm in einem ELISA-Reader bestimmt. Nach Einstellung der Software auf den verwendeten Verdünnungsfaktor druckt das Programm neben der Eichkurve und den Regressionsparametern gleich den Gesamtproteingehalt der Proben (in mg) aus.

Proteinstandard

Jeweils 100 μl der Standards wurden aus 1 mg/ml BSA (L4) und 1 N NaOH (L3) im Bereich von 20-100 μg angesetzt. Als Leerwert diente 1 N NaOH ohne BSA-Zusatz. Der hieraus resultierende Faktor (F) ergibt sich aus folgender Formel:

$$F = \frac{\Sigma \text{ BSA- Gehalt } (\mu\text{g})}{\Sigma \text{ BSA- Extinktion}}$$

Der Proteingehalt der Probe ergibt sich aus dem Produkt aus Probenextinktion und Standardfaktor F.

2.2.4. Zellcharakterisierung mittels Immunfluoreszenz

In ein Petrischälchen wird ein Deckgläschen gelegt und wie oben beschrieben mit einer Zellsuspension überdeckt. Die Zellen werden für zwei bis drei Tage im Brutschrank kultiviert. In dieser Zeit wächst ein mäßig dichter Zellrasen heran, der für diesen Versuch optimal ist.

Nach dieser Zeit wird das Medium verworfen und das mit Zellen locker bewachsene Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette abgehoben und in ein anderes Schälchen gelegt. Das Deckgläschen wird mit PBS gespült und mit einer Fixierlösung [Methanol-Azeton 1:1 (-20°C Celsius)] überdeckt. Die Einwirkzeit beträgt etwa 10 Minuten bei RT. Danach wird 2 x 5 Minuten mit PBS gespült, um das Fixiermittel zu entfernen. Auf das vorbereitete Gläschen werden jetzt 100 µl des zuvor angesetzten Antikörpers (AK) pipettiert.

Es handelt sich hierbei um ein IgG aus der Maus (Antikörper gegen α -Aktin glatter Muskelzellen), welches spezifisch an α -Aktin der glatten Muskelzellen bindet. Dieser AK wird 1:40 mit der Lösung PBS/BSA 0,2% verdünnt.

Das Gläschen wird nun bei RT etwa 45 Minuten inkubiert. Nach dieser Zeit wird wieder 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Der zweite AK [Anti mouse-IgG; FITC-konjugiert (PBS/BSA 0,2%; 1:10)] wird jetzt auf das Gläschen pipettiert und es bildet sich bei einer Inkubationszeit von wiederum 45 Minuten ein Komplex mit dem ersten Antikörper. Diese Reaktion muß im Dunkeln erfolgen, um ein Ausbleichen des Fluorochromes zu vermeiden. Nachher wird wiederum mit PBS 3 x 5 Minuten bei RT gewaschen.

Auf einen Objektträger wird nun ein Tropfen eines Einbettmediums gebracht, das mit dem AK-Komplex beschichtete Deckgläschen umgedreht und mit der behandelten Zellschicht nach unten auf den Objektträger gelegt.

Bis zur Begutachtung unter dem Mikroskop verbleibt das Präparat in einer dunklen Umgebung oder in einer lichtundurchlässigen Mappe, da sonst der Farbstoff ausbleicht und keine Beobachtungen mehr erfolgen können.

Die Fluoreszenzpräparate wurden im Mikroskop (Axioskop) begutachtet und mit der zum Mikroskop gehörenden Kamera (35 mm) die Fluoreszenz dokumentiert. Ein Versuch der Färbung von Endothelzellen und Fibroblasten mit dem Anti- α -smooth muscle actin-AK erbrachte erwartungsgemäß ein negatives Ergebnis.

Gesamt-Aktinfärbung mit Phalloidin

Zellen werden wie oben beschrieben vorbereitet. Zur Fixation wird 4% Formalin verwendet. 100 μ l Phalloidinlösung (TRITC-gekoppelt) werden aufpipettiert und 20 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Vorbereitungen zum Mikroskopieren wurden oben beschrieben.

Zur mikroskopischen Beurteilung wurde mit grünem Licht angeregt (Anregungsfilter 510-560 nm) und rotes Licht emittiert (Emissionsfilter 590 nm).

2.2.5. Proliferationsstudien mittels [3 H]-Thymidineinbau

Die in einer Zellkulturflasche herangezüchteten Zellen werden aus dem Brutschrank entnommen und das Nährmedium verworfen. Dann wird mit PBS (ohne Kalzium und Magnesium) gespült, um restliches Medium zu entfernen. Die auf dem Flaschenboden haftenden Zellen werden mit 5 ml Trypsinlösung (0,05% Trypsin; 0,02% EDTA in PBS) überschichtet und für ca. 5 Minuten in den Brutschrank verbracht. Nach dieser Zeit haben sich die Zellen vom Boden gelöst und abgekugelt. Es wird nun 10 ml Kulturmedium dazugegeben und die Zellsuspension mit einer Pipette in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in das Nährmedium resuspendiert. Die Zellen werden anschließend wie oben beschrieben ausgezählt und die Suspension soweit verdünnt, daß auf eine 24-Lochplatte pro Loch ca. 1×10^4 Zellen/ml kommen. In jedes Loch wird 0,5 ml pipettiert, so daß je Loch 7500 Zellen verbleiben. Es hat sich als günstig erwiesen, jedes Loch einzeln und randomisiert zu pipettieren. Die Schwankungsbreite der Ergebnisse konnte mit dieser Methode von über 20% auf teilweise unter 10% gesenkt werden.

Die so vorbereiteten Zellen werden über Nacht zur Anheftung gebracht, in 0,5% FCS im Wachstum synchronisiert und am folgenden Tag mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Kultur befindet sich nun in der logarithmischen Wachstumsphase. Am nächsten Tag wird die Platte aus dem Brutschrank entnommen und Zellend werden mit radioaktiv markiertem Thymidin in einer Konzentration $\mu\text{Ci/ml}$ für weitere 24 Stunden inkubiert. In dieser Zeit wird das radioaktiv markierte Thymidin in die DNA der Zellen eingebaut.

Somit kann die Proliferation der mit Zytokinen stimulierten Zellen (siehe unten) mit der einer nichtstimulierten Kontrollgruppe direkt verglichen werden.

Nach Stunden Inkubationszeit wird der Mediumüberstand abpipettiert und als Sondermüll verworfen. Die Zellen werden gewaschen, um das überschüssige und nicht eingebaute Thymidin zu entfernen, trypsiniert ($300 \mu\text{l}$) und die Zellsuspension wird in eine 24-Lochplatte ($300 \mu\text{l/Loch}$) pipettiert. Die 24-Lochplatte mit den auf 24 Löcher verteilten Suspensionen wird in eine Zellwaschvorrichtung gebracht, die die Zellen aufgesogen und in einer Maschine angespannten Glasfiberfilter aufgefangen. Nach dem Waschvorgang ergeben sich aus 24 runde Filterpapierstückchen, welche mit einer Pinzette abgezupft und in vorher vorbereitete Szintillatorkörbchen überführt werden.

Diese Körbchen werden mit einer speziellen Szintillatorflüssigkeit (3 ml) gefüllt und in zu einem Beta-Counter gehörende Halterungen gestellt. Die eingebrachten Filterplättchen lösen sich auf und geben die Zellen frei, die dabei auch zerstört werden. Das in die DNA der Zellen inkorporierte markierte Thymidin verteilt sich nun homogen in der Szintillatorflüssigkeit.

Die Körbchen werden nach Auflösung der Filterplättchen in den Beta-Counter gestellt, einzeln in die Maschine eingefahren und dabei Photonenblitze proportional der β -Aktivität registriert. Ein Meßvorgang dauert dabei 3 Minuten. Die so erhaltenen Ergebnisse (Counts per minute, cpm) werden automatisch auf einem Papierstreifen ausgedruckt und nach Auswertung graphisch zur Darstellung gebracht. Dargestellt werden die Mittelwerte mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm \text{SD}$) aus 3-7 unabhängigen Experimenten mit je einem dreifachen Ansatz.

2.2.6. Inkubation mit Stimulantien und Inhibitoren

2.2.6.1. Stimulation mit Zytokinen

Die Stimulation der Zellen wurde mit folgenden Substanzen untersucht:

Interleukin-1 β (Il-1 β), Interleukin-2 (Il-2), Interleukin-6 (Il-6),

Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Endothelin (Eth).

Folgende Konzentrationen wurden eingesetzt:

- Il-1: 50 U/ml
- Il-2: 50 U/ml
- Il-6: 50 U/ml
- TNF α : 2,5 ng/ml
- Eth: 0,1 μ g/ml.

In allen Fällen wurde gleich verfahren. Nach der Aussaat wurden die Zellen auf 0,5% FCS gesetzt, um sie in die Ruhephase des Zellzyklus zu synchronisieren. Nach 24 Stunden wurde das Medium gegen frisches Medium, welches die zu testenden Zytokine enthält, ausgetauscht. In Vorversuchen wurden die optimalen Konzentrationen der jeweiligen Substanz ermittelt. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium erneut gegen frisches Medium ersetzt, welches nun zusätzlich zu den Testsubstanzen mit [³H]-Thymidin ersetzt war (1 μ Ci/ml). Die Zellernte erfolgte nach weiteren 24 Stunden, indem der radioaktive Überstand verworfen und die Zellen wie vorher beschrieben geerntet wurden.

2.2.6.2. Hemmstoffe

Zur Untersuchung der intrazellulären Wirkmechanismen der stimulierenden Agentien wurden folgende Hemmstoffe eingesetzt;

- Cyclosporin A (CSA)
- Staurosporin
- Genistein
- L-NAME

Das Immunsuppressivum CSA wurde zunächst in Konzentrationen von 0,1 bis 150 µg/ml eingesetzt. In Kombinationsversuchen wurden standardmäßig 10 ng/ml verwendet. Als Blocker des intrazellulären Signalweges wurde Staurosporin, ein Hemmer der Proteinkinase C (PKC) oder Genistein, ein Hemmer der Tyrosinkinase (TK) in den Konzentrationen 10 bis 50 nM (Staurosporin) und 1 bis 10 / 15 / 50 µg/ml (Genistein) eingesetzt.

L-NAME, ein Inhibitor der induzierbaren Stickoxid-Synthase (iNOS) sollte den Aufschluß über die Wechselwirkung der zellulären NO-Synthese mit der zytokin-induzierten Proliferation ebenfalls. Als Standardkonzentration wurde 100 µM verwendet.

Alle verwendeten Hemmstoffe wurden zu Beginn der Versuche (Tag 1) und nochmals bei Thymidinzugabe (Tag 3) appliziert, um einen Abfall des Substanzspiegels durch den Zellstoffwechsel zu kompensieren.

Das gleiche Schema wurde bei der Kombination von Zytokinen mit Hemmstoffen angewendet.

Aussaat	Testsubstanz	Testsubstanz + Thymidin	Zellernte
t0	t1	t2	t3

2.2.6.3. Versuche mit L-NAME

Die Zellen wurden wie oben beschrieben vorbereitet. Diese wurden in 24 Lochplatten ausgesät (ca. $1,7 \times 10^4$ Zellen/ml) und in Medium mit 0,5% FCS für 24 Stunden kultiviert. Um den Effekt des NO-Hemmers auf die Proliferation zu untersuchen, wurden L-NAME und Zytokine einzeln und in Kombination inkubiert. L-NAME wurde in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt. Am nächsten Tag fand ein Mediumwechsel und eine erneute Inkubation mit Zytokinen in der L-NAME statt. Um zu prüfen, ob CSA möglicherweise über den NO-Signalweg die hemmende Wirkung entfaltet, wurde dieses Immunsuppressivum gemeinsam mit L-NAME eingesetzt.

Es folgte die Inkubation mit [3 H]-Thymidin in einer Konzentration von 1μ Ci/ml für weitere 24 Stunden. Die Ernte der Zellen erfolgte wie unter Punkt 2.2.5. beschrieben.

2.2.7. Isolation und Kultivierung humaner Endothelzellen und Versuche mit Endothelüberständen

Endothelzellen wurden aus dem venösen Gefäß einer Nabelschnur isoliert. Die Vene wurde kanüliert und mit PBS (ohne Kalzium/Magnesium) gespült, um Blutzellen zu eliminieren. Das Gefäß wurde nun mit 5 ml (1500 I.E.) Alpha-Chymotrase infundiert und an beiden Enden mit Klemmen abgeklemmt, um den Zellablösungsvorgang einzuleiten. Nach 15 Minuten Einwirkzeit wurde ein Ende des Gefäßes geöffnet und die Chymotrasesuspension in einem sterilen Gefäß gesammelt.

Die Vene wurde durch zwei separate Waschvorgänge mit PBS gespült und die Suspension für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 10 ml Endothelzellwachstumsmedium (MCDB-131) resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneuert, um übriggebliebene rote Blutzellen zu entfernen. Das Zellkulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt. Die Passagen 1-8 wurden für die Versuche verwendet.

Es wurden zwei verschiedenartige Ansätze zur Proliferationsmessung mittels [³H]-Thymidineinbau gewählt.

Zum einen wurden Endothelzellüberstände verwendet, die nicht Zytokinen (TNF α) vorstimuliert waren, zum anderen Überstände, deren Zellen eine Vorstimulation von TNF α erfahren haben. Hierbei wurde wie folgt verfahren:

Die Endothelzellen wurden wie oben beschrieben in eine Zellkulturflasche überführt und dort so lange belassen, bis sich ein subkonfluenten Zellrasen gebildet hatte. Dann wurde das Medium gewechselt, und als neue Medium für zwei Tage auf den Zellen belassen. Im ersten Versuchsansatz wurde das „verbrauchte“, nicht vorstimulierte Medium abpipettiert und daraus 1- bzw. 10% Verdünnungen hergestellt. Im zweiten Versuchsansatz wurde nach dem Mediumwechsel zusätzlich mit 25 ng/ml TNF α stimuliert und wie oben verfahren. Die konditionierten Medien wurden dann zur weiteren Verwendung (maximal zwei Tage) im Kühlschrank aufbewahrt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Charakterisierung der Zellkultur

Zur Bestimmung der optimalen Wachstumsrate, die für den Thymidineinbau am besten geeignet ist, wurde zunächst die Zellzahl und der Proteingehalt der Zellkulturen/Schale im Zeitverlauf untersucht. Die Zellen wurden in 14 Schälchen in einer Dichte von ca. 10^4 Zellen/Schale ausgesät und täglich ein Doppelsatz über den Zeitraum einer Woche zur Bestimmung der Zellzahl (Abb. 1) bzw. des Proteingehaltes (Abb. 2) ausgewertet (siehe Material und Methoden). Die Kulturen wurden für diesen Vorversuch in minimalem Zellkulturmedium (MCDB-131) mit 10% FCS und Antibiotika gehalten. Die Kulturschalen mit den fixierten Zellen wurden per Videomikroskopie auf einen Monitor übertragen und 10 Bildfelder ausgezählt. Die Werte von zwei Schalen für jeden Zeitpunkt wurden gemittelt. Nach einer kurzen Lag-Phase kommen die Zellen in eine Wachstumsphase, die exponentiell verläuft (Abb. 1).

Dieses typische Zellverhalten war die Basis für alle weiteren Messungen der Zellproliferation mit [^3H]-markiertem Thymidin. Bei diesen Versuchen wurde die Proliferationsrate in der Phase des exponentiellen Wachstums, die typischerweise 2-3 Tage nach Aussaat eintritt, bestimmt. Die Proteinbestimmung einzelner Zellkulturschalen zu den gleichen Zeitpunkten wie Abb. 1 konnte das exponentielle Wachstumsverhalten aus den Tests der Zellzahlbestimmungen bestätigen. Hierfür wurden für die Bestimmung nach Lowry je zwei Petrischälchen pro Zeitpunkt (alle 24 Stunden) mit NaOH versetzt, und zur Messung bei -20°C aufbewahrt. Der Anstieg des Proteingehaltes im Verlauf der Zeit (Abb. 2) verläuft in Analogie zur Wachstumsrate der Kulturen in Abb. 1 (Seidel et al. 1988).

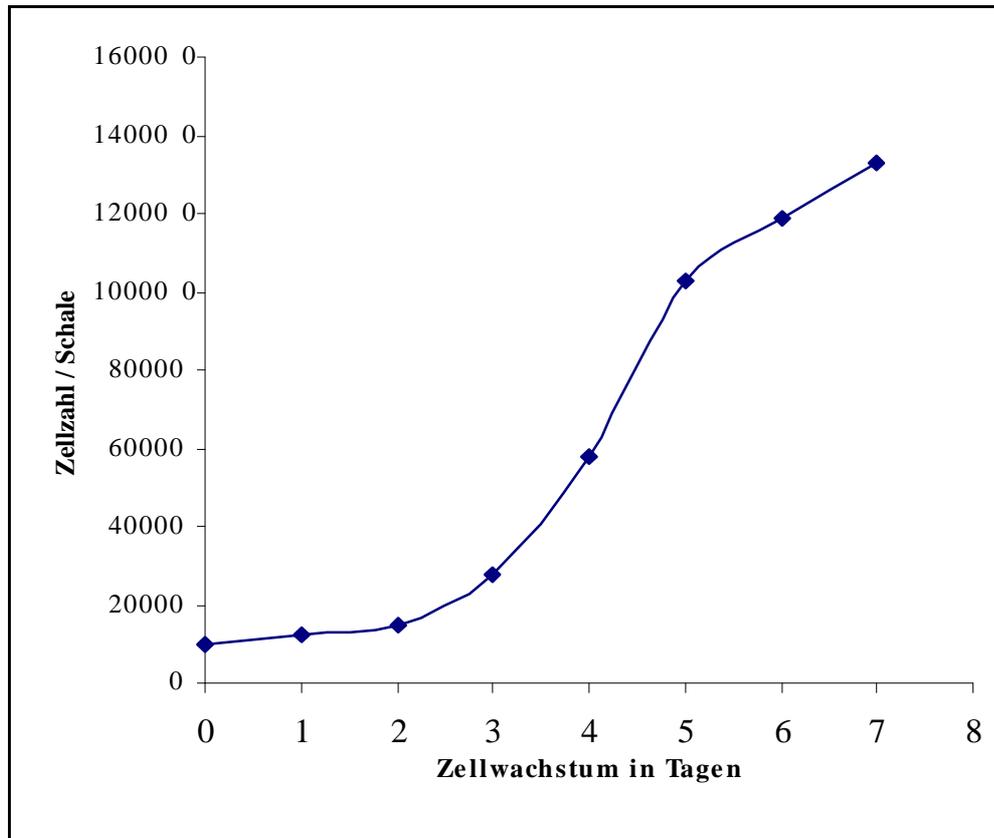


Abb. 1
 Proliferationskurve humaner glatter Muskelzellen im Zeitraum von einer Woche. Nach einer Lag-Phase von zwei Tagen deutlich exponentieller Wachstumsschub.

Die Morphologie der Zellkulturen während der ersten zwei Tage nach Aussaat ist in Abb. 3 dargestellt. Die länglichen Zellen sind flach ausgebreitet und zeigen viele Zellkontakte. Mit erhöhter Zelldichte werden die Interzellularräume geringer und es zeigt sich ein dichtes Zellrasen mit gleichartiger Ausrichtung der Zellen (nicht dargestellt). Zur Charakterisierung des Zelltyps wurden zwei Methoden angewendet: Ein Antikörper gegen α -Aktin, das spezifisch für glatte Muskelzellen ist, färbt in Kombination mit einem Rhodamin-konjugierten Zweitantikörper (TRITC) große und kleine Aktinfilamente rot an (Abb. 4).

Die Aktinfasern ziehen die ganze Zelle, sind für Zellbewegungen mitverantwortlich und stabilisieren ihre Struktur. Zusätzlich kann FITC-markiertes Phalloidin zum Einsatz, welches das gesamte Aktin aktivierter Zellen grün anfärbt (Abb. 1). Auch mit dieser Methode sind die zellulären Aktinfasern deutlich zu erkennen. Die Markierung α -Aktin ist ein eindeutiger Nachweis glatter Muskelzellen, da Endothelzellen wie auch Fibroblasten mit dieser Methode nicht zur positiven Darstellung kommen (Weisensee et al. 1997).

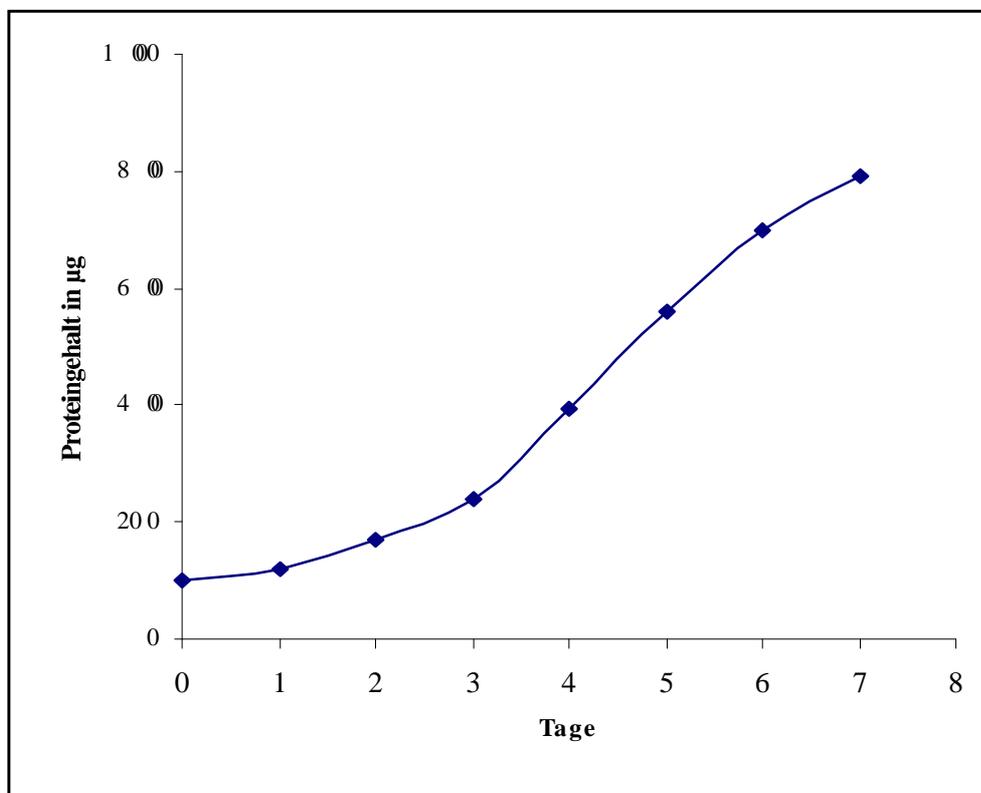


Abb. 2

Exponentiell steigender Proteingehalt/Schale humaner glatter Muskelzellen im Verlauf einer Woche. Paralleler Verlauf zu oben dargestelltem Kurvenverlauf zur Bestimmung der Zellzahl.

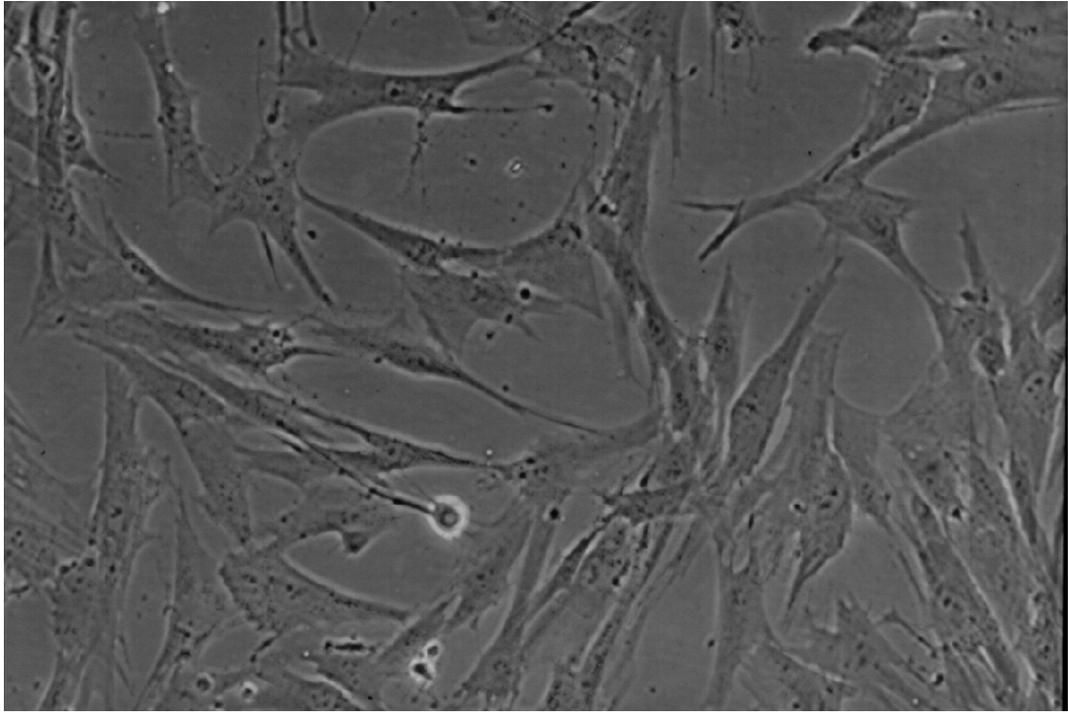


Abb. 3

Typisches Erscheinungsbild subkonfluer humaner glatter Muskelzellen (HSMC) in der dritten Passage. Die Zellen sind 48 Stunden zuvor in einer Petrischale ausgesät worden und weisen viele Zellkontakte sowie eine Mitose im Bildausschnitt auf. Die Zellen sind gut erkennbar. Phasenkontrastaufnahme (Ph 2) in der Gesamtvergrößerung 300fach.

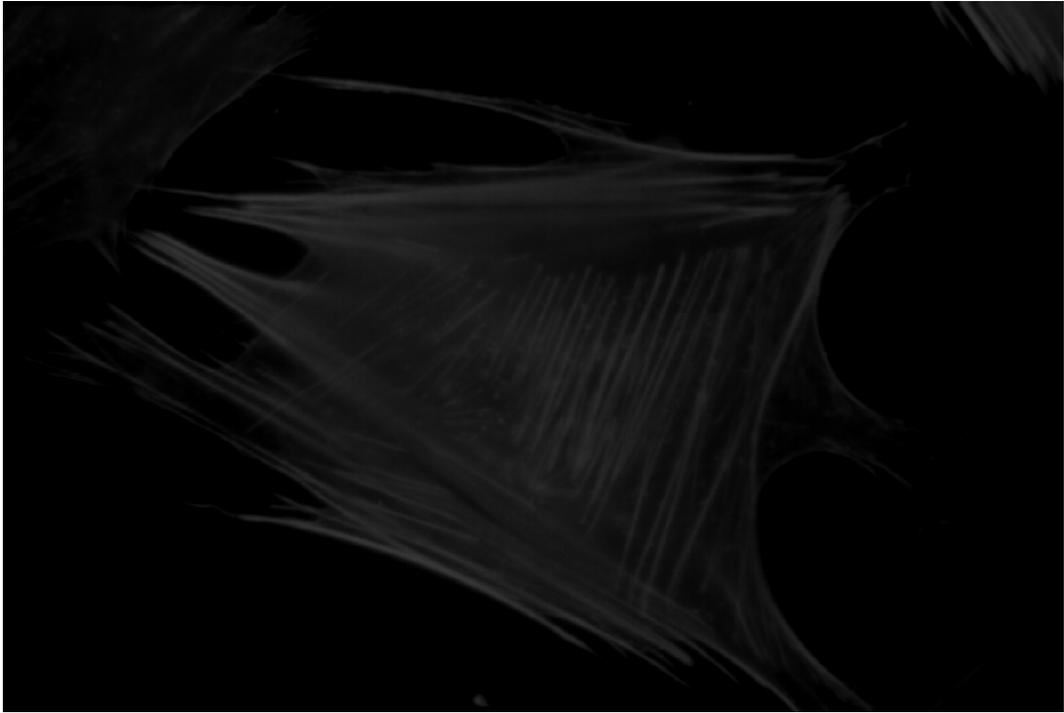


Abb. 4

Markierung der Aktinfasern einer formalinfixierten Kultur mit TRITC-konjugiertem Phalloidin. Gut erkennbar sind riesige Aktinfasern, wie sie bei ausgebreiteten Zellen zu finden sind. Fluoreszenzaufnahme in 1400facher Vergrößerung.

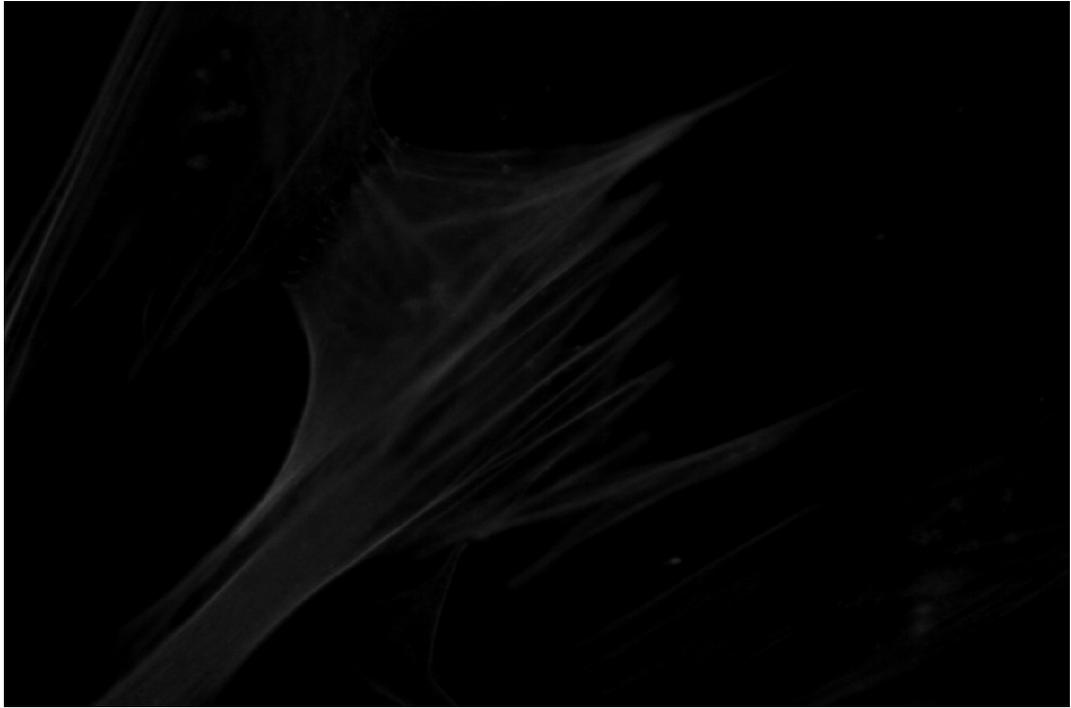


Abb. 5

Immunfluoreszenz zum Nachweis der glatten Muskelzellen. Die Zellen sind auf Deckgläschen gewachsen und wurden mit Methanol/Azeton fixiert. Der verwendete Antikörper bindet spezifisch an das α -Aktin. In glatten Muskelzellen wird sich durch einen FITC-konjugierten zweiten Antikörper detektiert. Die aus α -Aktin bestehenden Fasern sind deutlich erkennbar und dienen als Nachweis für diesen Zelltyp. Fluoreszenzaufnahme in 1400 facher Vergrößerung.

3.2. Bestimmung der Proliferationsrate mittels Thymidineinbau

3.2.1. Stimulationsexperimente

Der Einbau von [³H]-markiertem Thymidin in die zelluläre DNA wird als anerkannte Standardmethode zur Bestimmung der Proliferation kultivierter Zellen herangezogen. Zunächst wurden verschiedene Wachstumsfaktoren eingesetzt, von denen die wachstumsstimulierenden Eigenschaften bekannt sind, um die Methode zu verifizieren. Insbesondere Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-2, Tumornekrosefaktor α (TNF α) sowie Endothelin-1 (Eth) sind für ihre wachstumsfördernden Wirkungen auf glatte Muskelzellen bekannt (Cerami 1992; Chua et al. 1992; Muegge & Durum 1993; Yashushi et al. 1995). Es existieren dabei nur wenige Berichte, die humane Zellen untersucht haben. In einem Standardassay wurden die Kulturen auf „Mangelmedium“ gesetzt, dem nur 0,5% FCS beigefügt wurde. Vierundzwanzig Stunden nach Zugabe der zu testenden Substanzen wurde [³H]-Thymidin bei gleichzeitigem Mediumwechsel zugesetzt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Das in dieser Zeit in die DNA proliferierender Zellen eingebaute Thymidin wird nach der oben beschriebenen Methode nach der Zellernte in einem Beta-Counter nachgewiesen (siehe 2.2.5.).

In dieser Arbeit konnte die stimulierte DNA-Synthese nach Inkubation mit den wichtigsten Zytokinen in dem hier vorgestellten Zellkultursystem aus humanen glatten Muskelzellen gezeigt werden. Die höchsten Stimulationsraten an den untersuchten humanen Zellen wirkten TNF, Eth und IL-1; hier lag der Wert zwischen 25% und 35% gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 6). Interleukin-2 konnte bei gesteigerten Konzentrationen den Thymidineinbau nicht immerhin 30% erhöhen (Abb. 6). Der Einfluß von Interleukin-6 auf das Wachstumsverhalten der glatten Muskelzellen war sehr ambivalent. Durch gelegentliche Steigerungen und Verminderungen des Zellwachstums kam es zu einer übermäßigen Streuung der Ergebnisse, die daher wenig aussagekräftig sind. In anderen Arbeiten wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (Andreesen et al. 1994).

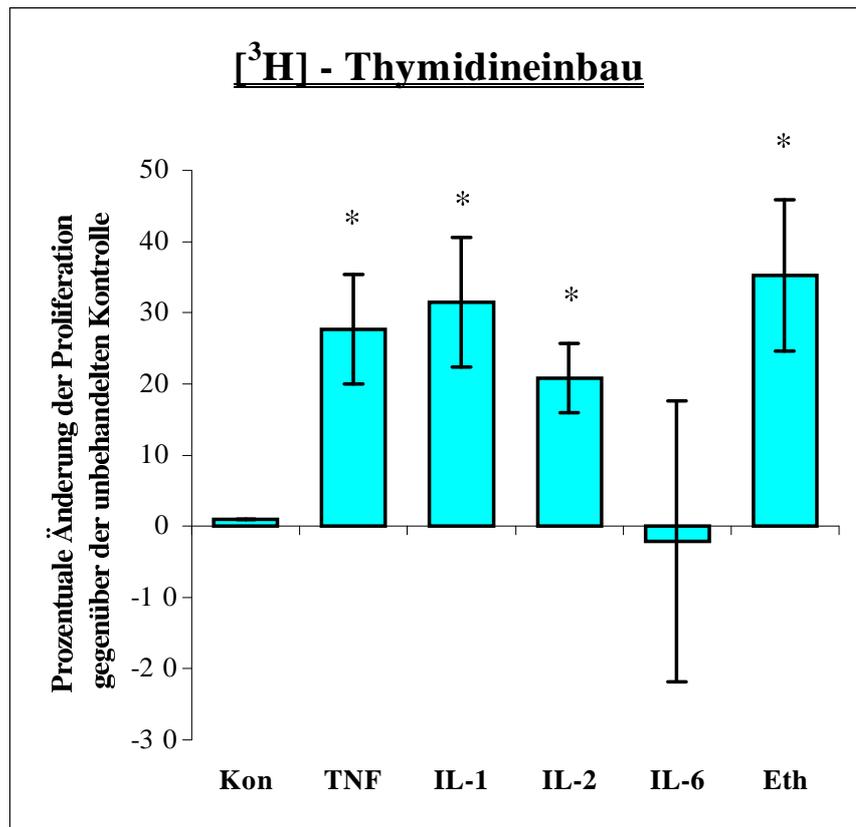


Abb. 6

Zellproliferation ~~ter~~ndem Einfluß ~~er~~ Zytokine Interleukin-1 β (IL-1: 50 U/ml), IL-2 (50 U/ml), IL-6 (50 U/ml), Tumornekrosefaktor α (TNF: 2,5 ng/ml) und Endothelin (Eth: 0,1 μ g/ml). Dargestellt ~~st~~ die prozentuale Änderung ~~eger~~ gegenüber der Kontrolle (auf die Kontrolle normierte Mittelwerte mit Standardabweichung) aus 5–12 unabhängigen Experimenten ($n=15-36$; $x \pm SD$). Die ~~getesteten~~ ~~stanze~~ ~~Su~~ TNF, IL-1, IL-2 ~~Eth~~ ~~w~~weisen eine signifikante Steigerung ~~er~~ Proliferationsrate gegenüber der Kontrolle auf. Auf Signifikanz wurde mit dem unabhängigen Students-t-Test geprüft (* $p < 0,05$).

d

3.2.2. Hemmungsexperimente

Der Hemmer der Proteinkinase C, Staurosporin, wirkt in Konzentrationen von 10 nM und 50 nM dem Einbau markierten Thymidins in die DNA dosisabhängig vermindern. Durch die Einwirkung des Staurosporins verringerte sich der Thymidineinbau um 20% (10 nM) bzw. 60% (50 nM) gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 7a). Dies ist ein Nachweis für die Bedeutung der Proteinkinase C für intrazelluläre Signalwege, die bei der Stimulation des Zellwachstums eingeleitet werden. Ebenso ist die Aktivierung der Tyrosinkinase für die Regulation der Zellproliferation von Bedeutung.

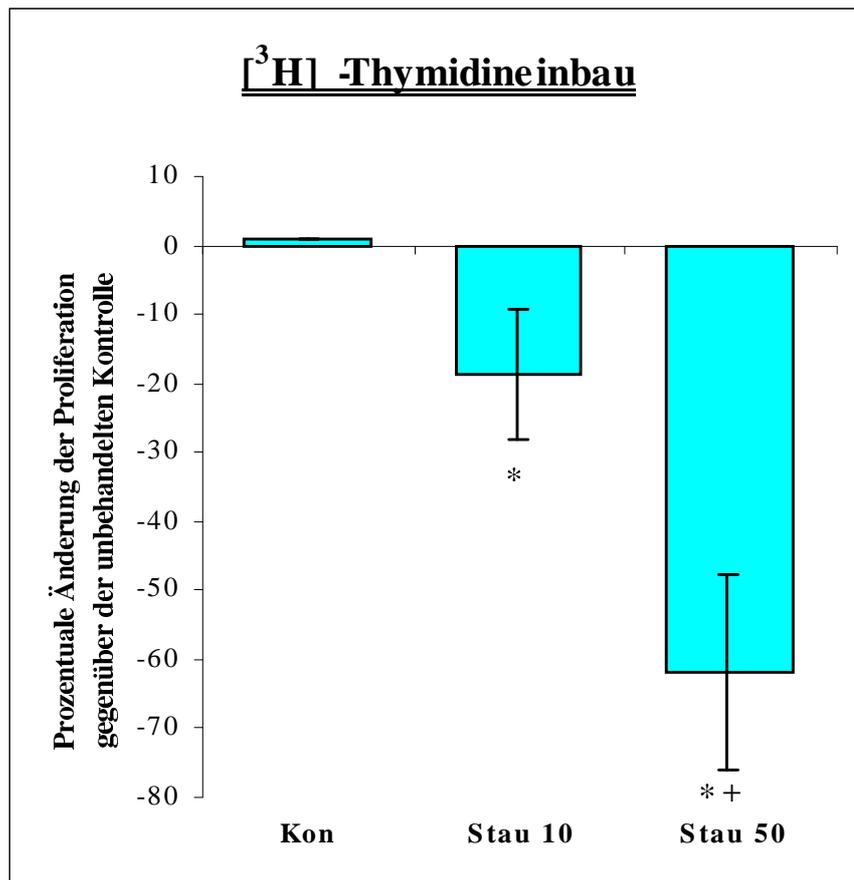


Abb. 7a

Die Graphik zeigt eine signifikante (* $<0,01$) konzentrationsabhängige Verminderung der Proliferationsrate gegenüber der Kontrolle durch 10 und 50 nM Staurosporin sowie eine signifikante (+ $p<0,01$) Hemmung von Stau 50 gegenüber Stau 10. Es wurden drei unabhängige Experimente mit je drei Einzelwerten durchgeführt. Dargestellt ist die prozentuale Änderung gegenüber der Kontrolle (auf die Kontrolle normierte Mittelwerte mit Standardabweichung).

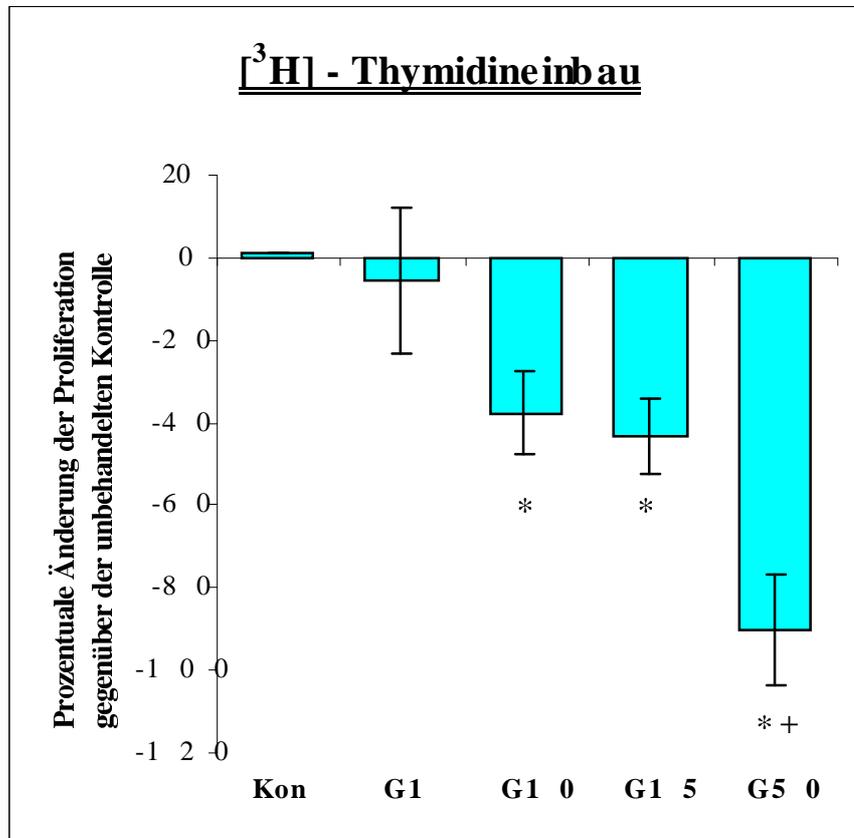


Abb. 7b

Dosisabhängige Hemmung der Proliferationsrate durch Genistein (G) in steigenden Konzentrationen von 1-50 µg/ml. Die Aktivität der Tyrosinkinase scheint eine bedeutende Rolle für das Zellwachstum zu spielen. Die Wachstumshemmung ist proportional zur eingesetzten Dosis. Es wurden drei unabhängige Experimente mit je drei Einzelwerten durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($x \pm SD$). * $p < 0,01$ ist signifikant gegenüber der Kontrolle, + $p < 0,01$ ist signifikant gegenüber G 10 und G 15.

Durch Konzentrationen von 1-50 µg/ml Genistein, welches spezifisch die Tyrosinkinase hemmt, wurde eine dosisabhängige Reduktion des Thymidineinbaues um 4-90% gegenüber der unbehandelten Kontrolle gefunden (Abb. 7b).

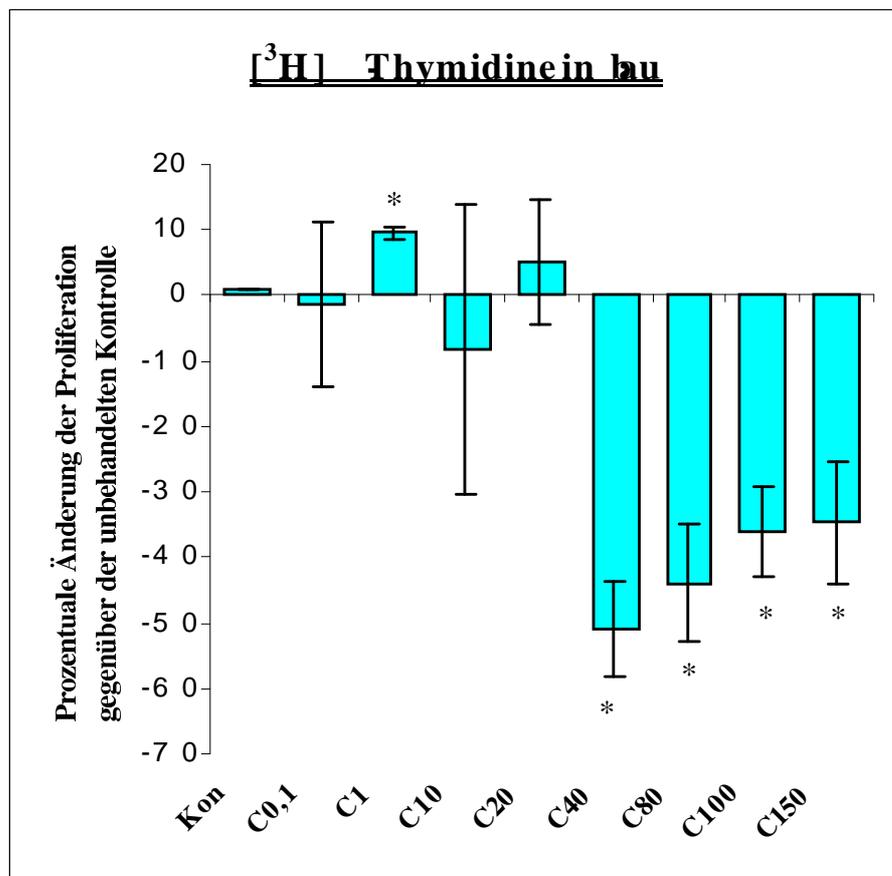


Abb. 7c

Gezeigt wird der Einfluß von Cyclosporin A (C) in den Konzentrationen von 0,1 bis 150 ng/ml auf die Proliferation. Dargestellt sind die Mittelwerte ($\bar{x} \pm \text{SD}$) prozentual zur Kontrolle von rein unabhängigen Experimenten mit je drei Einzelwerten ($n = 9$). Ab einer Konzentration von 40 ng/ml ist ein starker hemmender Einfluß von CSA zu beobachten (* $p < 0,01$).

Cyclosporin A (CSA) ist ein standardmäßig angewandtes Immunsuppressivum, welches die IL-2-abhängige T-Zellproliferation verdrückt und vor allem bei Organtransplantationen eingesetzt wird (Erdei, Spaeth & Alsenz 1984).

Da pathologische Veränderungen glatter Muskelzellen bei Abstoßungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen, war die Wirkung des nach Transplantation eingesetzten CSA auf die Proliferation kultivierter glatter Muskelzellen in dieser Arbeit von besonderer Bedeutung. Konzentrationen von 20 ng/ml CSA zeigten in dem untersuchten Zeitraster keinen wesentlichen Einfluß auf die Zellproliferation.

Bei Konzentrationen von 0-450 ng/ml CSA wird eine deutliche Hemmung um bis zu 50% gegenüber der unbehandelten Kontrolle beobachtet (Abb. c). Eine interessante Beobachtung ist, daß bei Konzentrationen ab 140 ng/ml CSA keine weitere dosis-abhängige Hemmung festzustellen ist. Im Gegenteil, mit steigender Konzentration des Immunsuppressivums nimmt die Hemmung in geringfügigem Maße von 5% auf ca. 3% ab. Dieser Effekt konnte in mehreren experimentellen Ansätzen reproduziert werden.

3.3. Wirkung von Zytokinen nach Vorinkubation mit Hemmstoffen

In den folgenden Experimenten wurde versucht, Kulturen menschlicher Muskelzellen, die unter dem Einfluß eines Hemmstoffes stehen, mit den verschiedenen Zytokinen zu kombinieren, um deren Einfluß auf die Proliferationsrate bekannt zu machen. Aus diesem Grunde wurden wiederum Zellkulturen, die nach dem bekannten Schema gezogen wurden, mit einem Wachstumshemmer vorinkubiert und später zusammen mit einem Zytokin inkubiert. Abbildung 8a stellt die Koinkubation des Proteinkinase C-Hemmers Staurosporin mit den verschiedenen Zytokinen dar. Die signifikante Proliferationssteigerung von Interleukin-1 β (IL-1), Interleukin-2 (IL-2) und Endothelin (Eth) (Abb. 6) wird komplett inhibiert durch die Ko-Administration mit Staurosporin (Abb. 8), d.h. die Wirkung dieser Zytokine ist abhängig von der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Interleukin-1 β (IL-1), IL-6 und Endothelin (Eth) zeigen einen additiven Effekt, d.h. sie hemmen in Gegenwart von Staurosporin die Zellproliferation zusätzlich um weitere ca. 50%. Die einzige Ausnahme bildet hier der Tumornekrosefaktor α (TNF). TNF α scheint die Hemmung der Proteinkinase C durch Staurosporin aufzuheben. Der gezeigte Wert von ca. +30% entspricht einem Wert, wie erreicht wird, wenn die Zellkulturen nicht stimuliert werden und einem „normalen“ Zellwachstum unterliegen. Die Proteinkinase C ist nicht die Proliferationssteigerung durch TNF α demnach nicht alleine oder nur teilweise einbezogen.

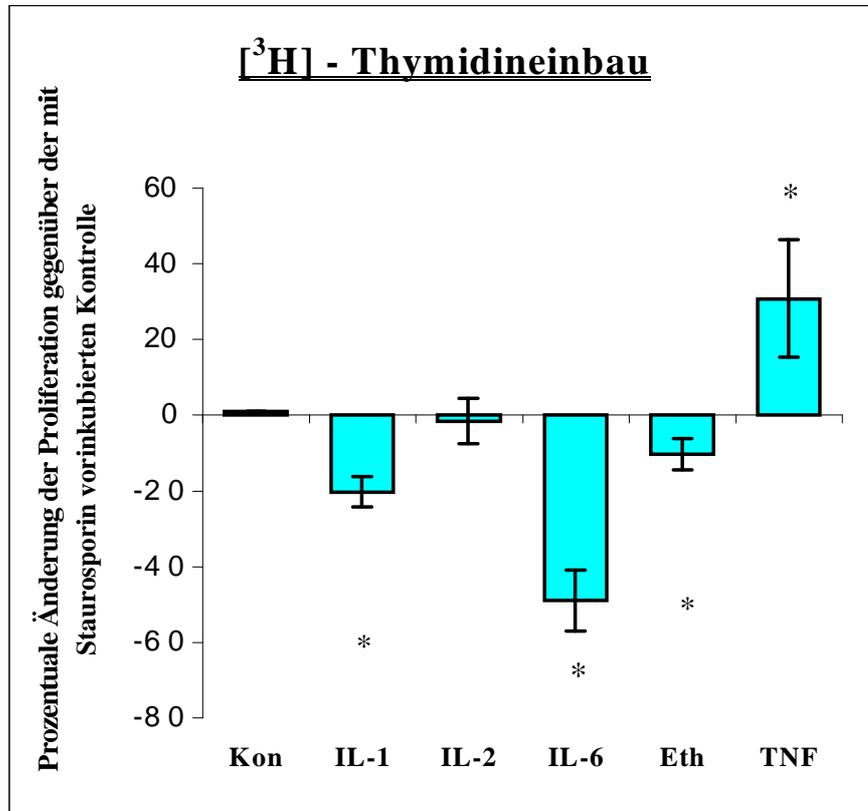


Abb. 8a

Die Wirkung der getesteten Zytokine in Kombination mit Staurosporin im Vergleich zu Staurosporin allein. Die Abbildung zeigt verschiedene starke Ausprägungen der Staurosporin-induzierten Proliferationshemmung nach Zugabe von Interleukin-1 β (IL-1), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-6 (IL-6) und Endothelin (Eth). Deren Einfluss auf die Zellproliferation scheint von der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) abhängig zu sein. Tumornekrosefaktor α (TNF α) induziert eine Proliferationssteigerung trotz Ko-Inkubation mit Staurosporin, ein Hemmer der Proteinkinase C. Die Wirkung von TNF α ist also nicht ausschließlich von der Aktivierung der PKC abhängig. Es wurden drei unabhängige Experimente mit je drei Einzelwerten durchgeführt. Dargestellt sind der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$). Eine signifikante Änderung des [³H]-Thymidineinbaus bei TNF α , IL-6 (* $p < 0,01$), IL-1 β (* $p < 0,05$) und Eth ist zu erkennen.

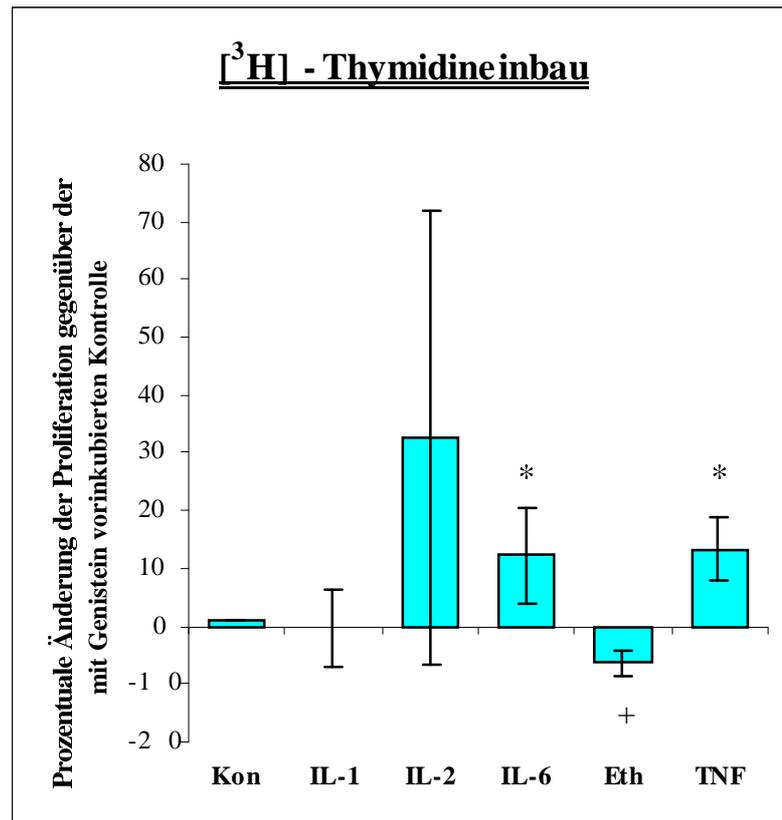


Abb. 8b

Die Wirkung der getesteten Zytokine in Kombination mit Genistein im Vergleich zu Genistein allein als Kontrolle (15 µg/ml). TNFα bewirkt eine Steigerung der Proliferation dieser Muskelzellen von nur 13,3% gegenüber der Genistein-Kontrolle. Die Wirkung von TNFα ist also teilweise von der Aktivität der Tyrosinkinase abhängig und in diesem Experiment teilweise durch Genistein unterdrückt. Die IL-1- und Eth-induzierte Proliferationssteigerung wird komplett durch Genistein inhibiert. Es wurden reidunabhängige Experimente mit drei Einzelwerten durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($x \pm SD$) und die Signifikanz * $p < 0,05$ für IL-6 und TNF bzw. + $p < 0,05$ für Eth.

Cyclosporin A (CSA) wird schon lange als Standardimmunsuppressivum bei der Therapie zur Vorbeugung der Transplantatabstoßung angewandt. CSA wurde in dieser Arbeit in einer Konzentration von ng/ml verwendet. Abbildung 8c zeigt einen deutlichen Synergismus zwischen IL-1 und CSA. Die Proliferationsrate wurde hier um zusätzlich 60% gegenüber der CSA-Kontrolle gesenkt. Auch die anderen getesteten Zytokine haben einen Effekt, der die CSA-Hemmung zu unterstützen scheint.

Wegen der hohen Schwankungsbreite ist der Effekt in Gegenwart von IL-2 und IL-6 schwierig zu interpretieren.

Die Wirkung von TNF, ein starker Mediator der Zellproliferation (Estrada et al. 1995), wird durch Ko-Inkubation mit CSA eliminiert. Der hemmende Einfluß von CSA auf die Wirkung der getesteten Zytokine war bei TNF α am geringsten.

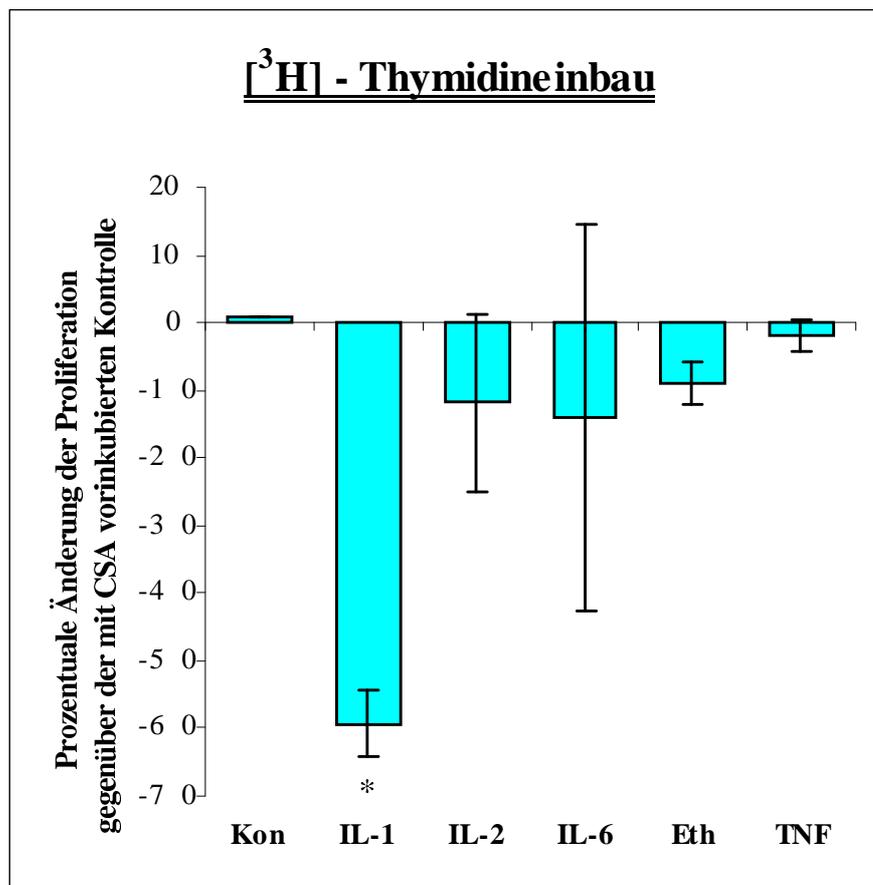


Abb. 8c

Die Wirkung der getesteten Zytokine in Kombination mit Cyclosporin A (CSA) bei einer Konzentration von 10 ng/ml und CSA allein als Kontrolle. Unter der CSA-Wirkung zeigt sich eine deutliche Reduktion der Vermehrungsrate. Besonders bei IL-1 zeichnet sich eine hochgradige Verminderung des Zellwachstums (ca. 60 %) gegenüber der Kontrollgruppe ab.

Die proliferationssteigernde Wirkung von TNF wird durch den Einfluß von CSA aufgehoben. Es wurden wieder unabhängige Experimente mit drei Einzelwerten durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($x \pm SD$; * $p < 0,01$).

3.4. Wirkung von Hemmstoffen nach Vorinkubation mit Zytokinen

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluß der zellwachstumsunterstützenden Faktoren (TNF, IL-1 etc.) auf die hemmenden Stoffe Genistein (G), Staurosporin (St), Cyclosporin A (CSA) überprüft. Dazu wurden in jeweils mehreren Ansätzen Zellkulturen humaner glatter Muskelzellen mit einem Faktor vorinkubiert und nach dem festgelegten Zeitraster zusätzlich mit den verschiedenen Hemmstoffen mit vorgegebener Dosierung behandelt.

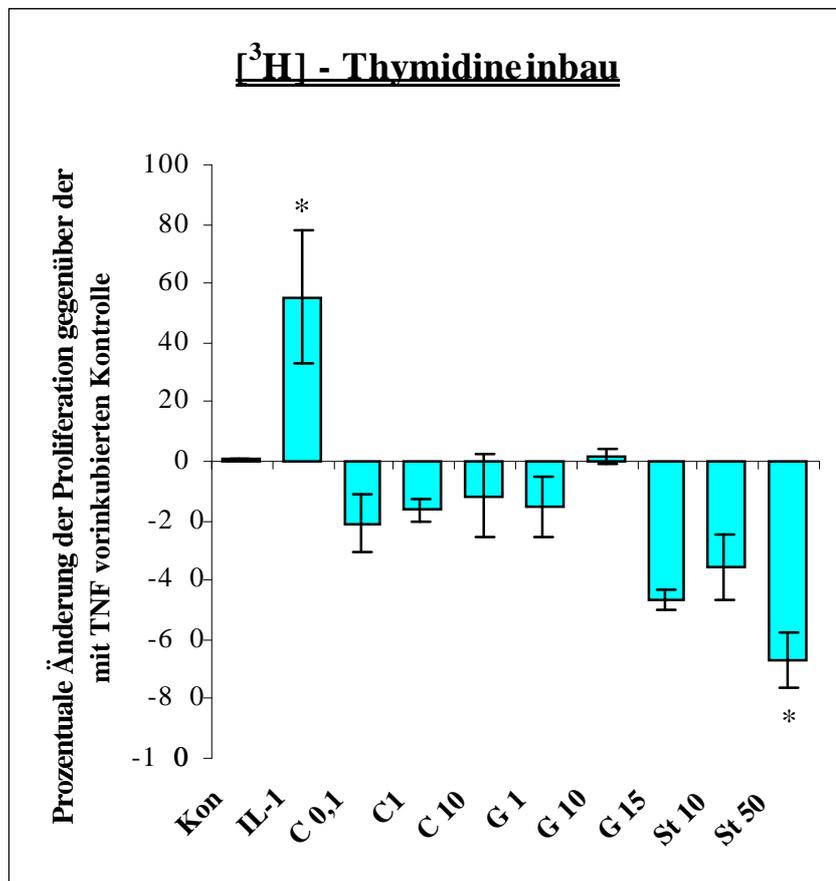


Abb. 9a

Jeder Balken entspricht einer Ko-Administration mit TNF α (2,5 ng/ml). Es wurde mit TNF α zunächst vorinkubiert und anschließend gemeinsam mit den jeweils dargestellten Konzentrationen stimuliert. In der Darstellung ist eine deutlich additive Wirkung vor dem Einfluß von TNF α und IL-1 festzustellen. Sie beträgt hier 55% (signifikant mit * $< p < 0,01$) gegenüber der Kontrollgruppe, welche mit TNF α allein stimuliert wurde. Alle anderen Ergebnisse zeigen den erwarteten Verlust an Zuwachs unter Zugabe von Hemmfaktoren (C, Cyclosporin A: ng/ml; G, Genistein: μ g/ml; ST, Staurosporin: nM). Es wurden drei unabhängige Experimente mit je zwei Einzelwerten durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($x \pm SD$).

un

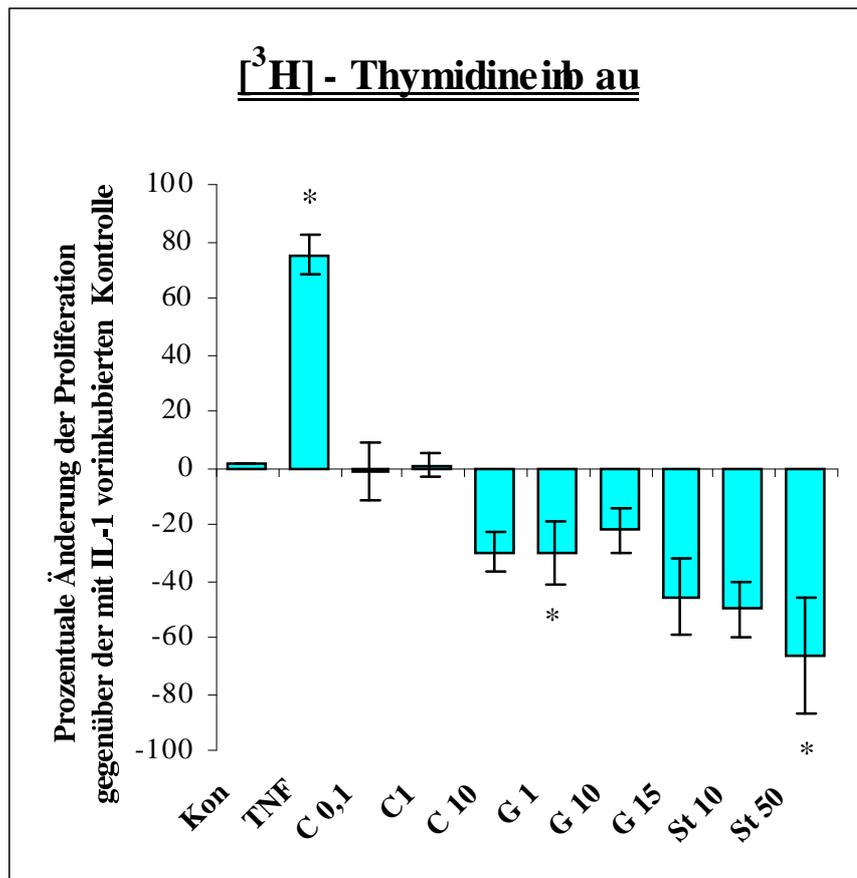


Abb. 9b

Jeder Balken entspricht einer Ko-Administration mit IL-1 (50 U/ml). Mit IL-1 wurde zunächst vorinkubiert und anschließend jeweils aufgeführten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen appliziert. Dargestellt wird in dieser Grafik der Einfluß derselben Substanzen wie in Abb. 9a, diesmal mit IL-1-Vorstimulation. Die additive Stimulation durch TNF α von über 75% gegenüber der Kontrollgruppe entspricht dem Effekt von TNF α und IL-1 aus Abb. 9a. (C, Cyclosporin A: ng/ml; G, Genistein: $\mu\text{g/ml}$; ST, Staurosporin: nM). Es wurden real unabhängige Experimente mit je drei Einzelwerten durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm \text{SD}$) und die Signifikanz mit * $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle.

In denselben Versuchsansätzen wurden außerdem die verschiedenen Hemmstoffe in unterschiedlichen Dosierungen auf die mit einem Zytokin inkubierten Zellen aufgebracht, um deren Effekt auf proliferierende Zellen zu beobachten. Abbildung 9a stellt die jeweiligen Reaktionen auf die verschiedenen Substanzen und IL-1 auch mit TNF einen deutlich additiven Effekt, deren Proliferationsrate um ca. 5% höher als die TNF-Kontrolle liegt.

Der Zellzuwachs TNF-vorinkubierter Zellen wird nach Zugabe von CSA in den Konzentrationen 0,1-10 ng/ml um bis zu 20% reduziert (siehe Abb. 9a).

Bei Vorbehandlung mit TNF und anschließender Inkubation mit Genistein oder Staurosporin hingegen findet sich bei steigenden Konzentrationen eine deutliche Hemmung der TNF-Wirkung. Es scheint, daß die intrazelluläre Wirkung des TNF über die Tyrosinkinase und / oder über die Proteinkinase C vermittelt wird.

Bei Vorstimulation mit IL-1 und anschließender Kombination mit TNF α wird ein deutlich additiver Proliferationseffekt erzeugt (Abb. 9b). Die Steigerung von etwa 75% gegenüber der Stimulation mit IL-1 allein deckt sich sehr gut mit dem in Experiment n Abbildung 9a. Darüberhinaus zeigen sich gute dosisabhängige Hemmungseffekte mit Genistein und Staurosporin. Die antiproliferative Wirkung von CSA bei niedriger Dosierung wird durch IL-1 hingegen aufgehoben. Jedoch ab einer Konzentration von 10 ng/ml CSA zeigt sich eine etwa 30%ige Minderung der Zellvermehrungsrate.

Die Abbildung 9c veranschaulicht bei Vorstimulation mit IL-2 den Synergismus mit Endothelin und TNF. Interleukin-2 bewirkt allgemein (siehe Abb. 6) eine Steigerungsrate der Proliferation um ca. 100%. Die Kombination IL-2 mit Endothelin, welches im Rahmen der außer Kontrolle geratenen Gleichgewichtsfunktion (Dubin, Pratt & Dzau ; Sarmagel 1995) bei der chronischen Transplantatabstoßung vermehrt von proliferierenden Endothelzellen sezerniert wird, bewirkt eine Zunahme des Thymidineinbaus um 40%.

IL-1 und IL-2 scheinen einen großen Einfluß auf die Proliferationsrate glatter Muskelzellen nach Vorinkubation mit IL-2 zu haben. Die Proliferationssteigerung durch IL-1 ist nach Vorinkubation mit IL-2 nicht mehr vorhanden. Bei Abwesenheit von IL-2 kann IL-1 seine proliferationssteigernde Wirkung wie in Abb. 6 entfalten. Dies scheint klinisch interessant zu sein, da CSA die IL-2-Produktion von T-Zellen inhibiert, und es nicht bekannt ist, ob glatte Muskelzellen auch möglicherweise auf IL-1 empfindlicher reagieren. Wie in den Abbildungen a und b offensichtlich ist, zeigen die Hemmstoffe CSA, Genistein und Staurosporin einen dosisabhängigen Rückgang des Zellwachstums.

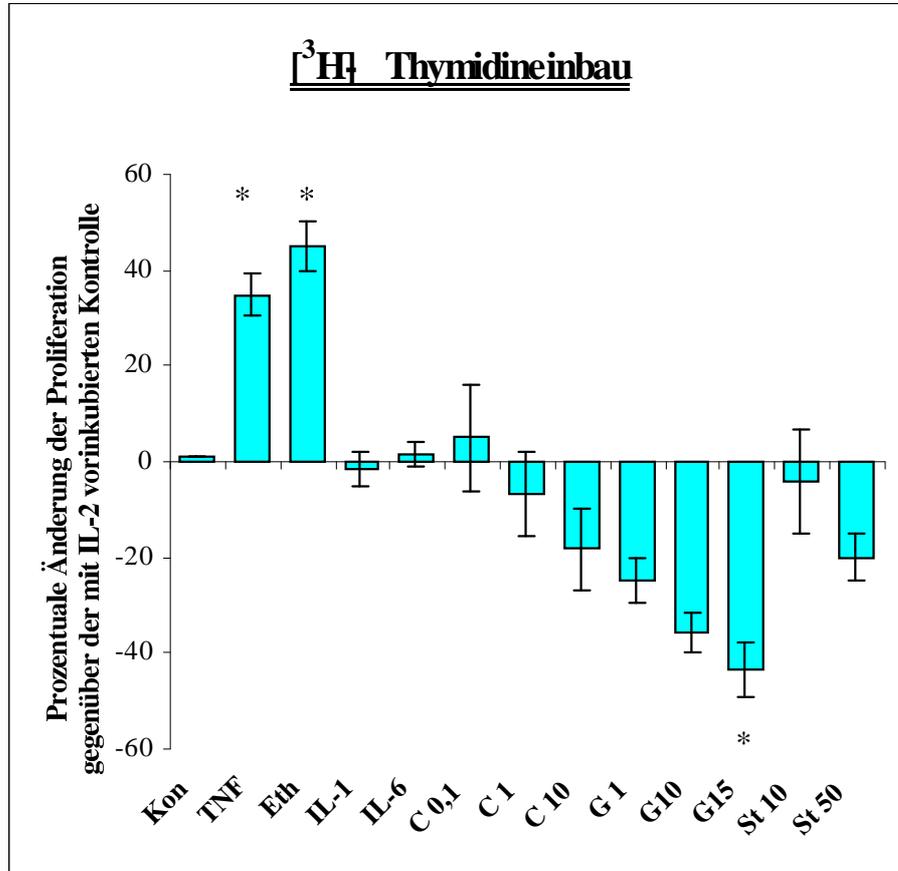


Abb. 9c

Die Wirkung von $TNF\alpha$ (TNF: 2,5 μ g/ml) und Endothelin (Eth: 0,1 μ g/ml), Interleukin-1 β (IL-1: 50 U/ml), Interleukin-6 (IL-6: 50 U/ml) und der Hemmstoffen [C, Cyclosporin A: (ng/ml)/G, Genistein: (μ g/ml) und Staurosporin: (nM)] in Kombination mit Interleukin-2 (IL-2) gegenüber IL-2 alleine als Kontrolle. Deutliche Zunahme des Zellwachstums unter $TNF\alpha$ (2,5 μ g/ml) und Endothelin (0,1 μ g/ml) bei Vorstimulation mit Interleukin-2 (50 U/ml). Im weiteren Verlauf sind die Kombinationen von IL-2 mit den verschiedenen Enzymhemmern Cyclosporin A, Genistein und Staurosporin im Vergleich zu IL-2 allein dargestellt. Es wurden drei unabhängige Experimente mit je drei Einzelwerten durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($x \pm SD$) und die Signifikanz mit * $p < 0,01$.

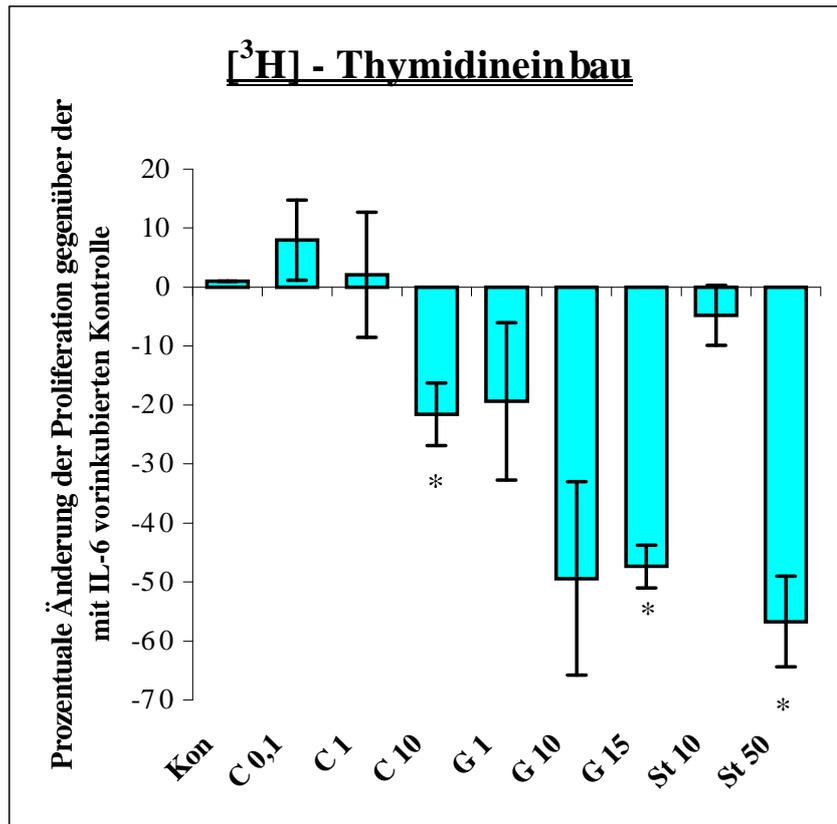


Abb. 9d

Die Wirkung der Hemmstoffe Cyclosporin A (C), Genistein (G) und Staurosporin (St) ko-inkubiert mit Interleukin-6 (IL-6) im Vergleich zu IL-6 allein als Kontrolle. Interleukin-6 scheint in dieser Darstellung für die Proliferation einen erregenden Einfluß zu haben. Auch hier wird wieder die dosisabhängige Reduktion der Proliferation der verschiedenen Hemmstoffe (C, Cyclosporin A: ng/ml; G, Genistein: µg/ml; St, Staurosporin: nM) demonstriert (* $p < 0,01$).

In Abb. 9d ist der hemmende Einfluß von CSA, Genistein und Staurosporin auf mit Interleukin-6 stimulierten Zellkulturen dargestellt. IL-6 spielt als Mediator der Zellproliferation glatter Muskelzellen in diesen Untersuchungen und möglicherweise auch im Rahmen der chronischen Abstoßungsreaktion eine zentrale Rolle. Die positiven Ergebnisse mit CSA (0,1 ng/ml) und CSA (1 µg/ml) hatten wegen der hohen Schwankungsbreite nur geringe Aussagekraft. Demgegenüber wird der

dosisabhängige Abfall der IL-6 abhängigen Zellwachstumsrate durch Genistein oder Staurosporin demonstriert.

Endothelin, eine Substanz, die von Endothelzellen sezerniert wird und schon in der Kontrollgruppe eine Steigerung der Proliferation von über 30% bewirkt (Abb. 6), zeigt in Abbildung 9e einen deutlich synergistischen Effekt 500 U/ml Interleukin-1 β (IL-1).

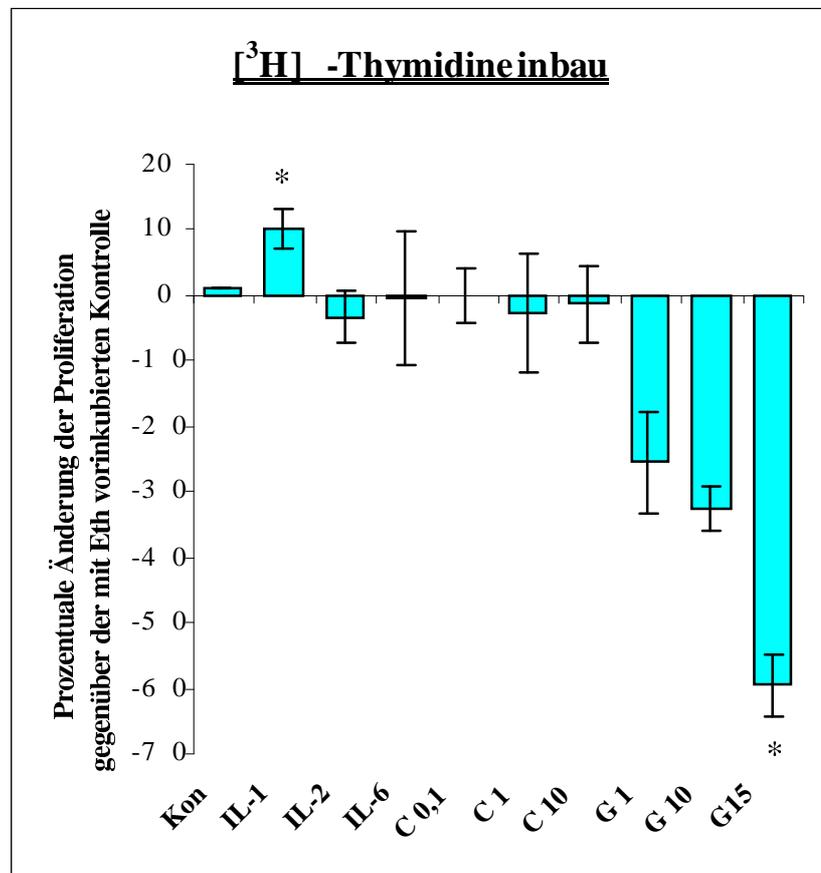


Abb. 9e

Dargestellt ist die Wirkung von IL-1, IL-2, IL-6, CSA und Genistein bei Ko-Administration mit Endothelin im Vergleich zur endothelinvorstimulierten Kontrolle. Unter Endothelinvorstimulation wird der hemmende Einfluß von CSA (C: ng/ml) auch in höheren Konzentrationen unterdrückt. Interleukin-1 zeigt hier eine additive, 10%ige Steigerung der Wachstumsrate gegenüber Endothelin. Die starke Hemmung durch Genistein (G: μ g/ml) verdeutlicht, daß Endothelin über den Signalweg der Tyrosinkinase an humanen glatten Muskelzellen wirkt. Es wurden drei unabhängige Experimente mit je drei Einzelwerten durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($x \pm SD$) und die Signifikanz mit * $p < 0,01$.

Der Thymidineinbau in die DNA humaner glatter Muskelzellen wurde mit Endothelin um weitere 10% gegenüber Endothelin alleine gesteigert werden. IL-2 und IL-6 üben einen zusätzlichen positiven Effekt auf das Zellwachstum nach Vorinkubation mit Endothelin. Ein Hauptbefund in dieser Graphik ist, daß die Wirkung von CSA auch in höheren Dosierungen durch den Endothelieinfluß komplett blockiert wird. Es zeigt sich keine Verminderung der Proliferationsrate.

Bei Genistein findet sich erneut eine dosisabhängige Reduktion der Proliferation.

Bei allen hier dargestellten Experimenten wurde eine stark dosisabhängige Hemmung der Proliferation durch Genistein bei verschiedenen Zytokinen vorstimulierten Zellkulturen nachgewiesen (Abb. 9a-e).

3.5. Blockade der NO-Synthase durch L-NAME

L-NAME, der Blocker der Stickoxid-Synthase (NOS), sollte die intrazelluläre Bildung von Stickoxid (NO) unterbinden. Die Produktion von intrazellulärem NO wird insbesondere durch Aktivierung extrazellulärer Rezeptoren gesteuert. Stickoxid ist für seine gefäßerweiternde und antiproliferative Wirkung bekannt (Anggard 1994). In dem vorliegenden Zellkulturmodell wurde deshalb untersucht, ob die Blockade der NO-Synthase durch L-NAME die Proliferationssteigerung durch Zytokine verstärken kann. Im weiteren Ansatz sollte die Frage geklärt werden, inwieweit die CSA-induzierte Proliferationshemmung der Muskelzellen ebenfalls NO-vermittelt ist und dementsprechend durch L-NAME antagonisiert werden kann.

Die Inkubation von 100 μ M L-NAME alleine tendiert zu einer geringen Steigerung der Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle. Dies ist ein Indiz für die antiproliferative Wirkung des intrazellulär gebildeten Stickoxids (Abb. 10a).

Durch die gemeinsame Gabe von Interleukin-1 β plus L-NAME konnte gezeigt werden, daß die Inhibition der NOS nicht zu einer Steigerung der LHI-induzierten Proliferation führt (Abb. 10a). L-NAME ist ebenfalls ohne Einfluß auf die TNF α -induzierte DNA-Synthese (Abb. 10b).

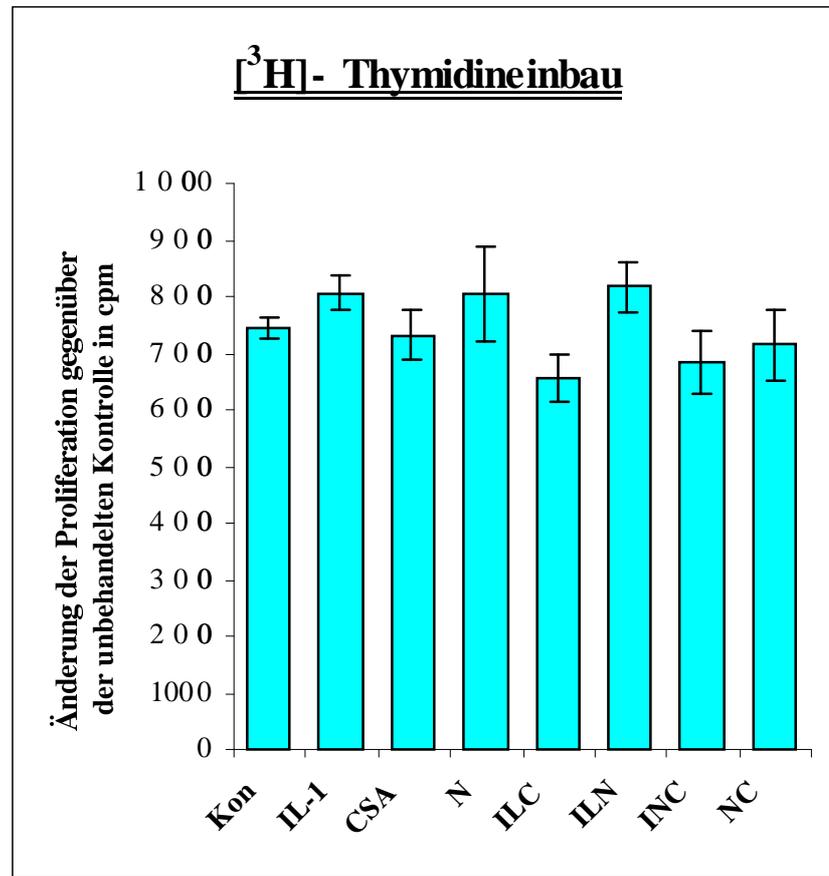


Abb. 10a

Der Einfluß von Blockern der NO-Synthase L-NAME (N: 100 μ M) auf den Thymidineinbau humaner glatter Muskelzellen. Untersucht wurde das Wachstumsverhalten der Zellen bei alleiniger oder zusätzlicher Stimulation mit IL-1 (IL-1: 50 U/ml) oder CSA (C: 10 μ g/ml). Angegeben sind die absoluten Werte in cpm (counts per minute) als Mittelwerte ($\bar{x} \pm SD$).

L-NAME konnte den Effekt von CSA, welches in den verwendeten Konzentrationen gerade einen minimalen Hemmungseffekt aufwies, antagonisieren und führte zu einer Erhöhung der gemessenen Radioaktivität von ca. 5800 cpm (CSA) auf ca. 6670 cpm (CSA plus L-NAME). Dies entspricht einer Steigerung um ca. 15% (Abb. 11b). Dies war jedoch nicht immer eindeutig reproduzierbar und stellt nur einen Trend dar. Aus den Versuchen wird auch deutlich, dass CSA die TNF α -Wirkung aufzuheben vermag (Abb. 11b). Dies spiegelt die klinische Situation wider, in der Immunsuppressiva die Aktivierung von Immunzellen unterdrücken sollen. Darum sind die Ergebnisse aus der kombinierten Gabe von CSA, TNF α und L-NAME von besonderem Interesse.

L-NAME ist in der Lage, den schon durch CSA verminderten TNF α -Wert (Abb. 10b) um weitere 10% zu reduzieren.

In weit stärkerem Maße als bei CSA/TNF α hemmt CSA die IL-1-Wirkung. Hier wird der Absolutwert der eingebauten Radioaktivität von ca. 8050 cpm (IL-1) auf ca. 6500 cpm (IL-1 plus CSA, ILC) vermindert. Dies entspricht einer ca. 20%igen Reduktion der DNA-Synthese (Abb. 10a). Der Versuchsansatz war der gleiche wie in Abb. 9a.

Zuerst wurde mit den Einzelsubstanzen inkubiert (IL-1; CSA; L-NAME; siehe Abb. 10). Nach dem Mediumwechsel wurden die jeweiligen Testsubstanzen mit der zuerst applizierten Substanz koinkubiert.

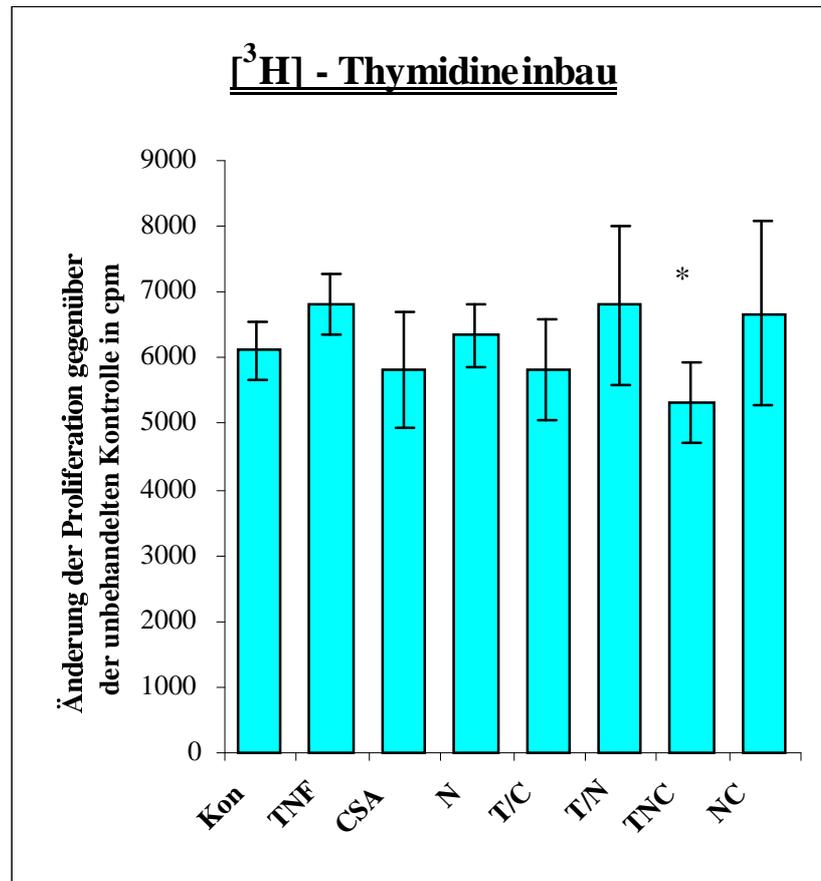


Abb. 10b

Der Einfluß von Blockern der NO-Synthase L-NAME (N: 100 μ M) auf den Thymidineinbau humaner glatter Muskelzellen. Untersucht wurde das Wachstumsverhalten der Zellen bei alleiniger oder zusätzlicher Inkubation mit TNF α (T: 2,5 μ g/ml) oder CSA (C: 10 μ g/ml). Angegeben sind die Absolutwerte in cpm (counts per minute) und die Signifikanz mit * $p = 0,026$ gegenüber T/N.

3.6. Der Einfluss von Endothelzellüberständen auf die Proliferation von HSMC

Um den Einfluss von Mediumüberständen aus Endothelzellkulturen in dem hier beschriebenen Zellkulturmodell zu testen, wurden glatte Muskelzellen mit drei Tagen Überständen inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium von Endothelzellen konditioniert, wobei Mediatoren freigesetzt und essentielle Nährstoffe verbraucht wurden. Durch diesen Mediaumaustausch können Zellsignale vermittelt werden, wie *in situ* in physiologischer Weise zwischen dem Endothel und der glatten Muskulatur der Fall ist. Die Mediumüberstände wurden in ein- bzw. zehnpromzentigen Konzentrationen zugesetzt.

Hier wird aber nur auf die Ergebnisse mit 1% Endothelmediumüberstand eingegangen. Von besonderer Bedeutung war die parallele Stimulation der glatten Muskelzellen mit $\text{TNF}\alpha$ nach Gabe des Überstandes (Ü, Ü/T), des frischen Endothelmediums (ECM, EC/T) und des frischen Muskelzellmediums (HSM, HMS/T). ECM diente hierbei als Kontrolle für den Endothelüberstand (Ü). Frisches, unverbrauchtes Nährmedium der Endothelzellen führt zu einer Wachstumshemmung glatter Muskelzellen um ca. 40% (ECM, Abb. 1a). Wenn das Medium von den Endothelzellen drei Tage konditioniert wurde (Überstand, Ü) ist die Wachstumshemmung der glatten Muskelzellen nur sehr gering. Faktoren der Endothelzellen können das Wachstum glatter Muskelzellen erhöhen. In Gegenwart des Endothelüberstandes (Ü) reagieren die glatten Muskelzellen auf die zusätzliche Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ (Ü/T) nicht mit einer Proliferationssteigerung. Das heißt, das konditionierte Medium der Endothelzellen verhindert eine übermäßige Proliferation der glatten Muskelzellen, ähnlich wie es in physiologischer Weise zu erwarten ist.

Eine sonst deutliche Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ (bis 26,2%), wie sie in der Kontrolle, der ECM gefunden wird (Abb. 1a), wird in Anwesenheit von 1% Überstand (Ü) komplett unterdrückt (Ü/T). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Verwendung von 0% Überstand gefunden (nicht dargestellt), wobei die Hemmung dort konzentrationsabhängig verstärkt wurde (Mandt et al. 1996).

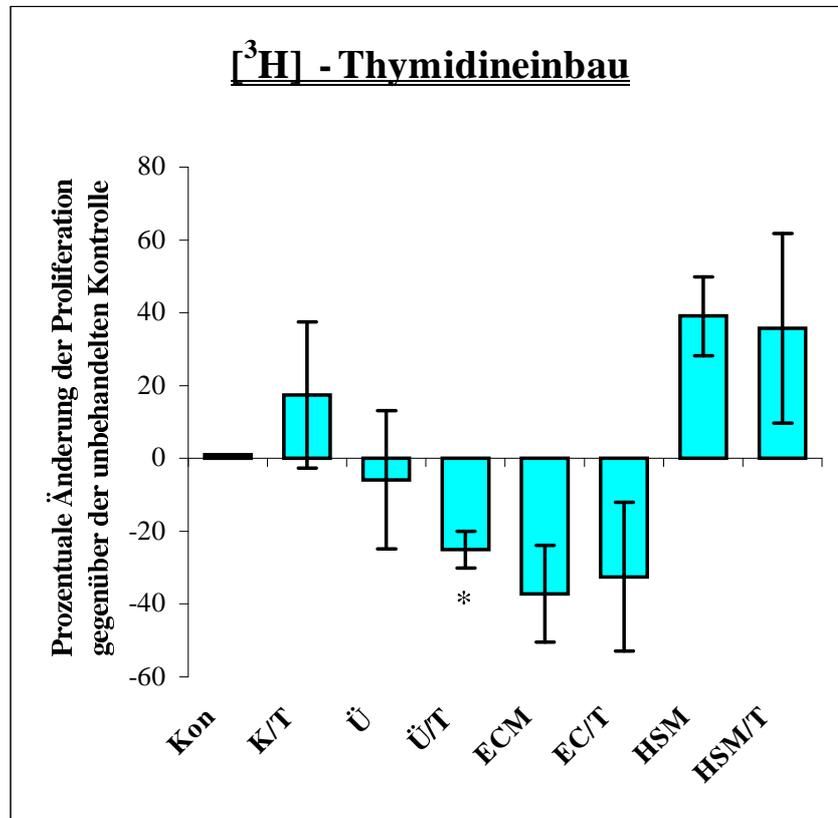


Abb. 11a

Der Einfluß von Endothelzellmedium-Überstand (Ü: 1%) auf den Thymidineinbau humaner glatter Muskelzellen. Geprüft wurde das Verhalten der Zellen bei zusätzlicher Stimulation mit $TNF\alpha$ (T: 2,5 ng/ml). Als Kontrolle zu den Überständen dienten Kontrollmedium (Kon, K), Endothelzellmedium (ECM) und das Medium glatter Muskelzellen (HSM). Die Überstände der Endothelzellen verhindern die durch $TNF\alpha$ -vermittelte Proliferationssteigerung (Ü/T). Es wurden jeweils 3-fach-Bestimmungen durchgeführt ($\bar{x} \pm SD$) und mit dem unabhängigen Students-t-Test auf Signifikanz geprüft (* $p < 0,05$).

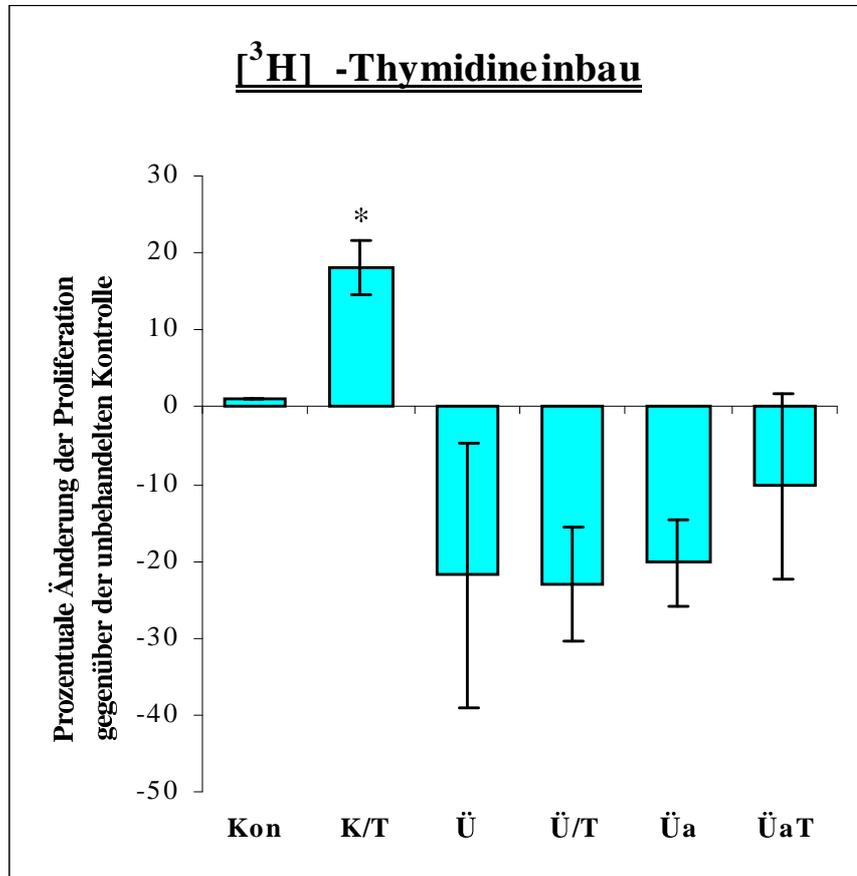


Abb. 11b

Der Einfluß von aktiviertem, mit $TNF\alpha$ vorstimuliertem Endothelzell-Überstand (Üa: 1%) (siehe Abschnitt 2.2.7.) auf den Thymidineinbau glatter Muskelzellen. Geprüft wurde das Verhalten der Zellen bei zusätzlicher Stimulation mit $TNF\alpha$ (T: 2,5 μ g/ml). Als Kontrolle zu den Überständen (Ü) diente Kontrollmedium (Kon, K). Als Kontrolle für die $TNF\alpha$ -Inkubation bei aktiviertem Endothelüberstand (ÜaT) diente die $TNF\alpha$ -Inkubation mit unbehandeltem Endothelüberstand (Ü/T). Die glatten Muskelzellen werden für den $TNF\alpha$ -Stimulus sensibilisiert, wenn sie den $TNF\alpha$ -aktivierte Endothelüberstände zugesetzt werden (ÜaT vs. Ü/T). Es wurden drei unabhängige Experimente mit je drei Einzelwerten durchgeführt. Dargestellt sind der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$) und die Signifikanz mit * $p < 0,05$.

3.7. Einfluss von Überständen TNF α -aktivierter Endothelkulturen

Weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung von endothelspezifischen Faktoren, die durch TNF α induziert werden ~~und~~ Aktivierung der glatten Muskelzellen führen. Zu diesem Zweck wurden Endothelzellen für drei Tage mit TNF α stimuliert und anschließend ~~et~~ Überstand gewonnen. Dieses wurde dann in Konzentrationen von ~~% und %~~ ~~den~~ Muskelzellen zugesetzt. Die unbehandelten Überstände hemmen die Proliferation der Muskelzellen in ~~dem~~ gleichen Ausmaß wie die TNF α -aktivierten Endothelüberstände (um bis zu 22%, Abb. 11b). Die gleiche Hemmung wurde gefunden, wenn zu ~~den~~ ~~unbe-~~handelten Überständen zusätzlich TNF α auf die glatten Muskelzellen gegeben wurde. Die Überstände von Endothelzellen, ~~nach~~ n dreitägiger Konditionierung entnommen, ~~ver-~~hindern ~~bw.~~ antagonisieren ~~die~~ TNF α -Wirkung und damit die erwartete Proliferationssteigerung (Abb. 11a, 11b).

Die Muskelzellen, ~~in~~ ~~dem~~ mit dem TNF α -aktivierten Endothelüberstand (Üa) versetzt wurden, zeigten eine ~~deutliche~~ Zellantwort. Hier konnte die zusätzliche Gabe von TNF α (ÜaT) die Überstand-induzierte Abnahme der Proliferationsrate um ca. 50% reduzieren (ÜaT vs. Üa). Der aktivierte Überstand (Üa) führt zu einer Sensibilisierung der Muskelzellen für einen weiteren TNF α -Stimulus. Die Proliferationsrate konnte somit um 50% gesteigert werden (-10,3% vs. -19,3%), wenn ~~in~~ ~~der~~ TNF α -Stimulation ~~ein~~ nicht aktivierten Überständen (Ü/T) als Kontrolle gesetzt wurde (Abb. 11b).

4. DISKUSSION

Das Endstadium der chronischen Abstoßungsreaktion ist die sogenannte Transplantatarteriosklerose. Verschiedene Mechanismen, wie das HLA-System und die dadurch induzierte Freisetzung von Zytokinen (z.B. TNF α , IL-1, IL-2) tragen dazu bei (Carrami 1992; Wüthrich 1996). Hierbei handelt es sich um einen permanenten Entzündungsreiz, der nach Monaten oder Jahren einer gewissen Autonomie unterliegt (Tracey et al. 1988; Häyry et al. 1992; Yin et al. 1993).

Die Interaktion zwischen glatten Muskelzellen und Gefäßendothelzellen in Bezug auf Migration und Proliferation steht unter physiologischen Bedingungen in einem gewissen Gleichgewicht. Zellwachstum und Migration der Zellen werden durch verschiedene Mechanismen reguliert und durch einen permanenten Entzündungsreiz, wie er posttransplantationem vorliegt, empfindlich gestört. Es entsteht eine Gefäßlumeneinengung und als Spätfolge in Organversagen (Vierbuchen 1993; Geraghty et al. 1996). Die Vorgänge in der Gefäßwand scheinen eine herausragende Rolle bei der chronischen Transplantatabstoßung zu spielen. Lermann und Burnett (1992) wiesen nach, daß durch Scherkräfte, wie sie bei den Gefäßanastomosen auftreten, Endothelzellen wie auch Leukozyten aktiviert werden. Das Endothel wird zur Proliferation stimuliert und am Endothel entlangrollende Leukozyten setzen vermehrt Zytokine frei. Durch vermehrte Expression von Zelladhäsionsmolekülen (I-CAM/E-LAM) der Endothelzellen Anheftung zytokinfreisetzender Leukozyten wird der Zellverband des Endothels der Intima aufgelockert, was mit einem Eindringen weiterer Leukozyten durch die „permeabel“ gewordene Zellschicht verbunden ist (Robertson & Khairallah 1973). Die in der Gefäßmedia eingedrungenen Leukozyten setzen vermehrt Zytokine frei und regen sie dort liegenden glatten Muskelzellen zur Migration und Zellproliferation an. Durch die daraus resultierende Wandverdickung erfahren die Gefäße eine zunehmende Lumeneinengung (Vierbuchen 1993; Geraghty et al. 1996). Die Sauerstoffdiffusionsstrecke zur darunter liegenden Zellschicht wird länger und kann über die daraus resultierende Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes zur Einschränkung der Zellfunktion in der Gefäßwand führen.

Die durch die Gefäßwand freigelegte subendotheliale Kollagenschicht kann das Gerinnungssystem aktivieren als Folge zusätzlich zur Entstehung von Mikrothromben in der terminalen Strombahn des transplantierten Organs beitragen (van Neck & Bloemers 1992). Viele Untersucher, wie Crocer & Salomon (1989) oder Morisaki et al. (1993) und Thomae et al. (1996) haben in ihren Arbeiten tierische Zellen für ihre Experimente herangezogen. Die Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse auf das humane System ist jedoch ein nicht zu unterschätzendes Problem.

Deshalb wurden in dieser Arbeit glatte Muskelzellen aus menschlichen Nabelschnurarterien verwendet, um die einzelnen Effekte so nah am Menschen wie möglich zu studieren. Die humanen glatten Muskelzellen wurden anhand ihrer Morphologie im Phasenkontrast und in der Fluoreszenz mittels spezifischer Antikörper (Material und Methoden 2.2.4.) charakterisiert.

Zunächst wurden die Zellkulturen für die anstehenden Proliferationsexperimente optimiert und anschließend in einem standardisierten Testverfahren verwendet.

In den verschiedenen Ansätzen zeigten sich gelegentlich große Schwankungsbreiten in den Ergebnissen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß Zellen verschiedener menschlicher Nabelschnüre verwendet wurden, welche verschiedene biochemische oder immunologische Voraussetzungen aufwiesen und damit auf Kulturbedingungen und Testsubstanzen unterschiedlich reagierten.

4.1. Stimulationsversuche

Um das Proliferationsverhalten der glatten Muskelzellen zu untersuchen, wurden diese Zellen mit verschiedenen Zytokinen stimuliert. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-2 , IL-6 und Endothelin wurden dazu eingesetzt.

Alle Substanzen mit Ausnahme von IL-6 erhöhen die Zellproliferation der HSMC um 22%-36% in Bezug zur Kontrolle.

Beim Patienten mit chronischer Abstoßungsreaktion könnten eine Aufregulation von Adhäsionsmolekülen (I-CAM-1) und eine gesteigerte Zytokinfreisetzung durch

Infiltration IL-2 aktivierter Blutzellen (Makrophagen, CD 4- und T-Zellen) in die Endothelzellschicht für die Proliferationssteigerung der Gefäßzellen verantwortlich gemacht werden (Hancock et al. 1993). Aus diesen aktivierten Blutzellen wird unter dem Einfluß von Interferon γ und $\text{TNF}\alpha$ sezerniert. Beide Substanzen (Interferon γ und $\text{TNF}\alpha$) stimulieren die IL-2-Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche. $\text{TNF}\alpha$ aktiviert intrazellulär eine Adenylatzyklase, was einen Anstieg von cAMP bewirkt.

IL-2 induziert Tyrosinresten induziert eine schnelle Phosphorylierung intrazellulärer Proteine (Taniguchi et al. 1993).

Auch scheint IL-6 eine gewisse Rolle zu spielen, welche aber nicht so offensichtlich zum Tragen kam. IL-6 zeigte in verschiedenen Experimenten eine erhebliche Schwankungsbreite, so daß eine klare Aussage über dessen „Rolle“ nicht getroffen werden kann.

Das in vivo von Endothelzellen sezernierte Endothelin scheint über einen etwas anderen intrazellulären Mechanismus als Interleukine und $\text{TNF}\alpha$ auf die Proliferation der HSMC zu wirken. Die durch Endothelin angeregte Produktion von PGE_2 und EDRF erhöht über ein G-Protein die intrazelluläre Konzentration von cGMP und cAMP. Auf diesem Wege könnte der endothelinvermittelte Proliferationsschub erklärt werden (Walter et al. 1995). Durch cGMP und cAMP werden wichtige Enzyme und Regulatorproteine aktiviert, welche die intrazelluläre Kalziumkonzentration regulieren und wichtige Rolle bei der Zellteilung innehaben (Cantoni et al. 1994; Goldfeld et al. 1994).

Es ist bekannt, daß Endothelin allein zwar schwach an HSMC bindet, aber daß durch die Ausschüttung von EGF, PDGF oder bFGF anderer Zellen durch Komodulation die Rezeptor-Dichte-Affinität von Endothelin an HSMC erhöht wird (Bonin, Leadley & Erickson 1993). Es ist daher durchaus denkbar, daß Endothelin in einen Synergismus mit anderen Wachstumsfaktoren tritt, wie z.B. IL-1 β , IL-2 oder $\text{TNF}\alpha$. Dieser Synergismus könnte dann eine verstärkte Proliferation von HSMC bewirken und folglich die Beschleunigung der Transplantatarteriosklerose bzw. Wandverdickung der kleinen Arteriolen im Rahmen der chronischen Abstoßungsreaktion (Häyry et al. 1992; Bonin, Leadley & Erickson 1993).

4.2. Hemmungsexperimente

Cyclosporin A

Seit langem schon wird Cyclosporin A als Standardtherapeutikum zur Verhinderung der Transplantatabstoßung durch Unterdrückung des Immunsystems herangezogen. CSA hemmt die Interleukin-2-Synthese und damit die zelluläre Proliferation des Immunsystems, hat aber keinen Einfluß auf die Expression hochempfindlicher IL-2-Rezeptoren (Szamel, Bartels & Resch 1993).

IL-2 scheint keinen gesicherten Einfluß auf die Proliferation von glatten Muskelzellen der Gefäßintima zu besitzen (Abb. 8, b, c und 9). CSA greift nicht in die G₁-S₁-Phase des Zellzyklus ein und blockiert an jeder Stelle die Proliferation. In diesem Fall bei glatten Muskelzellen einer Ratte (Wüthrich; 1996).

Zellen, die mit TNF α und IL-2 inkubiert waren, reagieren auf CSA nicht mehr oder nur in eingeschränktem Ausmaß, d.h. der hemmende CSA-Effekt bleibt aus und die Proliferation bleibt erhalten. Beide Substanzen müssen daher intrazelluläre Signalwege durch auf der Zelloberfläche gelegene Rezeptoren beeinflussen. Eine Erklärung für einen solchen Mechanismus fanden Morisaki et al. (1993) in ihrer Arbeit an glatten Muskelzellen der Hasenaorta. Zellen, die für drei Tage mit TNF α inkubiert wurden, reduzierten α -LDL auf andere Weise als die entsprechenden Kontrollen.

Dies könnte in Hinweis darauf sein, daß TNF α den Phänotyp von HSMC in gewisser Weise modulieren kann. Dies würde bedeuten, daß durch diese Zelloberflächenveränderungen durch TNF α die anfängliche Empfindlichkeit gegenüber CSA gemindert wird und somit der gewollte antiproliferative CSA-Effekt aufgehoben wird. Es ist dies eine mögliche Erklärung für die mit der Zeit auftretende „chronische“ Zellproliferation, die die Transplantatarteriosklerose initiiert und später persistieren läßt (Wüthrich 1996). Ähnliches vermutet eine Arbeit von Leszczynski et al. (1993), welche zeigt, daß CSA eventuell auch eine Proliferation von glatten Muskelzellen anregen kann. Diese Daten sind jedoch widersprüchlich, weil sich auch eine Proliferationshemmung

gezeigt hat. In der vorliegenden Arbeit wurden mit allen höheren (über 40 $\mu\text{g/ml}$) CSA-Konzentrationen eine Hemmung der Zellproliferation erreicht.

Genistein und Staurosporin

Bis jetzt ist noch nicht ganz geklärt, inwieweit intrazelluläre Signalwege durch rezeptorvermittelte Zytokinwirkung angeschaltet werden (Eissner et al. 1998). Es wurde daher der Einfluß der Enzymblocker Genistein und Staurosporin auf zytokinvermittelte Proliferation glatter Muskelzellen getestet. Die Proteinkinasen sind eine Gruppe zellulärer Enzyme, die auch mit Rezeptoren für Wachstumsfaktoren in Verbindung stehen.

Die Phosphorylierung des Tyrosins verschiedener Proteine durch die Tyrosinkinase (TK) ist entscheidend für die Transduktion extrazellulärer Signale ins Zellinnere und die Regulierung der Zellproliferation (Hunter & Cooper 1985; Chang & Geahlen 1992; Punt 1992; Schwartz & Liaw 1993).

Die Frage nach der Beteiligung der Tyrosinkinase an der Proliferation glatter Muskelzellen sollte durch ihre Hemmung untersucht werden.

Genistein, ein Hemmer der Tyrosinkinase, ist ein aus Sojabohnen und *Pseudomonas* isoliertes Isoflavon (Eldridge 1982; Ogawara 1982; Akiyama et al. 1987).

Genistein verhindert z.B. den Stimulationseffekt von Angiotensin II (AT II), einen Wachstumsfaktor, der unter anderem die Proteinbiosynthese stimuliert, welche wiederum für die Proliferation von HSMC notwendig ist.

AT II ist unter anderem für die Tyrosinphosphorylierung verantwortlich. Die Blockade dieses Signalweges verhindert Phosphorylierungsprozesse, hat aber keinen Einfluß auf die durch AT II stimulierte Inositol 1,4,5-triphosphat Produktion und die Kalziummobilisation, welcher eine wichtige Funktion innerhalb der Zellteilung zukommt (Leduc et al. 1995; Semenchuk & Di Salvo 1995).

In dieser Arbeit, wie auch bei Semenchuk & Di Salvo (1995), wird eine dosisabhängige Inhibition der Proliferation glatter Muskelzellen durch Genistein bestätigt. Hemmeffekte von zum Teil 90% wurden hierbei festgestellt. Diese Ergebnisse zeigen, daß der durch Genistein blockierte intrazelluläre Signalweg auch

nach Stimulation durch Entzündungsmediatoren von Bedeutung für die Proliferation glatter Muskelzellen zu sein scheint.

Ein weiterer Hemmstoff für Proteinkinasen ist Staurosporin, vom bekannt ist, daß es die Proteinkinase C hemmt (Vigne et al. 1994).

Eine Blockade der durch $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$ induzierten Proliferation durch Staurosporin könnte für eine Beteiligung der Proteinkinase C der intrazellulären Signalübertragung durch diese Zytokine sprechen.

In den unter Punkt 3.2.2. beschriebenen Experimenten wurde ein klarer Effekt eindrucksvoll nachgewiesen werden. Dort bewirkte die Zugabe von Staurosporin zu vorstimulierten wie auch zu ruhenden Zellen eine Blockade der $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$ vermittelten Proliferationserhöhung.

Gang et al.(1994) haben in ihren Untersuchungen an glatten Muskelzellen vermutet, daß die Aktivierung der Proteinkinase C die zytokininduzierte NO-Synthese hemmt.

4.3. Versuche mit L-NAME

L-NAME, ein Blocker der Stickoxid-Synthase (NOS), sollte in der Lage sein, die intrazelluläre Bildung von Stickoxid (NO) zu blockieren, falls und antiproliferativ wirkt, eine gesteigerte Zellantwort zu bewirken (Anggard 1994). Da die NOS vermutlich über extrazelluläre Rezeptoren gesteuert wird, wurde in den vorangegangenen Versuchen geprüft, inwieweit verschiedene Zytokine in Gegenwart von L-NAME ihre proliferative Wirkung steigern können.

Hierzu wurden die glatten Muskelzellen mit $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ oder dem Immunosuppressivum Cyclosporin A (CSA) inkubiert. Zusätzlich zu diesen Substanzen wurden die glatten Muskelzellen mit L-NAME kokubiert.

In einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ bewirkte L-NAME eine geringfügige Steigerung der Proliferation. Dies könnte eine Bestätigung der oben genannten Vermutung darstellen (Abb. 11a, 11b), daß NO eine antiproliferative Wirkung entfalten kann.

Doch im weiteren Versuchsablauf zeigte sich, daß L-NAME keinerlei Einfluß auf die Zellproliferation in Gegenwart von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ besitzt, obwohl nachgewiesen wurde, daß durch $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ die NOS aktiviert und vermehrt NO produziert wird (Durante, Liao & Schafer 1995).

Cyclosporin A, welches einen hemmenden Einfluß auf die Zellproliferation glatter Muskelzellen hat, zeigt in Kombination mit L-NAME jedoch eine verstärkte Abnahme der Zellantwort (Abb. 10). Dies könnte bedeuten, daß CSA die Wirkung von L-NAME entweder antagonisiert, oder eine vermehrte NO-Produktion über NOS-Aktivierung anregt. Dieser Effekt wurde jedoch nur bei $\text{IL-1}\beta$ beobachtet.

Dieses Ergebnis konnte jedoch nicht reproduziert werden. In den Abbildungen 0a und 10b wird dies durch die große Streuung der einzelnen Experimente verdeutlicht, was nur allgemeine Aussagen erlaubt. Wird $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$ zusammen mit CSA inkubiert, zeigt sich eine deutliche Verringerung der Zellantwort. Durch Zugabe von L-NAME zu beiden Zytokinen erhöht sich die Proliferationsrate wieder. Daraus wäre zu folgern, daß NO einen wesentlichen Beitrag zur Proliferationshemmung glatter Muskelzellen leistet. Will man diese Aussage auf die klinische Situation übertragen, so scheint dieser Einfluß lediglich auf den Zeitraum der akuten Phase der Transplantatabstoßung begrenzt zu sein. Wie in der Literatur beschrieben, erfährt die Zelloberfläche glatter Muskelzellen bei chronischer Exposition von Entzündungsmediatoren eine Modulation (Morisaki et al 1993), so daß $\text{TNF}\alpha$ weiterhin proliferativ wirkt, was letztendlich zum Organverlust beitragen kann.

4.4. Besteht ein Synergismus zwischen den einzelnen Zytokinen ?

Die chronische Transplantatabstoßung stellt ein Prinzip einer permanenten Entzündungsreaktion dar. Hierbei werden verschiedene Zytokine freigesetzt, die miteinander in Wechselwirkung treten und verschiedene intrazelluläre Mechanismen und Signalwege anschalten bzw. beeinflussen können. In dieser Arbeit wurde nun die Frage gestellt, inwieweit die untersuchten Zytokine synergistisch und/oder additiv auf glatte Muskelzellen wirken. Gibt es einen Synergismus oder haben diese Zytokine einen hemmenden Einfluß auf das Wachstum der glatten Muskelzellen?

Hancock (1993) und Loppnow (1994) wiesen in ihren Arbeiten nach, daß 16 Wochen nach einer Transplantation der Einfluß von Endothelin im Spenderendothel vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert werden. Parallel dazu zeigte sich auch eine erhöhte Konzentration von IL-6 und TNF α im Patientenserum (siehe Punkt 1.3.).

Es ist also anzunehmen, daß durch IL-6 und TNF α intrazelluläre Mechanismen angeschaltet werden, die ebenfalls auch Auswirkungen auf die Zelloberflächenbeschaffenheit haben könnten. Wie das Beispiel zeigt, reagierten Zellen auf Endothelin mit der gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen.

Wenn diese Vorgänge auch bei glatten Muskelzellen stattfinden, läßt sich vielleicht erklären, warum Endothelin, welches unter physiologischen Bedingungen schwach an MSMC bindet, verstärkt an diese Zellen bindet und somit zur Proliferationssteigerung beiträgt (Bonin, Leadley & Erickson 1993). Eine stärkere Bindung des Endothelins an glatte Muskelzellen erfolgte, wenn diese mit EGF, PDGF oder bFGF vorbehandelt wurden. Es könnte daher vermutet werden, daß zwischen diesen Zytokinen, die bei einer Entzündungsreaktion ausgeschüttet werden, ebenfalls ein Synergismus besteht.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bestätigen teilweise diese Vermutungen. Abbildung 9b zeigt zum Beispiel die Kombination von IL-1 mit TNF α . Es zeigt sich eine Steigerung der Proliferationsrate um 75% gegenüber der Kontrolle. Das entspricht einem Zuwachs von ca. 45% gegenüber TNF α und ca. 40% gegenüber IL-1 allein (Abb. 6). Beachtenswert ist auch der Synergismus zwischen Endothelin und IL-2 (Abb. 9c).

Hier konnte eine Steigerung der Proliferation um 5% (Abb. 6 und Abb. 9) gegenüber Endothelin (nur Eth) und ca. 20% gegenüber IL-2 allein beobachtet werden.

Wie bei Bonin, Leadley & Erickson (1993) schon angedeutet, könnte dies darauf zurückzuführen sein, daß Endothelin und andere Substanzen eine Modulation der Zelloberfläche oder Rezeptordichte (Morisaki et al. 1993) IL-2 aktivierter Blutzellen bewirkt (Hancock et al. 1993).

4.5. Welchen Einfluß haben Genistein oder Staurosporin auf die zytokinvermittelte Zellproliferation?

Wie bereits oben beschrieben, hemmen Genistein und Staurosporin die Zellproliferation um bis zu 90 % (Abb. 7a, 7b).

Humane glatte Muskelzellen wurden zuerst Genistein bzw. Staurosporin vorinkubiert und dann mit den verschiedenen Zytokinen inkubiert. Trotz des hemmenden Einflusses von Genistein wirkte IL-6 und TNF α eine geringe Proliferation glatter Muskelzellen (Abb. 8). Bei Staurosporin, einem Hemmer der PKC zeigte sich wie erwartet eine starke Hemmung des Wachstums. Jedoch scheint hier TNF α die Blockade der PKC durchbrochen zu haben. Es resultierte in einer Steigerung der Proliferation um durchschnittlich 90% gegenüber der Staurosporin-Kontrolle.

Wurden die Zellen jedoch zuvor mit den Zytokinen inkubiert und dann mit den Blockern der PKC bzw. TK zusammengebracht, erhielt man ein ganz anderes Bild. In allen Fällen zeigte sich eine starke Hemmung der Proliferation um bis zu 90% gegenüber der jeweiligen Kontrolle.

Hunter & Cooper (1985), Chang & Geahlen (1992), Punt (1992) und Schwartz & Liaw (1993) haben nachgewiesen, daß die dTK eine wichtige Komponente intrazellulärer Signalwege darstellt und Semenchuk & Di Salvo (1993) beschrieben dasselbe von der PKC, was die eigenen Ergebnisse bestätigt. Vermutlich wird durch TNF α und IL-6 ein anderer Signalweg beschritten, der unabhängig von der PKC bzw. TK arbeitet. Während die PKC und TK blockiert sind, könnten IL-6 und TNF α

intrazelluläre Signalwege einschalten, die dazu führen, die Zellproliferation in Gang zu halten. Das „wie“ ist derzeit noch nicht bekannt.

Auf der anderen Seite werden durch Zytokine die TK und die PKC, die auf der Zelloberfläche gelegene Zytokinrezeptoren so sensibilisiert bzw. vermehrt exprimiert, so daß ein Eingriff in diese Systeme durch Staurosporin und Genistein dieses „labile“ Gleichgewicht empfindlich stören kann. Das würde bedeuten, daß entweder Phosphorylierungsvorgänge im Cytoplasma zum Erliegen kommen und entsprechende Rezeptoren auf der Zelloberfläche beeinflußt werden. Möglicherweise geschieht dies durch Konformationsänderung der aktiven Zentren auf molekularer Ebene. Diese Mechanismen könnten eine mögliche Erklärung für den anti-proliferativen Effekt von Staurosporin und Genistein auf aktivierte glatte Muskelzellen sein.

4.6. Der Einfluß von Endothelzellüberständen mit und ohne $\text{TNF}\alpha$ auf die Proliferation glatter Muskelzellen

Endothelzellen und glatte Muskelzellen halten sich unter physiologischen Bedingungen die Proliferation und Migration in einem gewissen Gleichgewicht (Häyry et al. 1986).

Das heißt, die gegenseitige Beeinflussung beider Zellsysteme garantiert die Durchgängigkeit des Gefäßlumens. Ist dieses Gleichgewicht gestört, wie bei der chronischen Transplantatabstoßung zu beobachten ist, kommt es zu einer Lumeneinengung und somit zu einem Endeffekt zu einer Mangelversorgung des betreffenden Organs mit Sauerstoff und Nährstoffen. Dies bedeutet in letzter Konsequenz den Untergang des betreffenden Organs (Robertson & Khairallah 1973).

In den Experimenten zu dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob und inwieweit Endothelzellen und glatte Muskelzellen miteinander in Wechselwirkung treten. Hierzu wurden nicht vorherbehandelte sowie mit $\text{TNF}\alpha$ konditionierte Medienüberstände von aktivierten Endothelzellen mit glatten Muskelzellen inkubiert.

Während ein 1%iger Überstand (\pm TNF α) die Proliferation um 8% (ohne TNF) bzw. 25% mit TNF hemmte (nicht gezeigt), reduzierte ein 10%iger Endothelzellüberstand (\pm TNF α) die Rate um ca 20%. Eine mögliche Folgerung daraus wäre, daß Stoffwechselprodukte von Endothelzellen (EC) glatte Muskelzellen in ihrer Proliferation hemmen können. Dieser Effekt wird deutlich erhöht, wenn ein 10%iger Überstand verwendet wird. Möglicherweise sezernieren die Endothelzellen verschiedene Mediatoren in das Kulturmedium, die diese Hemmung verursachen. Werden die EC jedoch mit TNF α vorinkubiert, so werden vermehrt Mediatoren ins EC-Medium sezerniert, die eine verstärkte Proliferationshemmung verursachen, wenn dieser aktivierte Überstand den glatten Muskelzellen appliziert wird.

Estrada et al. (1995) haben die Wirkung von TNF α auf glatte Muskelzellen boviner Herkunft (BCSMC) untersucht. Die BCSMC wurden bei verschiedenen TNF α -Konzentrationen (2-100 ng/ml) über 8-72 Stunden getestet. Bei jeder Konzentration bzw. zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung wurde eine Erhöhung der NO-Produktion von BCSMC festgestellt. Thomae et al. (1996) zeigte in einer Kokultur von glatten Muskelzellen und Endothelzellen aus Rattenarterien, daß durch TNF α aktivierte glatte Muskelzellen NO freigesetzt wird, was auf Endothelzellen zytotoxisch wirkt. Wenn diese Ergebnisse auf humane Gefäßzellen übertragbar wären, könnte eine durch TNF α gesteigerte NO-Freisetzung der Endothelzellen ein Grund für die antiproliferative Wirkung von stimulierten Überständen auf glatte Muskelzellen sein.

Die Abbildung 10 zeigt ein von diesen Ergebnissen abweichendes Verhalten der glatten Muskelzellen. TNF α scheint auf Glattmuskelzellen trotz des hemmenden Einflusses von EC-Überständen einen synergistischen proliferativen Effekt zu haben. Dieselbe Wirkung wurde beobachtet, wenn Überstände verwendet wurden, die vorher mit TNF α aktiviert wurden. Wie in der Literatur beschrieben, sezernieren Endothelzellen während der Entzündungsreaktion vermehrt Endothelin, welches bekanntlich einen synergistischen proliferativen Effekt auf HSMC hat. Estrada (1995) stellte eine Erhöhung der NO-Produktion bei BCSMC boviner Herkunft fest, die mit verschiedenen Konzentrationen von TNF α inkubiert wurden. Möglicherweise ist

dies auch ein Fall, womit sich der antiproliferative Effekt auf HSMC bei Inkubation mit EC-Überständen erklären ließe.

Wie erklärt sich aber das vermehrte Wachstum von HSMC nach Zugabe von $\text{TNF}\alpha$ aktivierten EC-Überständen und gleichzeitiger $\text{TNF}\alpha$ Stimulation?

Vermutlich reduzierten EC Stickoxid (NO) und die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ auch erhöht Endothelin. Wird ein aktivierter Überstand mit HSMC inkubiert, und HSMC zusätzlich mit $\text{TNF}\alpha$ angeregt, so tritt vermutlich der oben beschriebene Synergismus zwischen $\text{TNF}\alpha$ und Endothelin auf. Das von den EC sezernierte NO wird teilweise oder vollständig antagonisiert und der proliferative Effekt der Kombination $\text{TNF}\alpha$ /Endothelin tritt verstärkt auf. Es könnte dies eine Erklärung dafür sein, daß trotz der Gegenregulation der endothelialen NO-Produktion die Proliferation der HSMC während des chronischen „Entzündungsvorganges“ der Abstoßungsreaktion überhand nimmt und im Endeffekt zum Organversagen durch Gefäßverschluß führt.

4.7. Schlußfolgerung

TNF α scheint bei der chronischen Abstoßungsreaktion eine herausragende Rolle zu spielen. Erstens durch seinen starken proliferativen Effekt auf humane glatte Muskelzellen und zweitens durch seinen Einfluß auf die Oberflächenbeschaffenheit bzw. seine Beeinflussung an der Zelloberfläche gelegener Rezeptoren.

Diese Rezeptoren scheinen wichtige intrazelluläre Signalwege zu enthalten, die unter anderem auch für die Proliferation verantwortlich zeichnen. In dieser Arbeit scheinen sich zumindest zwei mögliche Therapieansätze abzuzeichnen.

Erstens: Eine Erhöhung der NO-Produktion oder des Serumspiegels könnte im akuten Stadium der Abstoßungsreaktion den proliferativen Effekt des Endothelzellen-TNF α in Kombination mit CSA mildern.

Zweitens: Viele intrazelluläre Stoffwechselwege, die mit der Proliferation glatter Muskelzellen in engem Zusammenhang stehen, werden über die Proteinkinase C und die Tyrosinkinase vermittelt. Proliferationseffekte, die durch TNF α in der chronischen Phase der Transplantatabstoßung induziert und aufrecht erhalten werden, könnten durch eine mögliche Blockade dieser beiden Systeme eingeschränkt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Endstadium der chronischen Abstoßungsreaktion ist die sogenannte Transplantatarteriosklerose. Zu den dazwischenliegenden Mechanismen zählen die Aktivierung des HLA-Systems und die unkontrollierte Induktion und Freisetzung von Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-2 etc. (Cerami 1992). Dieser permanente Entzündungsreiz unterliegt nach Monaten und Jahren einer gewissen Autonomie (Tracey et al. 1988; Tracey et al. 1993). Die Freisetzung von Zytokinen aus T-Lymphozyten wird jedoch durch CSA, ein anerkanntes Immunsuppressivum, nur zeitweise unterdrückt (Granelli-Piperno, Inaba & Steinmann 1984). Gleichzeitig wird durch eine Sensibilisierung sowohl der glatten Muskelzellen der Gefäßmedia als auch der Endothelzellen der Intima eine Aufregulierung der Zytokinrezeptoren induziert und somit der CSA-Wirkung entgegengewirkt (Russel et al. 1995).

Die Rolle der glatten Muskelzellen sowie der Einfluß des Endothels im pathophysiologischen Geschehen bei chronischen Transplantatabstoßung ist nicht schwer faßbar und sollte in einem in vitro Ansatz näher charakterisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden humane glatte Muskelzellen aus der menschlichen Nabelschnur isoliert und unter Kulturbedingungen für diesen Zelltyp zunächst optimiert. Durch immunzytochemische Markierungen wurden die Zellen identifiziert. Die glatten Muskelzellen wachsen zu einem konfluenten Monolayer und zeigten bei regelmäßiger Subkultivierung eine exponentielle Wachstumsphase. In anschließenden Experimenten wurden diese Zellen verschiedenen Entzündungsmediatoren ausgesetzt und die Proliferationsrate mit Hilfe des [^3H]-Thymidineinbaues bestimmt. Zur Anwendung kamen Endothelin-1, Interleukine und Tumornekrosefaktor α .

Die stärksten Wachstumsstimulatoren waren $\text{TNF}\alpha$ (2,5 ng/ml), IL-1 β (50 U/ml) und Eth (0,1 $\mu\text{g/ml}$). Die Wachstumsraten wurden um ca. +352% gegenüber der Kontrolle gesteigert. Mit $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 β in den gleichen Konzentrationen wurden auch additive Effekte gefunden.

Zur Beschreibung der intrazellulären Signalwege, die durch die Einwirkung der verschiedenen Substanzen aktiviert werden, wurden in einem weiteren Ansatz die

Proteinkinase C (PKC) durch Staurosporin sowie die Tyrosinkinase (TK) durch Genistein inhibiert.

Es konnte nachgewiesen werden, daß vorwiegend die PKC für die Induktion der Proliferation durch TNF α oder IL-1 verantwortlich ist.

Der Einfluß von Cyclosporin A (CSA) unter den Stimulationsbedingungen war nun von besonderem Interesse. Es zeigte sich keine deutliche Hemmung der zytokin-induzierten Proliferation durch CSA im Vergleich zur Kontrolle.

Da die Zellen im natürlichen Gewebeverband einer gegenseitigen Wachstumskontrolle unterliegen, wurde in einem zusätzlichen Ansatz Kulturüberstand von Endothelzellen, ebenfalls aus der Nabelschnur isoliert wurden, mit den glatten Muskelzellen inkubiert. Dieser Überstand wurde nach Tagen von Endothelzellen gewonnen und diente in Konzentrationen von 10% und 1% das Wachstum der glatten Muskelzellen. Wurden die Endothelzellen mit TNF α stimuliert (vorinkubierter Überstand), so hatte dieser Überstand eine ähnliche Wirkung auf glatte Muskelzellen. Am deutlichsten konnte in dieser Versuchsserie gezeigt werden, daß die glatten Muskelzellen für eine zusätzliche TNF α -Stimulation (2,5 ng/ml) sensibilisiert werden, wenn sie mit dem TNF α vorinkubierten Endothelzellüberstand versetzt wurden.

Die zelluläre Aktivierung durch Zytokine wird über die Proteinkinase C vermittelt. Cyclosporin A hat keine protektive Wirkung auf die zytokinvermittelte Zellaktivierung bei den untersuchten humanen glatten Muskelzellen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Adams DH, Wyner LR, Karnowsky MJ: Experimental graft arteriosclerosis. I. Immunocytochemical analysis of lesion development. *Transplantation* 56: 794-799 (1993).

Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Okawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262: 5592-5595 (1987).

Andreesen R, Scheibenbogen C, Brugger WB: Sekretion von TNF, IL-1 und IL-6 durch humane Monozyten/Makrophagen in Abhängigkeit von Zelldifferenzierung und Aktivierungsstimulus. Freiburg (1994).

Anggard E. Nitric Oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 343: 1199-1206 (1992).

Beckeler K, Löw-Friedrich I, Mandt N, Schöppe W, Weisensee D: Differential effects of immunosuppressive cyclosporin A and inhibitors of protein kinases on cytokin-induced cell proliferation of umbilical cord artery smooth muscle cells- the role of endothelial supernatants on TNF alpha effects. *Eur J Cell Biol* 69 (Suppl:42): 126 (1996).

Bevilaqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA: Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects of procoagulant activity and leucocyte adhesion. *Am J Pathol* 121: 394-403 (1985).

Bobik A, Gooms A, Miller JA, Mitchell A, Greenpulkel S: Growth activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 258: C408- C 415 (1990).

Bonin PD, Leadley RJ, Erickson LA: Growth factor-induced modulation of endothelin-1 binding to human smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharm* 22 : 125-127 (1993).

Calne RY, White DJG, Thiru S, Evans DB, Mc Master P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow B: Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 2: 1323 (1978).

Carrel AV: Als wesentlicher Risikofaktor für das Langzeitüberleben eines transplantierten Organs wird heute die Transplantatarteriosklerose angesehen. *Perspektive* 1: 14 (1994).

Cerami A: Inflammatory Cytokines. *Clin Immunol Immunopath* : 62-10 (1992).

Chang C & Geahlen R: Protein-tyrosinase inhibition: Mechanism-based discovery of antitumor agents. *J Nat Prod* 55: 1529-1560 (1992).

Chua BHL, Crebs CJ, Chua CC, Diglio CA: Endothelin stimulates protein synthesis in smooth muscle cells. *Am J Physiol* 262: E412- E416 (1992).

Crocker BP, Salomon DR: Morphologie of renal allograft. In: Tisher CC, Brenner BM (eds): *Renal pathology*, 1 2.vLippincott, Philadelphia, pp-1551 (1989).

Dausset J: The challenge of the early days of human histocompatibility. *Immunogenetics* 10: 1 (1980).

Decastello, : Über experimentelle Nierentransplantation. *Wien: Klinische Wochenschrift* 15: 1682 (1959).

Demetris AJ, Zerbe T, Banner B: Morphology of solid organ allograft arteriopathy: Identification of intimal cell proliferation. *Transplant Proc.* : 23667-3669 (1989).

Dubin D, Pratt RE, Dzau VJ: Endothelin, a potent vasoconstrictor, is a vascular smooth muscle mitogen. *J Vasc Med Biol* 1: 150- 154 (1989).

Durante W, Liao L, Schafer AI: Differential regulation of L-arginine transport and inducible NOS in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Phys* 268: H1158- H1164 (1995).

Eissner G, Kölch W, Mischak H, Bornkamm W, Holler E: Differential role of protein kinase C in cytokine induced lymphocyte-endothelium interaction in vitro. *Scand J Immunol* 40: 395-402 (1994).

Eldridge A: High performance liquid chromatography separation of soybean isoflavones and their glucosides. *J Chromatogr* 234: 494-496 (1982).

Erdei A, Spaeth E, Alsenz J: Role of C3b receptors in the enhancement of IL-2-dependent T-cell proliferation. *Mol Immunol* 21: 1215 (1984).

Estrada C, Gomez C, Martin C: Effects of TNF-alpha on the production of vasoactive substances by cerebral endothelial and smooth muscle cells in culture. *J Cereb Blood Flow Metab* 15: 920-928 (1995).

Geng Y, Wu Q, Hannon G: Protein kinase C activation inhibits cytokine induced nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Acta* 1223: 125-132 (1994).

Geraghty JG, Stoltenberg R L, Sollinger HW, Hullet DA: Vascular smooth muscle cells and intimal hyperplasia in chronic transplant rejection. *Transplant Proc* 62:502-509 (1996).

Granelli Piperino A, Inaba K, Steinmann RM: Stimulation of lymphokine release from T-lymphoblasts. Requirement for mRNA synthesis and inhibition by cyclosporin A. *A J Exp Med* 160: 1792 (1984).

Hamilton D: Alexis Carell and the 100 days of tissue transplantation. *Transplant Rev* 2: 1 (1988).

Hamilton D: Kidney Transplantation: a history. In: Morris PJ (ed): *Kidney transplantation* 3rd. Edn. Saunders, Philadelphia, pp 1-33 (1988).

Hancock W, Whitey W, Tullius S, Heemann U, Wasowska B, Balbwin W, Tilney N: Cytokines, adhesions molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation* 56: 643-650 (1993).

Häyry P, Mennander A, Yilmaz S, Ustinov J, Räisänen A, Miettinen A, Lautenschläger I, Lemström K, Bruggemann CA, Paavonen T: Towards understanding the pathophysiology of chronic rejection. *Clin Invest* 70: 780-790 (1992).

Häyry P: Regulation of class II MHC antigen. Expression and graft immunogenic potential. *Transplant Proc* XVIII, 1355-1358 (1986).

Hiritara Y, Tagaki Y, Fukuda Y, Marumo F: Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 78: 225-228 (1989).

Hume DM, Merrill JP, Thorn GW: Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. *J Clin Invest* 34: 327 (1955).

Hunter T & Cooper J: Protein tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 54: 897-930 (1985).

Jaboulay M: Greffe de reins au lieu coude par soudures arterielles et veineuses. *Lyon Med* 107: 575 (1905).

Kawahara Y, Kariya K, Fukumoto Y: Protein kinase C as both positive and negative regulator of proliferation of vascular smooth muscle cells. Int Agency RES Cancer (IARC) Sci Publ 92: 102-117 (1988).

Leszczynski D, Zhao Y, Yeagley TJ, Foegh ML: Direct and endothelial cell-mediated effect of cyclosporin A on the proliferation of rat smooth muscle cells in vitro. Am J Path 142: 149-155 (1993).

Lopponow H, LPS, rec IL-1 and smooth muscle cell IL-1 activate vascular cells by specific mechanisms. Pro Clin Biol Res 388: 309-321 (1994).

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. Biol Chem 193: 265-275 (1951).

Mandt N, Löw-Friedrich I, Beckeler K, Schöppe W, Weisensee D: Antiproliferative effects on human endothelial cells are enhanced by TNF alpha-prestimulated smooth muscle cell supernatants in a model of chronic allograft rejection. Eur J Cell Biol 69 (Suppl. 42): 137 (1996).

Mennander A, Tiisala S, Halttunen J, Yilmaz S, Paavonen T, Häyry P: Chronic rejection in rat aortic allografts. An experimental model for transplant arteriosclerosis. Thrombosis 11: 671-680 (1991).

Merril JP, Murrey JE, Harrison JH, Guild WR: Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. JAMA 160: 277 (1956).

Morisaki N, Xu QP, Koshikawa T, Saito Y, Yoshida S, Ueda S: Tumor necrosis alpha can modulate the phenotype of aortic smooth muscle cells. Scan J Clin and Lab Invest 53: 347-352 (1993).

Muegge K, Durum SK: Interleukin-1, inflammation and disease. Proc Natl Acad Sci USA 90: 1134-1137 (1993).

Murrey JE, Merrill JP, Harrison JH: Kidney transplantations between seven pairs of identical twins. *Ann Surg* 148: 343 (1958).

Noronha IL, Volker D, Rambašek M, Pomer S, Opelz G: Zytokine - Parameter bei Transplantatabstoßungsreaktionen. Abteilung für Transplantationimmunologie, Institut für Immunologie und Abteilung für Urologie, Universität Heidelberg, BRD (Abstract 1994).

Oemar BS, Yang Z, Lüscher TF: Molecular and cellular mechanism of atherosclerosis. *Curr Op Neph Hyp* 4:82-91 (1995).

Ogawara H, Akiyama T, Ishida J, Watanabe S, Suzuki K: A specific inhibitor of tyrosine protein kinase from *Pseudomonas*. *J Antibiot (Tokyo)* 39: 606-608 (1986).

Owens WM, Grisham MB: Cytokines increase proliferation of human intestinal smooth muscle cells: Possible role in inflammation-induced stricture formation. *Inflammation* 17, No.4 (1993).

Punt C: Regulation of haematopoietic cell function by protein tyrosin kinase encoding oncogenes, a review. *Leuk Res* 16: 551- 559 (1992).

Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York S. 196-197 (1993)

Robertson AL, Khairallah P: Arterial endothelial permeability and vascular disease. The „trapp door“ effect. *Exp Mol Pathol*: 18: 241-258 (1973).

Russel ME, Wallace AF, Hancock WW, Sayegh MH, Adams DH, Sibinga NES, Wyner LR, Karnowsky MJ: Upregulation of cytokines associated with macrophage activation in the Lewis to F344 rat chronic cardiac rejection model. *Transplantation* 59: 572-578 (1995).

Schwartz S, Liaw L: Growth control and morphogenesis in the development and pathology of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 21: 31-49 (1993).

Schwartz R, Dameshek W: Drug-induced immunological tolerance. *Nature* 183: 1682 (1959).

Seidel CL, White V, Wallace C, Amann J, Dennison D, Schildmeyer LA, Vu B, Allen JC, Navarro L, Eskin S: Effect of seeding density and time in culture on vascular smooth muscle cell proteins. *Am J Physiol* 245 (Cell Physiol 23): C235-C242 (1988)

Steuernagel C: Das Endothel: Eine der wichtigsten Grenzflächen des Organismus. *Aspekte im Gespräch* 1: 3-19 (1995).

Tracey KJ, Wie H, Monoghe KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, Beutler B, Cotran RS, Cerami A, Lowry SF: Cachectin/TNF induces cachexia, anemia and inflammation. *J Exp Med* 167: 1211-1227 (1988).

Taniguchi T: Cytokine – Struktur, Funktion und Regulation
Naturwissenschaftliche Rundschau 46. Jahrgang Heft 1 S. 7-12 (1993).

Thomae K, Joshi P, Davies P, Pitt B, Billiar T, Simmons R, Nakayama D: Nitric oxide produced by cytokine-activated primary artery smooth muscle cells is cytotoxic to cocultured endothelium. *Surgery* 119: 61-66 (1996).

Vierbuchen M: Transplantation und Abstoßungsreaktion. *mta-Serie* (8) Folge 23: 1130-1141 (1993).

Vigne P, Lopez-Farre A, Frelin C: Na⁺-K⁺-Cl²⁻-cotransporter on brain capillary endothelial cells. Properties and regulation by endothelins, hyperosmolar solutions calyculin A. *J Biol Chem* 269: 19925-19930 (1994).

Voronoy YY: Sobre el bloqueo del aparato del hombre en algunas formas de intoxicación por el sublimado y sobre la transplatación del riñón cadavérico como método de tratamiento de la nefrosis crónica secundaria a aquella intoxicación. *El Siglo Médico* 97 (4293): 296 (1936).

Weisensee D, Mandt N, Beckeler K, Schöppe W, Löw-Friedrich I: Evidence for involvement of endothelial cell products in sensitizing human smooth muscle cells for TNF α induced proliferation. A model for chronic allograft rejection. *Eur J Cell Biol* 69 (Suppl 42): 144 (1996).

Weisensee D, Mondorf U, Ostermann M, Lenz T: Koadministration von Angiotensin II und Endothelin führt zur Antiproliferation an kultivierten humanen Glattmuskelzellen aus verschiedenen Organen. *Nieren- Hochdruckkrankh* 26:14-20 (1997).

Wrenn WW: Transforming growth factor beta: Signal transduction via protein kinase C in cultured embryonic smooth muscle cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 29A: 73-78 (1993).

Wüthrich RP: Nierentransplantation: Grundlagen, Vor- und Nachsorge, Langzeitüberwachung. Zweite überarbeitete Auflage. Springer (1996).

Yasushi F, Haruaki N, Toshikazu O, Yoshihiro U, Tomoh M: Suppression of Endothelin-1-induced mitogenic responses of human aortic smooth muscle cells by Interleukin-1 β . *J Clin Invest* 95: 2247-2428 (1995).

Yin TC, Tsang MLS, Yasukawa T, Kishimoto T, Yang YC: Involvement of L-16 signal transducer gp 130/IL-1- mediated signal transduction. *J Immunol* 151: 2555-2561 (1993).

7. ANHANG

Zusammenstellung der Ergebnisse aus den einzelnen kombinierten Proliferationsmessungen (Thymidineinbau). Im Falle einer Vorinkubation wird die Testsubstanz der Versuchsbedingung zusätzlich eingegeben. Die Angaben der Proliferationsänderung sind als Pfeile in der letzten Spalte dargestellt; die jeweilige Kontrolle ist in der ersten Spalte aufgelistet.

Die zu den Tabellen gehörenden Abbildungen sind genannt; dort finden sich auch die jeweilige Anzahl der durchgeführten Experimente.

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
MCDB	—	TNF	↑
MCDB	—	Eth	↑
MCDB	—	IL-1	↑
MCDB	—	IL-2	↑
MCDB	—	IL-6	—

Abb.6

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
MCDB	—	St 10 nmol/l	↓
MCDB	—	St 50 nmol/l	↓↓

Abb. 7a

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
MCDB	—	G1 $\mu\text{g/ml}$	—
MCDB	—	G10 $\mu\text{g/ml}$	↓
MCDB	—	G15 $\mu\text{g/ml}$	↓
MCDB	—	G50 $\mu\text{g/ml}$	↓↓

Abb. 7b

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
MCDB	—	CSA 0,1ng/ml	↓
MCDB	—	CSA 1ng/ml	↑
MCDB	—	CSA 10ng/ml	—
MCDB	—	CSA 20ng/ml	—
MCDB	—	CSA 40ng/ml	↓↓
MCDB	—	CSA 80ng/ml	↓↓
MCDB	—	CSA 100ng/ml	↓↓
MCDB	—	CSA 150ng/ml	↓↓

Abb. 7c

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
St 10 nmol/l	St 10 nmol/l	IL-1	↓
St 10 nmol/l	St 10 nmol/l	IL-2	—
St 10 nmol/l	St 10 nmol/l	IL-6	↓↓
St 10 nmol/l	St 10 nmol/l	Eth	↓
St 10 nmol/l	St 10 nmol/l	TNF α	↑

Abb.8a

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
G 15 µg/ml	G 15 µg/ml	IL-1	—
G 15 µg/ml	G 15 µg/ml	IL-2	—
G 15 µg/ml	G 15 µg/ml	IL-6	↑
G 15 µg/ml	G 15 µg/ml	Eth	↓
G 15 µg/ml	G 15 µg/ml	TNFα	↑

Abb. 8b

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
CSA 10ng/ml	CSA 10ng/ml	IL-1	↓↓
CSA 10ng/ml	CSA 10ng/ml	IL-2	—
CSA 10ng/ml	CSA 10ng/ml	IL-6	—
CSA 10ng/ml	CSA 10ng/ml	Eth	↓
CSA 10ng/ml	CSA 10ng/ml	TNFα	—

Abb.8c

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
TNFα 2,5ng/ml	TNFα 2,5ng/ml	IL-1	↑
TNFα 2,5ng/ml	TNFα 2,5ng/ml	CSA 0,1	↓
TNFα 2,5ng/ml	TNFα 2,5ng/ml	CSA 1	↓
TNFα 2,5ng/ml	TNFα 2,5ng/ml	CSA 10	—
TNFα 2,5ng/ml	TNFα 2,5ng/ml	G 1	↓
TNFα 2,5ng/ml	TNFα 2,5ng/ml	G 10	—
TNFα 2,5ng/ml	TNFα 2,5ng/ml	G 15	↓
TNFα 2,5ng/ml	TNFα 2,5ng/ml	St 10	↓
TNFα 2,5ng/ml	TNFα 2,5ng/ml	St 50	↓↓

Abb.9a

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
IL-1β 50 U/ml	IL-1β 50 U/ml	TNFα	↑
IL-1β 50 U/ml	IL-1β 50 U/ml	CSA 0,1	—
IL-1β 50 U/ml	IL-1β 50 U/ml	CSA 1	—
IL-1β 50 U/ml	IL-1β 50 U/ml	CSA 10	↓
IL-1β 50 U/ml	IL-1β 50 U/ml	G 1	↓
IL-1β 50 U/ml	IL-1β 50 U/ml	G 10	↓
IL-1β 50 U/ml	IL-1β 50 U/ml	G 15	↓
IL-1β 50 U/ml	IL-1β 50 U/ml	St 10	↓
IL-1β 50 U/ml	IL-1β 50 U/ml	St 50	↓↓

Abb.9b

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
IL-2 50 U/ml	IL-2 50 U/ml	TNF α	↑
IL-2 50 U/ml	IL-2 50 U/ml	Eth	↑
IL-2 50 U/ml	IL-2 50 U/ml	IL-1	—
IL-2 50 U/ml	IL-2 50 U/ml	IL-6	—
IL-2 50 U/ml	IL-2 50 U/ml	CSA 0,1	—
IL-2 50 U/ml	IL-2 50 U/ml	CSA 1	—
IL-2 50 U/ml	IL-2 50 U/ml	CSA 10	↓
IL-2 50 U/ml	IL-2 50 U/ml	G 1	↓
IL-2 50 U/ml	IL-2 50 U/ml	G 10	↓
IL-2 50 U/ml	IL-2 50 U/ml	G 15	↓↓
IL-2 50 U/ml	IL-2 50 U/ml	ST 10	—
IL-2 50 U/ml	IL-2 50 U/ml	ST 50	↓

Abb. 9c

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
IL-6 50 U/ml	IL-6 50 U/ml	CSA 0,1	↑
IL-6 50 U/ml	IL-6 50 U/ml	CSA 1	—
IL-6 50 U/ml	IL-6 50 U/ml	CSA 10	↓
IL-6 50 U/ml	IL-6 50 U/ml	G 1	—
IL-6 50 U/ml	IL-6 50 U/ml	G 10	↓↓
IL-6 50 U/ml	IL-6 50 U/ml	G 15	↓↓
IL-6 50 U/ml	IL-6 50 U/ml	ST 10	—
IL-6 50 U/ml	IL-6 50 U/ml	ST 50	↓↓

Abb.9d

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
Eth 0,1 μ g/ml	Eth 0,1 μ g/ml	IL-1	↑
Eth 0,1 μ g/ml	Eth 0,1 μ g/ml	IL-2	—
Eth 0,1 μ g/ml	Eth 0,1 μ g/ml	IL-6	—
Eth 0,1 μ g/ml	Eth 0,1 μ g/ml	CSA 0,1	—
Eth 0,1 μ g/ml	Eth 0,1 μ g/ml	CSA 1	—
Eth 0,1 μ g/ml	Eth 0,1 μ g/ml	CSA 10	—
Eth 0,1 μ g/ml	Eth 0,1 μ g/ml	G 1	↓
Eth 0,1 μ g/ml	Eth 0,1 μ g/ml	G 10	↓
Eth 0,1 μ g/ml	Eth 0,1 μ g/ml	G 15	↓↓

Abb.9e

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
MCDB	—	IL-1	↑
MCDB	—	CSA 10ng/ml	—
MCDB	—	N	↑
MCDB	—	ILC	↓
MCDB	—	ILN	↑
MCDB	—	INC	↓
MCDB	—	NC	—

Abb.10a

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
MCDB	—	TNF α	↑
MCDB	—	CSA 10ng/ml	—
MCDB	—	N	—
MCDB	—	TC	—
MCDB	—	TN	↑
MCDB	—	TNC	↓
MCDB	—	NC	↑

Abb. 10b

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
MCDB	MCDB	K/T	↑
ECM	ECM	Ü	—
ECM	ECM	Ü/T	↓
MCDB	—	ECM	↓
ECM	ECM	EC/T	↓
MCDB	—	HSM	↑
MCDB	—	HSM/T	↑

Abb. 11a

Kontrolle	Vorinkubation	Versuchsbed.	Proliferation
MCDB	MCDB	K/T	↑
ECM	ECM	Ü	↓
ECM	ECM	Ü/T	↓
ECM	ECM	Üa	↓
ECM	ECM	ÜaT	—

Abb. 11b

8. ABKÜRZUNGEN

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ak	Antikörper
AT II	Angiotensin II
BCSMC	Bovine Colon Smooth Muscle Cells
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cpm	counts per minute
CAM-1	Cell Adhesion Molecule-1
CSA / C	Cyclosporin A
CuSO ₄	Kupfersulfat
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EC	Endothelzellen
ECM	Endothelial Cell Medium
EC/T	Endothelzellmedium/TNF α
EDRF	Endothelin Derived Releasing Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
ETDA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eth	Endothelin
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Genistein
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSMC	Human Smooth Muscle Cells
HSM	Human Smooth Muscle Medium

HSM/T	Human Smooth Muscle Medium/TNF α
I-CAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule
IL-1	Interleukin-1 β
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
ILC	Interleukin/Cyclosporin A
ILN	Interleukin/L-NAME
INC	Interleukin/L-NAME/Cyclosporin A
iNOS	induzierbare Stickoxid Synthase
Kon / K	Kontrolle
K / T	Kontrollmedium/TNF α
α -LDL	α -Low Density Lipoprotein
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin-Methylester
MCDB-131	Kulturmedium entwickelt in der Abteilung Molecular and Cellular Developmental Biology, University of Colorado.
MHC	Major Histocompatibility Complex
N	N-Nitro-L-Arginin-Methylester
NC	N-Nitro-L-Arginin-Methylester/Cyclosporin A
NO	Nitric Oxid
NOS	Nitric Oxid Synthase
Na ₂ CO ₃	Dinatriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	Plateled Derived Growth Factor
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PKC	Proteinkinase C

rpm	Umdrehungen/min
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SMC	Smooth Muscle Cells
Stau/St	Staurosporin
TGF- β 1	Transforming Growth Factor- β 1
TK	Tyrosinkinase
T/N	TNF α /Nitric Oxid
TNC	TNF α /Nitric Oxid/Cyclosporin A
TNF α /TNF/T	Tumornekrosefaktor α
TRITC	Tetramethyl-Rhodaminyl-Isothiocyanat
Ü	Überstand
Üa	Überstand, aktiviert
ÜaT	Aktivierter Überstand zusätzlich mit TNF α inkubiert
Ü/T	Überstand/TNF α
x	Mittelwert

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Schöppe danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten im Labor des selbständigen Funktionsbereiches Nephrologie.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. I. Löw-Friedrich für die Überlassung des Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Dr. D. Weisensee möchte ich für die fruchtbaren Diskussionen und vielen Impulse und Ratschläge insbesondere in der experimentellen Phase herzlich danken.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich in dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Proliferationsstudien an humanen glatten Muskelzellen als mögliches Modell chronischer Abstoßungsreaktionen

in der Medizinischen Klinik IV, Funktionsbereich Nephrologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Schöppe mit Unterstützung durch Frau Priv. Doz. Dr. I. Löw-Friedrich ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch zur Zulassung der Promotion eingereicht, die obige vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, 1999



LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Klaus Franz Ludwig Beckeler
geb. am 04.11.1964 in Freising

Schulbildung

1971-1975

Grundschule Freising

1976-1985

Abitur am Camerloher-Gymnasium Freising
Leistungskurse in Biochemie & Mathematik

1985-1986

Grundwehrdienst

Berufsausbildung

1986-1989

Ausbildung zum Krankenpfleger an der
Ludwig-Maximilian-Universität

München/Großhadern mit Examensabschluß

1989-1990

Tätigkeit als Krankenpfleger auf einer
chirurgisch-urologischen Station der Univer-
sitätsklinik München/Großhadern

Studium

1990-1997

Studium der Humanmedizin an der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
Frankfurt/Main

1993

Aufnahme der Promotionsarbeit

1996

Beginn des Praktischen Jahres an der
Universitätsklinik Frankfurt am Main
Wahlfach: Urologie

1997

3. Staatsexamen

Feb. 1998-Juli 1999

AiP im Rot-Kreuz-Krankenhaus Wiesbaden

seit August 1999

Assistenzarzt Rot-Kreuz-Krankenhaus
Wiesbaden im Fachbereich Urologie

