

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Institut für Kardiovaskuläre Physiologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Rudi Busse

**Effekt von Statin-Entzug auf die Genexpression  
kultivierter glatter Muskelzellen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von

**Tu-Linh Ha**

**Saigon (Vietnam)**

Frankfurt am Main

2004

# Inhaltsverzeichnis

Deckblatt

Inhaltsverzeichnis..... S. I - III

I. Einleitung..... S. 1

1. Statine: Wirkmechanismus und Pharmakotherapie..... S. 1

2. Pharmakokinetik der Statine..... S. 3

3. Nebenwirkungen der Statine..... S. 3

4. Klinische Wirkung der Statine..... S. 4

5. Die pleiotropen Effekte der Statine..... S. 4

II. Zielsetzung der Arbeit..... S. 11

III. Material und Methoden..... S. 12

1. Materialien..... S. 12

2. Zellkultur..... S. 14

a) Glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte..... S. 14

b) Humane glatte Gefäßmuskelzellen..... S. 15

3. Dihydrodichlorofluorescein (DHDCF)-Oxidation..... S. 15

4. Northern-Blot-Analyse..... S. 16

a) RNA-Präparation..... S. 16

b) Präparation von cDNA-Restriktionsfragmenten..... S. 20

(i) Herstellung radioaktiver cDNA Sonden für MCP-1 und TF..... S. 20

(ii) Herstellung radioaktiver cDNA Sonde für Ratten MCP-1..... S. 21

c) Markierung von cDNA (DNA-Sonde).....	S. 21
d) Hybridisierung des RNA-Blots.....	S. 22
5. Western-Blot-Analyse.....	S. 23
a) Präparation der glatten Gefäßmuskelzellen zur immunochemischen Detektion der MAP-Kinasen.....	S. 23
b) Präparation von Membran- und Zytoplasmafraktion für Rac-Western.....	S. 23
6. Untersuchung der prokoagulatorischen Aktivität.....	S. 25
7. ELISA-Technik.....	S. 26
8. Statistik.....	S. 28
IV. Ergebnisse.....	S. 29
1. Effekt von Cerivastatin und Cerivastatin-Entzug auf die zelluläre Lokalisation von Rac.....	S. 29
2. Effekt von Cerivastatin auf die Expression der NADPH-Oxidase Untereinheit.....	S. 31
3. Effekt von Cerivastatin und Atorvastatin sowie Statin-Entzug auf die ROS-Produktion.....	S. 33
4. Effekt von Cerivastatin und Cerivastatin-Entzug auf die MAP-Kinase Aktivierung.....	S. 35
5. Effekt von Cerivastatin und Statin-Entzug auf die Expression von Tissue Faktor.....	S. 39
6. Effekt von Cerivastatin und Cerivastatin-Entzug auf die Expression von MCP-1.....	S. 42
7. Mechanismus des Statin-Entzuges auf die MCP-1 Expression in glatten Gefäßmuskelzellen.....	S. 45

V. Diskussion.....	S. 47
1. Der Einfluss von Cerivastatin auf die vaskuläre Homöostase.....	S. 47
2. Die Rolle des Statin-Entzuges für die Signaltransduktion glatter Gefäßmuskelzellen.....	S. 50
3. Die Bedeutung des Statin-Entzuges für die Klinik.....	S. 54
VI. Zusammenfassung.....	S. 55
VII. Summary.....	S. 57
VIII. Literaturnachweis.....	S. 59
IX. Danksagung.....	S. 73
X. Lebenslauf.....	S. 74
XI. Schriftliche Erklärung.....	S. 75

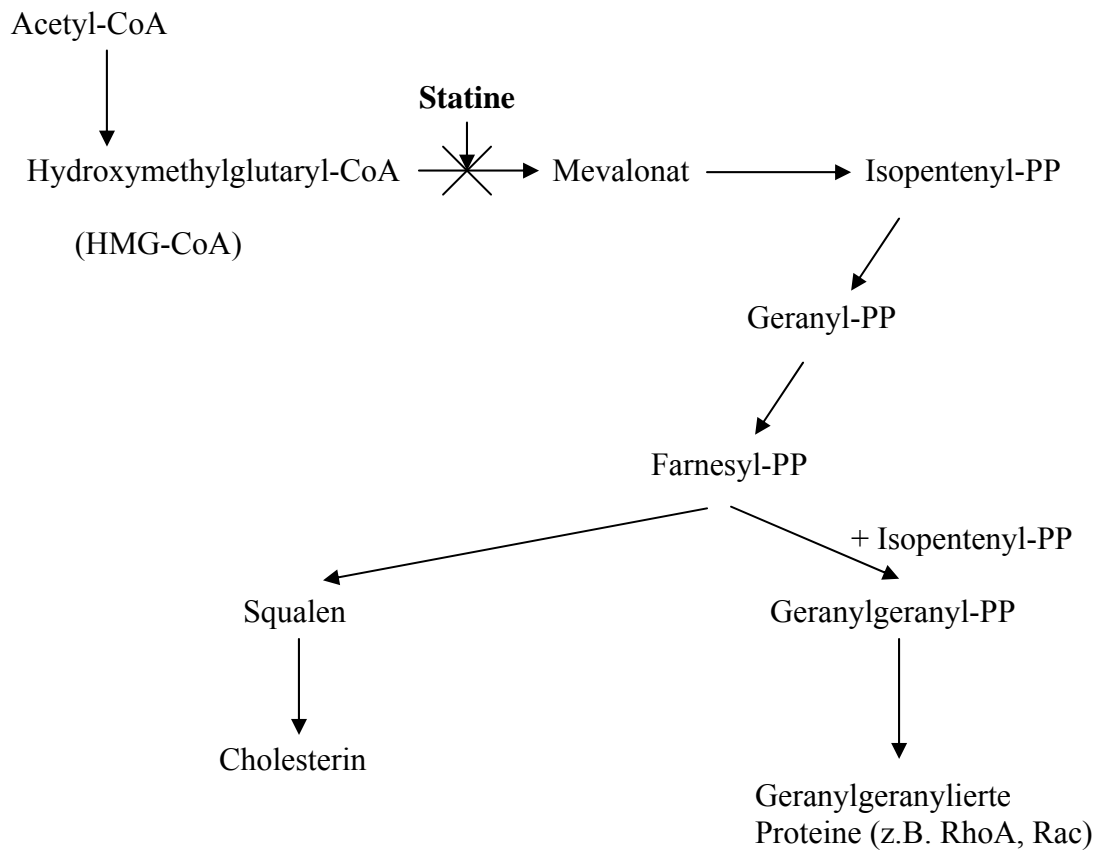
# **I. Einleitung**

## ***1. Statine: Wirkmechanismus und Pharmakotherapie***

Unter dem Begriff der Statine (HMG-CoA-Reduktasehemmer) werden Hemmstoffe der Cholesterin-Synthese zusammengefasst. Statine senken den Plasma-Cholesterin-Spiegel, indem sie kompetitiv das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese, die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), hemmen, was die Biosynthese von Mevalonat aus Hydroxymethylglutaryl-CoA verhindert (Abbildung 1).

Die „Statin-Geschichte“ begann 1987, als das erste Präparat der HMG-CoA-Reduktasehemmer, Lovastatin, das aus Pilzen gewonnen wurde, von der Food and Drug Administration (FDA) in den Vereinigten Staaten von Amerika die Zulassung für den Markt bekam.

Zu den Statinen, die mikrobiologischer Herkunft sind, gehören neben Lovastatin auch Pravastatin und Simvastatin. Fluvastatin, Atorvastatin und Cerivastatin sind hingegen synthetisch hergestellte Substanzen<sup>1</sup>.



**Abbildung 1: Vereinfachtes Schema der Cholesterinbiosynthese**

Statine (HMG-CoA-Reduktasehemmer) blockieren die Synthese von Mevalonat aus Hydroxymethylglutaryl-CoA. Hierdurch kommt es zu einer verringerten de-novo-Synthese von Cholesterin. Statine hemmen ebenfalls die Bildung verschiedener wichtiger Intermediate des Cholesterinstoffwechsels, wie zum Beispiel von Geranylgeranylpyrophosphat (Geranylgeranyl-PP), das für die Verankerung der kleinen GTPasen RhoA und Rac in die Plasmamembran benötigt wird.

## ***2. Pharmakokinetik der Statine***

Bei den zuerst eingeführten Hemmstoffen Lovastatin und Simvastatin handelt es sich um „Prodrugs“, aus denen nach oraler Applikation der eigentliche Wirkstoff in der Leber durch Aufspaltung des Lacton-Ringes entsteht. Im Fall von Pravastatin und anderen neueren Substanzen liegen die Pharmaka gleich in der Wirkform vor, also mit geöffnetem Lacton-Ring. Nach oraler Aufnahme werden die Statine enteral resorbiert. Die Pharmaka treten aus dem Pfortaderblut in die Leber, dem Ort der Cholesterin-Synthese, ein und entfalten dort ihre Wirkung. Bei Fluvastatin und Pravastatin erfolgt eine Anreicherung in den Hepatozyten durch einen aktiven Transportmechanismus, den andere Zellen nicht besitzen.

Die Metabolisierung von Lovastatin, Simvastatin, Atorvastatin und Cerivastatin erfolgt über Cytochrom P450(CYP)3A4. Fluvastatin wird über CYP2C9 metabolisiert, während die Biotransformation von Pravastatin offensichtlich nicht über den Cytochrom P450 Stoffwechselweg abläuft<sup>1</sup>.

## ***3. Nebenwirkungen der Statine***

Bei der Therapie mit Statinen werden Schädigungen von Leberzellen (Anstieg der Transaminasen im Serum) und der Skelettmuskulatur beobachtet. Es kommt in seltenen Fällen zur multifokalen Rhabdomyolyse, die über eine Myoglobinämie bis zum Nierenversagen führen kann. Diese schweren Nebenwirkungen treten vor allem in der Kombination der HMG-CoA-Reduktasehemmer mit triglyzeridsenkenden Pharmaka (Fibrate und Nicotinsäurederivate)<sup>2</sup>, Makrolid-Antibiotika<sup>3</sup> und Cyclosporin A<sup>4</sup> auf.

#### ***4. Klinische Wirkung der Statine***

Statine werden weltweit in der Behandlung der primären Hypercholesterinämie Typ IIa und IIb eingesetzt<sup>1:5:6:7</sup>. Neben der direkten Verminderung der Cholesterin-de-novo-Synthese hat die Senkung der Cholesterin-Konzentration in den Hepatozyten zur Folge, dass die hepatozytären LDL-Rezeptoren stärker exprimiert werden, wodurch LDL aus der Blutbahn eliminiert wird. Statine erreichen im Mittel eine Senkung des LDL-Cholesterins um etwa 35%, wobei jede Dosisverdopplung eine weitere LDL-Senkung um 7% bewirkt (7%-Regel)<sup>1</sup>. Eine konkomittierende Senkung der Triglyzeride um 10% und ein Anstieg des HDL-Cholesterins um 5% ergänzen das günstige Wirkspektrum. Klinische Studien an Patienten mit und ohne koronarer Herzkrankheit oder Hypercholesterinämie haben ergeben, dass HMG-CoA-Reduktasehemmer das relative Risiko eines Herzinfarktes je nach Patientengruppe bis zu 40% reduzieren<sup>1</sup>.

#### ***5. Die pleiotropen Effekte der Statine***

In einigen klinischen und experimentellen Studien zeigte sich, dass Statine auch bei Patienten mit normalem Cholesterin-Spiegel die arteriosklerotische Inzidenz senken<sup>8</sup>. Daraus lässt sich schließen, dass die Wirkung der Statine über ihre Effekte auf den Plasma-Cholesterin-Spiegel hinausgeht<sup>9</sup>. Es stellte sich heraus, dass Statine einen direkten Einfluss auf die Stabilität der arteriosklerotischen Plaques, die Entzündungsprozesse in den Gefäßwänden, die Endothelfunktion, die Gerinnung sowie den „oxidativen Stress“ haben<sup>10</sup>. Diese Effekte werden als pleiotrope Wirkungen der Statine bezeichnet. Viele dieser Effekte der HMG-CoA-Reduktasehemmer lassen sich durch ihre Blockierung der Synthese von Intermediaten im Cholesterinstoffwechsel erklären, die eine bedeutende Rolle bei der Verankerung von einigen intrazellulären Signalmolekülen in der Plasmamembran spielen.

Wie eingangs erwähnt, hemmen Statine die Bildung von Mevalonat. Durch die Hemmung der Mevalonbiosynthese kommt es nicht nur zur Hemmung der Cholesterinbiosynthese, sondern



auch zur Unterdrückung der Bildung von Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und Farnesylpyrophosphat (FPP)<sup>11</sup>. Diese beiden Phosphorsäureester werden für die Verankerung von kleinen GTPasen aus der Ras-Familie in die Plasmamembran benötigt<sup>12</sup>, die für die Aktivität dieser Enzyme eine Voraussetzung ist. Zu der GTPase-Familie gehören unter anderem Rac, Ras und RhoA, die eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen<sup>13</sup>. Um in die aktive Form überzugehen, muss eine Translokation der GTPasen vom Zytoplasma in die Plasmamembran stattfinden. Diese Translokation benötigt FPP für Ras und GGPP für Rac und RhoA<sup>14-16</sup>. Statine verhindern somit die Isoprenylierung von Rac und RhoA, was eine Akkumulation von inaktivem Rac und RhoA im Zytoplasma zur Folge hat.

In einigen klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass Statine die endothelabhängige Relaxation verbessern, bereits bevor eine signifikante Reduktion des Plasma-Cholesterinspiegels beobachtet werden konnte<sup>17-19</sup>. Die endothelabhängige Relaxation wird vor allem durch die vaskuläre NO (Stickstoffmonoxid)-Bioverfügbarkeit bestimmt. NO hat einen zentralen Stellenwert in der vaskulären Homöostase und wird als das wichtigste „antiarteriosklerotische Prinzip“ in der Gefäßwand angesehen<sup>20</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass NO über die Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase Blutgefäße dilatiert<sup>21</sup> und sowohl adhäsions- und aggregationshemmend auf Leukozyten<sup>22</sup> beziehungsweise Thrombozyten<sup>23;24</sup> wirkt als auch hemmend auf die Proliferationsrate glatter Muskelzellen<sup>25</sup>. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine verminderte endothelabhängige Relaxation ein Risikofaktor für spätere kardiovaskuläre Erkrankungen wie Arteriosklerose und Hypertension ist<sup>26</sup>.

NO wird durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aus L-Arginin und Sauerstoff<sup>27</sup> im vaskulären Endothel gebildet. Statine erhöhen die NO-Bioverfügbarkeit, indem sie die Expression der endothelialen NO-Synthase steigern<sup>15;28</sup>. Dies geschieht dadurch, dass HMG-CoA-Reduktasehemmer die Geranylgeranylierung der GTPase RhoA hemmen, die die Bildung der NO-Synthase drosselt<sup>16</sup>. Dabei haben Statine keinen Einfluss auf die Transkription des

eNOS Gens<sup>15;16</sup>, sondern verlängern die Halbwertszeit der eNOS mRNA von 14 auf 27 Stunden<sup>16</sup>.

Der inhibitorische Effekt von RhoA auf die eNOS Expression konnte durch Studien bestätigt werden, die zeigten, dass die Hemmung von RhoA durch Clostridium botulinum C3 Transferase eine Erhöhung der eNOS Expression bewirkt<sup>16</sup>. Im Gegensatz dazu führt eine direkte Aktivierung von RhoA durch Escherichia coli CNF-1 zu einer Senkung der eNOS Expression<sup>16;29</sup>. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Funktion der membran-assoziierten GTPase RhoA als negativer Regulator der eNOS Expression.

Ein weiterer wichtiger Wirkmechanismus der HMG-CoA-Reduktasehemmer sind ihre antioxidativen Effekte<sup>10</sup>. Die positive Wirkung auf das Endothel lässt sich dadurch erklären, dass Statine die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxidanion ( $O_2^-$ ) und Hydroxylradikal ( $\bullet OH$ ) hemmen<sup>30</sup>, die vor allem in Endothelzellen und in der Adventitia der Arterienwand gebildet werden. ROS bewirken im Endothel eine Inaktivierung von NO und führen dadurch zu Nitrat-Toleranz, Vasokonstriktion und Hypertension<sup>31;32</sup>. Die endotheliale Dysfunktion ist dabei nicht nur durch die  $O_2^-$ -vermittelte Degradation von NO, sondern auch durch die negativen Effekte des Reaktionsproduktes von NO und  $O_2^-$ , Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), bedingt. Anders als  $O_2^-$  inaktiviert  $ONOO^-$  Proteine dauerhaft durch Thioloxydation und Tyrosinnitrierung.

Neben diesen Interaktionen mit dem NO-System stimulieren ROS direkt die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen sowie die Apoptose von Endothelzellen<sup>33-35</sup>. Sie führen auch zur Induktion proarteriosklerotischer Gene und destabilisieren die vaskuläre Matrix durch Induktion und Aktivierung von Matrixmetalloproteasen. Somit stellen ROS einen bedeutenden Risikofaktor für die Arteriosklerose dar<sup>38-41</sup>.

Obwohl die Lipidsenkung per se eine Reduzierung des vaskulären „oxidativen Stresses“ erreicht<sup>36;37</sup>, sind einige der antioxidativen Effekte der Statine cholesterinunabhängig. Einige

Studien konnten belegen, dass HMG-CoA-Reduktasehemmer die Stabilität der Angiotensin AT<sub>1</sub> Rezeptor mRNA verringern<sup>38;41</sup>. Dadurch wird die Angiotensin II-induzierte Produktion von ROS verhindert<sup>38;41</sup>. Angiotensin II bewirkt über den AT<sub>1</sub> Rezeptor die Aktivierung der kleinen GTPase Rac<sup>38</sup>, wodurch es zu deren Translokation vom Zytoplasma in die Plasmamembran kommt. Rac wiederum aktiviert die NADH/NADPH-Oxidase<sup>38</sup>, deren Aufgabe die ROS-Produktion, vor allem die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung, zu sein scheint<sup>42</sup>. Zur Enzymklasse der NADPH-Oxidasen gehören die wachstumsfaktorabhängige NADH-Oxidase, welche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bildet<sup>43;44</sup>, und die leukozytäre NADPH-Oxidase, die O<sub>2</sub><sup>-</sup> bildet<sup>45-47</sup>.

Neben Angiotensin II<sup>48-51</sup> führen auch Thrombin<sup>52</sup>, Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)<sup>51;53;54</sup> und oxidiertes LDL zu einer Stimulation der NADPH-Oxidase und konsekutiver ROS-Produktion. Dabei sind die NADPH-Oxidasen nicht die einzigen vaskulären ROS-Quellen. Lipoxigenase<sup>55;56</sup>, Cytochrom P450-Monooxygenasen<sup>57-59</sup>, NO-Synthase<sup>60;61</sup> und Xanthinoxidase<sup>62</sup> sind ebenfalls zur O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung in der Lage.

Die leukozytäre NADPH-Oxidase, ein sehr komplexes Enzym, besteht aus mehreren membranständigen und zytoplasmatischen Komponenten (Abbildung 2).

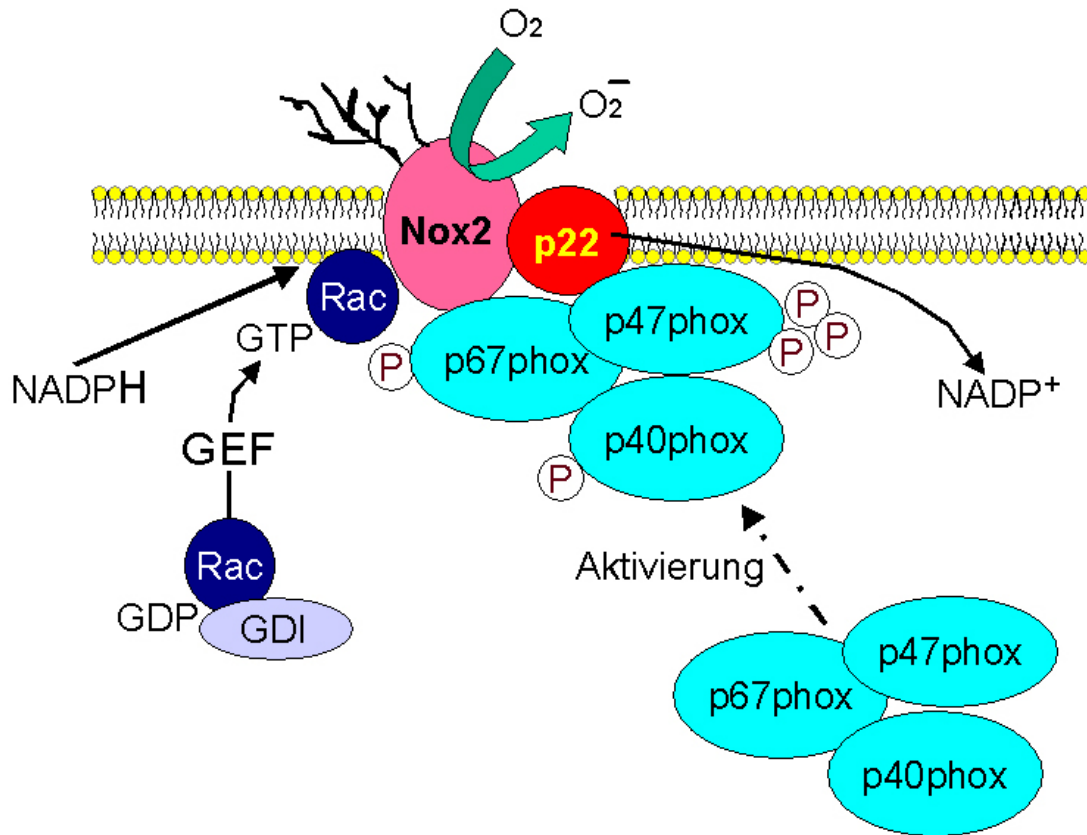
Die membranären Untereinheiten werden als p22<sup>phox</sup> und Nox2 (früher gp91<sup>phox</sup>) bezeichnet, die zusammen einen Cytochrom b558-Komplex bilden. Dabei ist zu beachten, dass die membranständige Untereinheit Nox2 der NADPH-Oxidase in Endothelzellen exprimiert wird<sup>63-65</sup>, während sie in glatten Gefäßmuskelzellen durch Nox1 ersetzt wird<sup>66;67</sup>.

Die zytosolischen Untereinheiten sind neben Rac p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> und p40<sup>phox</sup>.

Agonisten wie Angiotensin II induzieren die Aktivierung von Rac und führen zur Phosphorylierung und Translokation der zytoplasmatischen Untereinheiten der NADPH-Oxidase an die Plasmamembran. Es kommt dadurch zu einer Komplexbildung der zytosolischen mit den membranständigen Proteinen. Auf diese Weise ist es möglich, dass Elektronen von NADPH auf FAD und von dort auf Sauerstoff übertragen werden<sup>45;68</sup>. Das freiwerdende Proton wird möglicherweise durch Nox2, das als Protonenkanal diskutiert wird<sup>69</sup>,

aus der Zelle geschleust. Man vermutet, dass p40<sup>phox</sup> einen inhibitorischen Effekt auf die Enzymaktivität ausübt<sup>70</sup>.

# Die leukozytäre NADPH-Oxidase



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der leukozytären NADPH-Oxidase**

Durch entsprechende rezeptorvermittelte Stimuli kommt es zur Aktivierung von Rac und Proteinkinase C Isoformen. Letztere phosphorylieren die zytosolischen Untereinheiten p67<sup>phox</sup> und p47<sup>phox</sup> der NADPH-Oxidase, wodurch diese mit den membranständigen Untereinheiten interagieren können. Rac tritt ebenfalls mit den membranären Komponenten in Wechselwirkung. In einer aktivierten NADPH-Oxidase werden dann Elektronen von NADPH über die Häm-Komplexe in gp91<sup>phox</sup> auf Sauerstoff übertragen.

Die entstandenen Sauerstoffradikale sind in hohen Konzentrationen zytotoxisch, da sie Lipidperoxidation, Matrixdegeneration, DNA-Mutation, Zellalterung und Zelltod bedingen können<sup>71-73</sup>. Unter physiologischen Bedingungen spielen ROS jedoch eine größere Rolle bei der intra- und interzellulären Signaltransduktion. Vaskuläre Isoformen der leukozytären NADPH-Oxidase sind die Hauptquellen der ROS-Bildung in der Gefäßwand<sup>74-76</sup>.

In den Blutgefäßen sind dabei Enzyme vorhanden, die wiederum eine Neutralisierung von ROS bewirken<sup>77;78</sup>. Superoxiddismutasen (SOD) katalysieren die Dismutation von  $O_2^-$  zu  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  wird dann entweder durch die Katalase (CAT) in Wasser und Sauerstoff gespalten oder unter Oxidation von Glutathion (GSH) durch die Glutathionperoxidase (GPX) abgebaut, wobei Glutathiondisulfid (GSSG) und Wasser entstehen.

## **II. Zielsetzung der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit Statine die NADPH-Oxidase hemmen und welchen Einfluss sie dadurch auf die vaskuläre Genexpression und Funktion nehmen. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob das Aussetzen einer Statin- Behandlung mit einem Reboundeffekt verbunden ist und zur NADPH-Oxidase-abhängigen Aktivierung von Zellen führt.

Der Schwerpunkt der Arbeit liegt in der Analyse der Genexpression und Signaltransduktion kultivierter glatter Gefäßmuskelzellen von Mensch und Ratte.

### III. Material und Methoden

#### 1. Materialien

Glatte Gefäßmuskelzellen der menschlichen Aorta (h-VSMC: **h**uman **V**ascular **S**mooth **M**uscle **C**ells) wurden von der Firma Clonetics (Walkersville, USA) bezogen. Glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte (VSMC) wurden von der Aorta männlicher Wistar-Ratten isoliert, die von Charles River (Sulzbach, Deutschland) erworben wurden.

Minimal Essential Medium (MEM), MCDB 131-SF, MCDB 131-20% FCS, Rinder-Serumalbumin (BSA), Phosphat-Puffer-Saline (PBS), Trypsin, Penicillin und Streptomycin stammten von der Firma GIBCO Life Technology (Karlsruhe, Deutschland). Das fötale Kalberserum (FCS) war von Biochrom (Berlin, Deutschland) und die Zellkulturschalen von Falcon (Becton Dickinson). HEPES wurde von der Firma Serva (Heidelberg, Deutschland), PD98059 und SB203580 von Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden, Deutschland) bezogen. Cerivastatin wurde von Bayer AG (Leverkusen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Atorvastatin war ein Geschenk der Gödecke AG (Freiburg, Deutschland). Lovastatin war von Merck Sharp Dohme Inc. (Haar, Deutschland). Humanes  $\alpha$ -Thrombin (mit einer Thrombin-spezifischen Gerinnungsaktivität von 3261 U/mg) war bei Haemochrom Diagnostica (Essen, Deutschland) zu erhalten.

Das zur Detektion des humanen MCP-1 (**M**onocyte **C**hemoattractant **P**rotein-1) genutzte Restriktionsfragment aus dem Klon pXM-hJE34 wurde freundlicherweise von Dr. B.J. Rollins überlassen. Die Plasmide, die für die Gewinnung von Tissue Faktor cDNA-Fragment benötigt wurden, stammten von Dr. A. Bierhaus (Universität von Tübingen, Deutschland). Das radioaktive Nukleotid [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-Desoxycytidin-5'-Triphosphat wurde von Hartmann-Analytic (Braunschweig, Deutschland) und die denaturierte Lachsspermien-DNA von Boehringer (Mannheim, Deutschland) bezogen. Das DNA-Extraktions-Kit (Ready to Go<sup>®</sup> DNA Labeling



Kit), die Pst I-Lösung und die Nick-Säulen wurden von Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) erworben. Der REact<sup>®</sup>2-Puffer war bei GIBCO Life Technology (Karlsruhe, Deutschland) erhältlich. Die Nylonmembran (Pora blot Nylon) für den RNA-Transfer in der Northern-Blot-Analyse war von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Das DNA-Extraktions-Kit für Agarose-Gele stammte von Genomed (Bad Oeynhausen, Deutschland).

Die Nitrozellulose-Membran für den Protein-Transfer in der Western-Blot-Analyse wurde von Biorad (München, Deutschland) bezogen. Die monoklonalen Antikörper (Erst-Antikörper) gegen p38 Mitogen-Activated-Protein (MAP) Kinase und gegen ERK 1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase) wurden von New England BioLabs (Frankfurt am Main, Deutschland) erworben. Der monoklonale Anti-Rac Antikörper (Erst-Antikörper) war bei BD Transduction Laboratories zu erhalten. Die Peroxidase-konjugierten Zweit-Antikörper stammten von Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden, Deutschland). Für die Chemilumineszenz-Reaktion wurde das Enhanced Chemiluminescence (ECL) Kit von Amersham (Ismaning, Deutschland) bezogen.

Zur Untersuchung der prokoagulatorischen Aktivität wurde das chromogene Substrat S-2238 verwendet, das bei Haemochrom Diagnostica (Köln, Deutschland) erhältlich war. CaCl<sub>2</sub> war von Amersham (Ismaning, Deutschland).

Für die ELISA-Technik wurde ein kommerziell erhältliches ELISA-Kit von Assay Designs (Ann Arbor, USA) erworben.

Alle weiteren Substanzen, deren Herkunft nicht näher spezifiziert wurde, wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

## **2. Zellkultur**

### **a) Glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte**

Männliche Wistar-Ratten wurden mit Pentobarbital-Natrium (Nembutal<sup>®</sup>, Narcoren<sup>®</sup>) in einer Dosierung von 50 mg pro kg Körpergewicht narkotisiert und nach Eröffnung des Thorax mittels Herzkammerperforation ausgeblutet. Nach Entnahme der thorakalen Aorta und deren Durchspülung mit sterilem Puffer wurde der Aortenabschnitt mit serumfreiem Kulturmedium [serumfreies Minimal Essential Medium (MEM-SF) - Zusammensetzung: MEM, 50 µg/ml Streptomycin, 50 U/ml Penicillin, 2 mM L-Glutamin und 0,1% Rinder-Serumalbumin (BSA)] in einer Petrischale behandelt. Unter dem Mikroskop erfolgte die Präparation des Aortensegmentes vom umgebenden Fett- und Bindegewebe. Nach mechanischer Ablösung des Endothels mit Hilfe des Pinzettenschaftes wurde der endothelfreie Abschnitt in MEM-SF mit 3 mg/ml Kollagenase im Brutschrank bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Adventitia der Aorta mit Hilfe von kleinen Pinzetten entfernt. Nach Aufschneiden des Segmentes in Längsrichtung und Aufteilung in kleine Stücke wurden diese erneut in MEM-SF mit 3 mg/ml Kollagenase Typ I und 1 mg/ml Elastase für ein bis zwei Stunden inkubiert. Nach der enzymatischen Ablösung der glatten Muskelzellen wurden diese auch mechanisch durch mehrmaliges kräftiges Pipettieren abgelöst.

Die glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte wurden bei 100 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in serumhaltigem MEM [MEM-10% FCS (Fetal Calf Serum - fötales Kalberserum) - Zusammensetzung: MEM, 10% FCS, 50 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin] resuspendiert und auf Zellkulturschalen ausgesät. Das Medium MEM-10% FCS wurde alle zwei Tage ausgewechselt.

Bei einer Konfluenz der Zellen von 80-90% wurden diese passagiert. Dabei wurde das serumhaltige Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellkultur mit 5 ml Phosphat-Puffer-Saline (PBS) [Zusammensetzung: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] gewaschen. Nach Behandlung der Zellen mit 3 ml Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (Trypsin-

EDTA)-Lösung [Zusammensetzung: 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA] wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C für weniger als zwei Minuten inkubiert. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst. Die Zellsuspension wurde homogenisiert und in ein 15-ml-Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 8 ml MEM-10% FCS hinzugefügt und bei 1000 x g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Nach Abnahme des Überstandes, der verworfen wurde, wurden die Zellen in MEM-10% FCS resuspendiert und je nach Anzahl der Experimente auf verschiedene Zellkulturschalen verteilt. Für die Versuche wurden die konfluent gewachsenen Zellen noch für 24 Stunden in MEM-SF kultiviert. Bevor die Zellkulturen mit verschiedenen Substanzen stimuliert wurden, wurde das Medium ausgewechselt.

#### ***b) Humane glatte Gefäßmuskelzellen***

Humane glatte Gefäßmuskelzellen, die von der menschlichen Aorta stammten, wurden von der Firma Clonetics erworben. Die Behandlung dieser Zellen entsprach grundsätzlich derjenigen von glatten Muskelzellen der Ratte. Die einzige Ausnahme bestand darin, dass die Zellen anstatt mit MEM-SF beziehungsweise MEM-10% FCS mit MCDB 131-SF beziehungsweise MCDB 131-20% FCS inkubiert wurden. Die Behandlung vor der Stimulation war identisch mit der von VSMC.

### ***3. Dihydrodichlorofluorescein (DHDCF)-Oxidation***

Mit der Dihydrodichlorofluorescein-Oxidations-Methode wurde die Messung der gebildeten Sauerstoffradikale in humanen glatten Gefäßmuskelzellen (h-VSMC) durchgeführt.

h-VSMC wurden für den Versuch auf Glass-Plättchen in einer 24-Loch-Platte (Well) kultiviert. Die Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Kulturmedium (MCDB 131-SF mit 0,1% BSA) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium ausgewechselt und die Zellen entweder

mit Cerivastatin (100 nmol/l) oder mit Atorvastatin (10 µmol/l) für weitere 24 Stunden stimuliert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen dreimal mit M199 mit 0,1% BSA gewaschen. Der letzte Waschvorgang erfolgte mit MCDB 131-SF mit 0,1% BSA.

In Untergruppen wurde die Radikalbildung bei Statin-Entzug in den mit Statin-vorbehandelten, humanen glatten Gefäßmuskelzellen untersucht. Daher wurden die Zellen nach dem Waschen mit Kulturmedium nicht nochmals mit Cerivastatin oder Atorvastatin stimuliert. Bei den anderen Zellen, deren Radikalbildung unter Statin-Behandlung gemessen wurde, erfolgte erneut die Inkubation mit Cerivastatin (100 nmol/l) oder Atorvastatin (10 µmol/l).

In der Zwischenzeit wurde die Dihydrodichlorofluorescein(DHDCF)-Diacetat-Lösung (in DMSO gelöst) vorbereitet und auf die zu messenden Zellen gegeben. Diese wurden für 15 Minuten bei 37°C auf einer Wärmeplatte mit der Lösung inkubiert.

Kurz vor jeder Messung wurden die Zellen mit HEPES-Tyrode [Zusammensetzung: 1,8 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 2,7 mmol/l KCl, 0,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0,36 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mmol/l NaCl, 5 mmol/l Glukose, 10 mmol HEPES; pH 7.4] gewaschen.

Die Oxidation des Farbstoffes und die damit verbundene Fluoreszenz-Intensität von Dichlorofluorescein (DCF) wurden mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops (Zeiss) gemessen. Im Ergebnis wurde jeweils die Fluoreszenzänderung pro Minute über die ersten zehn Minuten der Inkubation dargestellt.

#### ***4. Northern-Blot-Analyse***

##### ***a) RNA-Präparation***

Mit der Northern-Blot-Analyse ist es möglich, mRNA (messenger Ribonukleinsäure) qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Dabei erfolgte nach Inkubation des entsprechenden Zellmaterials in Kulturmedium die Präparation von RNA in mehreren Schritten. Auf eine Lysierung und Homogenisierung des Zellmaterials folgten mehrere Extraktions- und Fällungsvorgänge, um die RNA von Proteinen und anderen Zellbestandteilen zu fraktionieren.

Zum Schluss wurde die gereinigte RNA mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und die Fraktionen mit entsprechenden Methoden detektiert.

Im Einzelnen:

Nach Inkubation der kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte oder der humanen glatten Gefäßmuskelzellen mit den jeweiligen Stimuli wurden die Medien-Überstände in den Zellkulturschalen abgenommen. Die Zellen wurden entweder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren, um an ihnen zu einem späteren Zeitpunkt die RNA-Präparation vorzunehmen, oder sofort weiterverarbeitet.

Die folgenden Arbeitsschritte - bis auf eine Ausnahme - erfolgten auf Eis, um der Degradation der RNA vorzubeugen.

Die Zellen wurden zunächst in den Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm mit 800  $\mu\text{l}$  Guanidinthiocyanat (GT)-Lösung [Zusammensetzung: 2 M Guanidinthiocyanat, 0,5% Laurosarcosyl, 25 mM Natriumcitrat] und 7  $\mu\text{l}$  Dithiotreitol (DTT) /ml GT behandelt. Das Lösungsgemisch konnte dann in den Kulturschalen verteilt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst werden. Anschließend erfolgten das Abkratzen der Zellen mit einem Zellschaber, die Homogenisierung und die Überführung in ein autoklaviertes 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß. In das Eppendorf-Gefäß wurden 80  $\mu\text{l}$  Natriumacetat-Lösung (2 M; pH: 4.0), 800  $\mu\text{l}$  wassergesättigtes Phenol (Aqua-Roti-Phenol<sup>®</sup>) und 160  $\mu\text{l}$  Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt und für 30 Sekunden gevortext. Anschließend konnte das 2-Phasen-Gemisch (obere Phase: Wasser, RNA - untere Phase: Phenol, Proteine, DNA) für 30 Minuten auf Eis gelegt werden. Nach der Inkubation erfolgte die Zentrifugation bei 13000 x g für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Durch die Zentrifugation fand eine Trennung der wässrigen Phase mit der in ihr gelösten RNA von der organischen Phase mit Proteinen und DNA statt. Damit das Phenol nicht ausfiel, wurde der nächste Aufarbeitungsschritt bei Raumtemperatur durchgeführt. Die obere wässrige Phase konnte vorsichtig abgenommen - dabei war zu beachten, dass die Interphase nicht mitpipettiert wurde -

und in ein neues 2-ml-Eppendorf-Gefäß überführt werden. Die Präzipitation der RNA erfolgte mit 1 ml Isopropanol (100%) über Nacht bei -20°C. Die restliche Phenol-Phase konnte zur späteren molekularbiologischen Untersuchung des enthaltenen Proteins bei 4°C aufbewahrt werden.

Am nächsten Tag wurde die RNA aufgetaut und bei 4°C für 30 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war es möglich, den Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig abzusaugen. Das zurückgebliebene Pellet konnte in 600 µl GT-Lösung gelöst und in ein neues autoklaviertes 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß überführt werden. Die Fällung der RNA fand erneut über Nacht bei -20°C mit 600 µl Isopropanol (100%) statt.

Am dritten Tag wurde die RNA wieder aufgetaut und bei 4°C für 30 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand konnte anschließend mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt werden. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml Ethanol 70% (hergestellt mit DEPC-H<sub>2</sub>O) gewaschen, für 10 Minuten in Eis inkubiert und bei 4°C für 30 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes mit Hilfe der Pumpe erfolgte das Trocknen des Pellets an der Luft, das dann für 15 Minuten in 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O bei 65°C gelöst wurde.

Die RNA-Konzentration in der Probe konnte dann photometrisch durch Extinktionsmessung bei 260 nm bestimmt werden. Um Verunreinigungen zu erkennen, wurde zusätzlich die Extinktion bei 280 nm durchgeführt. Der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> sollte bei 1,8 liegen. Nach der Extinktionsmessung war die Möglichkeit gegeben, die RNA entweder bei -80°C einzufrieren oder sofort wie folgt weiterzuverarbeiten:

Bevor die gereinigte RNA mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt werden konnte, fand ein Volumenausgleich zwischen den einzelnen Proben statt. Hierbei wurden die Proben mit entsprechenden Mengenangaben von DEPC-H<sub>2</sub>O und Prämix [Zusammensetzung: 60% deionisiertes Formamid, 30% Formaldehyd 37%, 10% 10x 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)-Puffer und 10 mg/ml Ethidiumbromid] verdünnt. Von der Gesamt-RNA waren 15µg RNA aufgetragen.

Die Proben wurden im Heizblock bei 65°C für 15 Minuten erhitzt und jeweils mit 2 µl Blaumarker [Zusammensetzung: 50% Glycerol, 0,8% Bromphenolblau, 0,8% Xylencyanol, 1 mM EDTA, DEPC-H<sub>2</sub>O] versetzt. In der Zwischenzeit konnte das Gel [Zusammensetzung: 1,44 g Agarose, 104,4 ml DEPC-H<sub>2</sub>O, 12 ml 10 x MOPS-Puffer, 3,6 ml Formaldehyd] für die Elektrophorese gegossen werden.

Für die elektrophoretische Auftrennung (bei 65 V 2-3 Stunden) war 1 x MOPS-Puffer [Zusammensetzung: 50 ml 10 x MOPS, 450 ml dest. H<sub>2</sub>O] [Zusammensetzung von 10 x MOPS: 20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA] als Laufpuffer geeignet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel kurz unter UV-Licht betrachtet, um anhand der gut sichtbaren 18S- und 28S-Banden die Gleichmäßigkeit der Auftragung zu überprüfen, und fotografiert.

Anschließend erfolgte der Transfer der aufgetrennten RNA vom Gel auf die Nylonmembran (Pora blot Nylon) mittels Kapillarblottechnik. Hierbei wurde das Gel zunächst auf eine Glasplatte gelegt, die mit zwei Lagen Whatman 3 MM-Papier eingewickelt waren. Die Platte befand sich über einen Behälter, der mit 20 x SSC [pH: 7; Zusammensetzung: 3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat] gefüllt war. Die Enden des Whatman-Papiers tauchten dabei in das Pufferreservoir ein. Die Ränder des Gels waren mit Röntgenfilmen abgedichtet. Die Nylonmembran wurde in Gelgröße zugeschnitten und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Über die Membran folgten zwei Lagen Whatman-Papier, ein Stapel Papierhandtücher und eine Glasplatte. Zum Beschweren konnte ein 2 kg schweres Gewicht verwendet werden. Der Transfer erfolgte für 24-48 Stunden bei Raumtemperatur. Während des Transfers wurde die RNA aus der Gelmatrix auf die Nylonmembran „geblottet“.

Nach 1-2 Tagen konnte die Transferapparatur abgebaut und die RNA auf die Nylonmembran (RNA-Blot) unter UV-Licht für zwei Minuten „gecrosslinked“ werden. Anschließend wurde die Membran bei 80°C für zwei Stunden zum weiteren Crosslinking gebacken.

## ***b) Präparation von cDNA-Restriktionsfragmenten***

### ***(i) Herstellung radioaktiver cDNA Sonden für MCP-1 und TF***

Die für die Northern-Blot-Analyse benötigte humane MCP-1-cDNA Sonde wurde durch Restriktionsverdau mit Pst I aus dem Plasmid-Klon pXM-hJE34 gewonnen.

Die für die Northern-Blot-Analyse notwendige TF-cDNA Sonde wurde aus Plasmiden, die das TF-cDNA-Fragment der Maus enthielten, mittels des Restriktionsenzym EcoR I hergestellt.

Hierbei wurde ein 100 µl-Ansatz mit 30 µl der Plasmid-haltigen Lösung, 10 µl REact<sup>®</sup>2-Puffer und 4 µl Pst I-Lösung beziehungsweise 4 µl EcoR I-Lösung angesetzt und für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Der Ansatz konnte dann mit 7 µl Blaumarker versetzt und auf ein 1,2%iges Agarose-Gel für die Elektrophorese aufgetragen werden. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer [Zusammensetzung von 50 x TAE-Stammlösung: 2 M Tris/Acetat, 50 mM EDTA]. Die Laufzeit der Gel-Elektrophorese betrug bei einer Spannung von 80-90 Volt etwa eine Stunde. Danach wurde das Gel für 15 Minuten in eine Ethidiumbromid-Lösung bei Raumtemperatur gelegt. Anschließend erfolgte unter UV-Licht das Herausschneiden des DNA-Fragmentes der gesuchten Größe mit einem Skapell.

Die weitere Aufarbeitung konnte mit einem kommerziell erhältlichen DNA-Extraktions-Kit für Agarose-Gele durchgeführt werden. Die DNA, die in dem Gel enthalten war, wurde unter Erwärmen mit einem Puffer in Lösung gebracht, an DNA-absorbierendem Material gebunden und mehrfach in speziellen Puffern gewaschen. Die DNA konnte dann in 50 µl TE-Puffer [Zusammensetzung: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA] gelöst werden. Um auf Reinheit zu prüfen, wurden 2 µl dieser Lösung erneut auf ein 1,8%iges Agarose-Gel aufgetragen, mittels Elektrophorese getrennt und detektiert.



### ***(ii) Herstellung radioaktiver cDNA Sonde für Ratten MCP-1***

Da für Ratten MCP-1 kein Plasmid zur Verfügung stand, wurde die cDNA Sonde mittels RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) hergestellt.

Hierfür wurde RNA aus stimulierten RSMC extrahiert. Die reverse Transkription konnte dann mit 4 µg RNA, 1 µg Oligo-dT und 0,5 U Superscript Reverse Transcriptase (GIBCO Life Technology) durchgeführt werden. Die Amplifikation des RT-PCR-Produktes erfolgte mit der PCR-Methode, wobei 5 µl cDNA in einer 50 µl PCR-Lösung verwendet wurden. Dem Denaturierungsschritt bei 95°C (fünf Minuten) folgten 38 Zyklen (95°C eine Minute, 56°C eine Minute, 72°C eine Minute). Der letzte Zyklus fand bei 72°C für sieben Minuten statt.

Der Primer hatte die folgende Sequenz: 5'-GAA GCC AGA TCT CTC TTC CT-3' (Basenpaare: 48-57), 5'-CTA GTT CTC TGT CAT ACT GG-3' (Basenpaare: 494-513).

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,3%iges Agarose-Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese getrennt. Danach konnte das Gel in eine Ethidiumbromid-Lösung bei Raumtemperatur gelegt werden. Anschließend erfolgte unter UV-Licht das Herausschneiden des cDNA-Fragmentes mit einem Skapell. Die DNA wurde dann mittels eines kommerziell erhältlichen Kit aus dem Gel extrahiert.

### ***c) Markierung von cDNA (DNA-Sonde)***

Für die Synthese des komplementären DNA-Stranges von cDNA und dessen radioaktiver Markierung stand ein kommerziell erhältliches Kit (Ready to Go<sup>®</sup> DNA Labeling Kit) zur Verfügung. Der komplementäre Strang war für die Hybridisierung des RNA-Blots notwendig. Mit dem radioaktiven Nukleotid [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-Desoxycytidin-5'-Triphosphat ([ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP; 30 µCi; spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol) wurde der neusynthetisierte DNA-Strang, der nun komplementär zur mRNA war, markiert. Die <sup>32</sup>P-markierte DNA-Sonde wurde mittels Gelfiltration (Nick-Säulen) von nicht eingebauten Nukleotiden getrennt. Die Radioaktivität der Sonde wurde schließlich mittels Szintillationcounter und Szintillationflüssigkeit gemessen.

#### *d) Hybridisierung des RNA-Blots*

Nach dem zweistündigen Backen der Nylonmembran (RNA-Blot) bei 80°C wurde diese zunächst mit einem Hybridisierungs-Puffer [Zusammensetzung: 50% mit Resin 5% deionisiertes Formamid, 5 x Denhardt's-Lösung, 5 x SSPE-Lösung, 0,2% Natriumdodecylsulfat (SDS), 250 µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA] [Zusammensetzung von 50 x Denhardt's-Lösung: 1 g Ficoll, 1 g Polyvinylpyrrolidon, 1 g BSA, ad 100 ml DEPC-H<sub>2</sub>O] [Zusammensetzung von 20 x SSPE-Lösung: 3,9 M NaCl, 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,02 M EDTA; pH: 7.4] bei 42°C für vier Stunden prähybridisiert. Der Vorgang der Prähybridisierung war wichtig, um eine Sättigung unspezifischer Bindungsstellen auf dem RNA-Blot zu erreichen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Puffer verworfen. Die prähybridisierte Membran konnte dann in einem frisch angelegten Hybridisierungs-Puffer mit der <sup>32</sup>P-markierten DNA-Sonde (Aktivität: 1,5-2,0 Mio. cpm/ml) bei 42°C für 16-20 Stunden hybridisiert werden. Der RNA-Blot wurde danach zweimal mit Puffer A [Zusammensetzung: 6 x SSPE, 0,1% SDS] 30 Minuten lang bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend folgte der Waschvorgang der Membran jeweils einmal für 30 Minuten bei 42°C und 55°C mit Puffer B [Zusammensetzung: 1 x SSPE, 0,1 % SDS].

Bei der Hybridisierung fand eine Anlagerung der radioaktiv markierten DNA an die mRNA statt. Auf diese Weise konnte die mRNA radioaktiv nachgewiesen werden. Zur Visualisierung wurde ein Fuji RX-Röntgenfilm auf den Blot aufgelegt. Bei -80°C konnte die mRNA auf der Membran mittels Autoradiografie detektiert werden.

Die Auswertung der Autoradiografien erfolgte densitometrisch per Computer (Software: Tina V 2.09g, Raytest Isotopenmessgeräte). Im Ergebnis wurden die Signale als prozentuale Veränderung gegenüber der nativen mRNA angegeben.

In anderen Versuchen wurde die Membran auf eine Phosphorimagerfolie aufgelegt und nach sieben Tagen die „Belichtung“ der Membran ausgemessen.

## **5. Western-Blot-Analyse**

### ***a) Präparation der glatten Gefäßmuskelzellen zur immunochemischen Detektion der MAP-Kinasen***

Serum-depletierte VSMC wurden nach der Stimulation mit den jeweiligen Substanzen zweimal mit Phosphat-Puffer-Saline (PBS) gewaschen und schockgefroren. Nachfolgend wurden die Zellen in Lysispuffer [pH: 7.5; 1% Triton-X-100; Zusammensetzung: 50 mmol/l Tris/HCl, 150 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Natriumpyrophosphat, 25 mmol/l Natriumfluorid, 2 mmol/l EDTA, 2 mmol/l EGTA, 2 mmol/l Orthovanadate, 10 µg/ml Trypsininhibitor, 2 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Pepstatin A, 2 µg/ml Antipain, 40 µg/ml PMSF] lysiert.

### ***b) Präparation von Membran- und Zytoplasmafraktion für Rac-Western***

VSMC wurden mit entsprechenden Substanzen stimuliert, zweimal mit PBS gewaschen und in hypotonischem Lysispuffer [pH: 7.4; 4°C; Zusammensetzung: 25 mmol/l Tris, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l EGTA, 10 µg/ml Trypsininhibitor, 2 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Pepstatin A, 2 µg/ml Antipain, 40 µg/ml PMSF] lysiert und durch Pottern auf Eis (20 Schläge) homogenisiert. Die Sedimentation der nukleären Fraktion konnte durch zehnmünütige Zentrifugation bei 3000 x g erzielt werden. Um die Membranfraktion zu erhalten, wurde die Ultrazentrifugation (100000 x g, eine Stunde) durchgeführt. Der Überstand (Zytoplasma) und die Membranfraktion (nach Lösen in 1% Tritonpuffer) konnten dann zur Lokalisation der kleinen GTPase Rac in der Western-Blot-Analyse weiterverarbeitet werden.

Die Proteinkonzentration der jeweiligen Überstände wurde nach der Bradford-Methode bestimmt. Für die Proteinbestimmung diente eine Standardreihe aus Rinderserumalbumin-Lösung mit unterschiedlich hohen Konzentrationen als Referenz. Gleiche Proteinmengen wurden für fünf Minuten bei 95°C in Laemmlipuffer [pH: 6.8; Zusammensetzung: 2% Natriumdodecylsulfat (SDS), 5% β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin,

0,001% Bromphenolblau, 63 mmol/l Tris/HCl] erhitzt. Anschließend konnten die Proben für eine Minute bei 22°C und 5000 x g zentrifugiert und auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (5%iges Sammelgel, 8%iges Trenngel) für die elektrophoretische Auftrennung aufgetragen werden.

Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer [Zusammensetzung: 160 mmol/l Glycin, 3,6 mmol/l SDS, 25 mmol/l Tris/HCl]. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel mittels Tankblotverfahren in Transferpuffer [Zusammensetzung: 160 mmol/l Glycin, 25 mmol/l Tris/HCl, 20% Methanol] auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Proteintransfer dauerte bei einer Spannung von 100 Volt mit einer Stromstärke von 250 mA etwa eine Stunde. Nach dieser Zeit wurde die Membran in 0,25%iger Ponceau-S-Lösung geschwenkt. Aus der Intensität der unspezifischen Proteinfärbung dieser Lösung konnte die Gleichmäßigkeit der Beladung auf dem Gel überprüft werden.

Anschließend erfolgte die Entfärbung der Membran in TBST-Puffer [pH: 7.5; Zusammensetzung: 0,3% Tween, 20 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl] und deren Inkubation für eine Stunde in TBST-Puffer mit 3% Rinderserumalbumin (BSA), um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. In der Zwischenzeit wurde der spezifische gegen das zu untersuchende Protein gerichtete monoklonale Antikörper (sogenannter Erst-Antikörper: 1. gegen p38 MAP-Kinase und ERK 1/2; 2. gegen Rac) in einer 1:1000-Verdünnung in TBST-Puffer mit 3% BSA angesetzt und für mindestens drei Stunden zu dem Blot gegeben. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, sollte die Membran danach jeweils für zehn Minuten fünfmal mit TBST-Puffer gewaschen werden. Zur Detektion des Erst-Antikörpers wurde der Blot mit dem Peroxidase-konjugierten Zweit-Antikörper, der gegen den Erst-Antikörper gerichtet war, für eine Stunde inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem Zweit-Antikörper war es notwendig, die Membran mehrmals mit TBST-Puffer zu waschen. Da der Inhaltsstoff Tween des TBST-Puffers die nachfolgende Farbreaktion störte, wurde die Membran zweimal mit TBST-Puffer ohne 0,3% Tween gewaschen. Die Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenz-Reaktion konnte dann mit Hilfe kommerziell erwerblicher Reagenzien

(Enhanced Chemiluminescence ECL<sup>®</sup>, Amersham) gestartet werden. Die zu detektierenden Proteine wurden mittels des Röntgenfilmes (Fuji RX-Film, Du Pont de Nemours) anhand ihrer autoradiografischen Röntgenfilmschwärzungen nachgewiesen. Zur semiquantitativen Bestimmung der relativen Proteinmengen erfolgte die Auswertung der Banden auf dem Röntgenfilm densitometrisch.

Sollte die Membran mit einem weiteren gegen ein anderes Protein gerichteten Antikörper behandelt werden, wurde diese zunächst bei 50°C in einem „Stripping-Puffer“ [Zusammensetzung: 67,5 mmol/l Tris/HCl, 100 mmol/l  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2% SDS] für eine halbe Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Blot mehrmals mit TBST-Puffer gewaschen und in TBST-Puffer mit 3% BSA geblockt. Der alternative Erst-Antikörper konnte dann auf die Membran gegeben werden.

## ***6. Untersuchung der prokoagulatorischen Aktivität***

Zur Untersuchung der prokoagulatorischen Aktivität von humanen glatten Gefäßmuskelzellen wurden diese Zellen in einer 24-Loch-Platte kultiviert. Konfluent gewachsene Zellen konnten für 24 Stunden in serumfreiem Medium bei 37°C im Brutschrank inkubiert werden. Anschließend erfolgten die Stimulation der Zellen mit entsprechenden Substanzen und deren Behandlung für weitere 24 Stunden mit serumfreiem Medium bei 37°C im Brutschrank. Nach 24 Stunden wurden dem Kulturmedium teilweise Statine (Cerivastatin, 30 nmol/l) oder  $\alpha$ -Thrombin (1 U/ml) zugegeben. Im Falle des Statin-Entzuges wurde das Medium sechs Stunden vor dem Versuch mehrfach gewechselt. Nach Entfernung der Überstände der Zellen auf einer Wärmeplatte bei 37°C konnten diese dreimal mit jeweils 1 ml vorgewärmter HEPES-Tyrode gewaschen und mit 480  $\mu$ l ebenfalls vorgewärmtem humanem Thrombozyten-armem Plasma (Platelet Poor Plasma, PPP) inkubiert werden.

Zur Gewinnung des Thrombozyten-armen Plasmas wurde einem gesunden, nüchternen Probanden mit einer Entnahmespritze, die 3,8%ige Natriumcitrat-Lösung (Verhältnis

Natriumcitrat:Blut=1:10) zur Gerinnungshemmung enthielt, Blut abgenommen. Nach 30-minütiger Zentrifugation dieser Blut-Puffer-Mischung bei 2100 U/min erfolgte die vorsichtige Abnahme der oberen Phase. Das durch diese Methode gewonnene PPP konnte dann weiterverarbeitet werden.

Nach Inkubation der Zellen mit PPP wurden diese mit 120 µl Pufferlösung A [pH: 7.35; Zusammensetzung: 0,05 M Tris, 0,1 M NaCl] versetzt. Durch zeitgenaue Zugabe von 120 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung (pH: 7.9; 16,7 mmol/l) konnte die Gerinnungskaskade gestartet werden. Ab der zweiten Minute nach Start der Reaktion wurden in Abständen von zwei beziehungsweise einer Minute jeweils 20 µl aus dem Reaktionsgemisch entnommen und in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß überführt. In diesem Eppendorf-Gefäß waren 480 µl vorgewärmte Pufferlösung B [pH: 7.9; Zusammensetzung: 0,05 M Tris, 0,1 M NaCl, 20 mM EDTA, 0,5 mg/ml Ovalbumin) und 0,2 mM chromogenes Substrat S-2238 enthalten. Anschließend konnte das Eppendorf-Gefäß gevortext und für drei Minuten bei 37°C im Heizblock inkubiert werden. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 300 µl konzentrierter Essigsäure gestoppt.

Die Spaltung des chromogenen Substrates erfolgte durch die Protease Thrombin, die während des Gerinnungsvorgangs gebildet wurde. Das gelbe Reaktionsprodukt wurde im Photometer bei 405 nm gemessen. Die Absorptionswerte dienten als Maß für die prokoagulatorische Aktivität der humanen glatten Gefäßmuskelzellen. Im Ergebnis wurde jeweils der prozentuale Wert gegenüber dem in dem entsprechenden Versuchsansatz gemessenen Höchstwert (100%) angegeben und auf der Zeitachse dargestellt.

## ***7. ELISA-Technik***

Die Freisetzung von MCP-1 von glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte in das Kulturmedium wurde mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit bestimmt.

VSMC wurden für 12 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit Cerivastatin (1 µmol/l), Atorvastatin (10 µmol/l)

oder Lovastatin (10  $\mu\text{mol/l}$ ) für weitere 12 Stunden stimuliert. Anschließend erfolgten ein Waschvorgang und die Inkubation der Zellen für 12 Stunden in serumfreiem Medium mit (Behandlung) und ohne Statin (Entzug) oder mit Thrombin (1 U/ml, Positiv-Kontrolle). Die MCP-1-Freisetzung konnte dann gemessen werden.

Die Wells der Mikrotiterstreifen wurden mit monoklonalen Antikörpern, die gegen MCP-1 gerichtet waren, beschichtet. Bei der Freisetzung von MCP-1 konnte dieses spezifische Protein an die in den Wells fixierten Antikörper gebunden werden. Anschließend wurden monoklonale Zweit-Antikörper, die mit einem Enzym konjugiert waren, hinzugefügt. Dabei erfolgte eine Bindung der Zweit-Antikörper an MCP-1, das wiederum an die Erst-Antikörper angeheftet war. Nicht gebundene Zweit-Antikörper wurden durch Waschen der Wells entfernt. Die Substratlösung wurde dann hinzugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe war umgekehrt proportional zur MCP-1-Konzentration in den Proben. Die Extinktion wurde mit einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen. Anhand einer Standardkurve konnten die MCP-1-Konzentrationen direkt berechnet werden.

## ***8. Statistik***

Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (S.E.M: Standard Error of the Mean) von  $n$  verschiedenen Experimenten angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student's t-Test beziehungsweise der ANOVA-Methode bei multiplen Vergleichen. Ein Wert von  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.



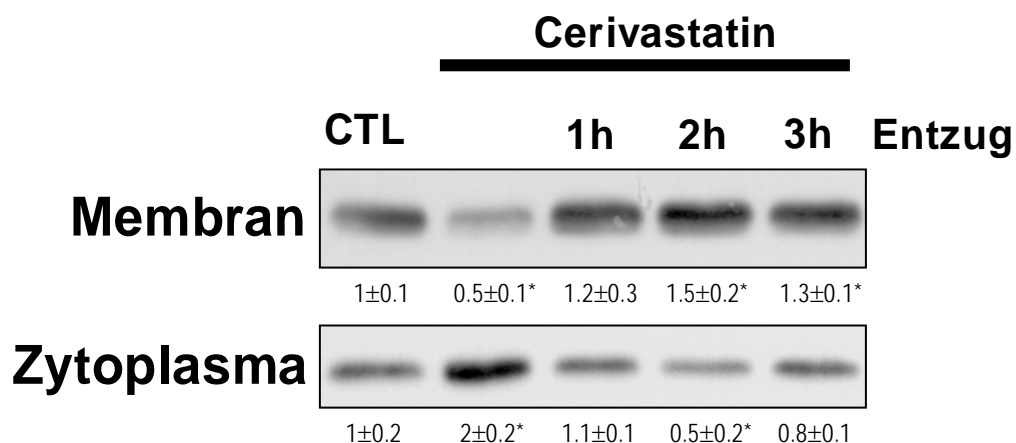
## IV. Ergebnisse

### 1. Effekt von Cerivastatin und Cerivastatin-Entzug auf die zelluläre Lokalisation von Rac

Für die Aktivierung der ROS-bildenden NADPH-Oxidase ist eine Translokation der kleinen GTPase Rac vom Zytoplasma an die Plasmamembran erforderlich.

Cerivastatin (100 nmol/l) verhinderte den Transport der GTPase vom Zytoplasma in die Membran. Dies hatte eine Akkumulation von inaktivem Rac im Zytoplasma zur Folge.

Eine Stunde nach Entzug des Statins kam es zu einer überschüssigen Translokation von Rac zurück an die Membran. Ein signifikanter Anstieg der Rac-Ansammlung in der Membran wurde zwei und drei Stunden nach Entzug von Cerivastatin beobachtet (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Darstellung der Effekte von Cerivastatin und Statin-Entzug auf die Rac-Lokalisation**

Humane glatte Gefäßmuskelzellen wurden für 24 Stunden mit Cerivastatin (100 nmol/l) behandelt. In Untergruppen wurde Cerivastatin durch mehrmaligen Mediumwechsel entfernt (Entzug). Eine, zwei und drei Stunden nach Entzug des

Statins wurden Zytoplasma und Membran isoliert und mit Hilfe der Western-Blot-Analyse dargestellt.

Exemplarischer Westernblot der Rac-Lokalisation in Zytoplasma und Membran unter Kontrollbedingungen (CTL), in Anwesenheit von Cerivastatin und eine, zwei und drei Stunden nach Statin-Entzug.

Die Zahlen unterhalb des Blots sind die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung. (n=6) \*p<0,05

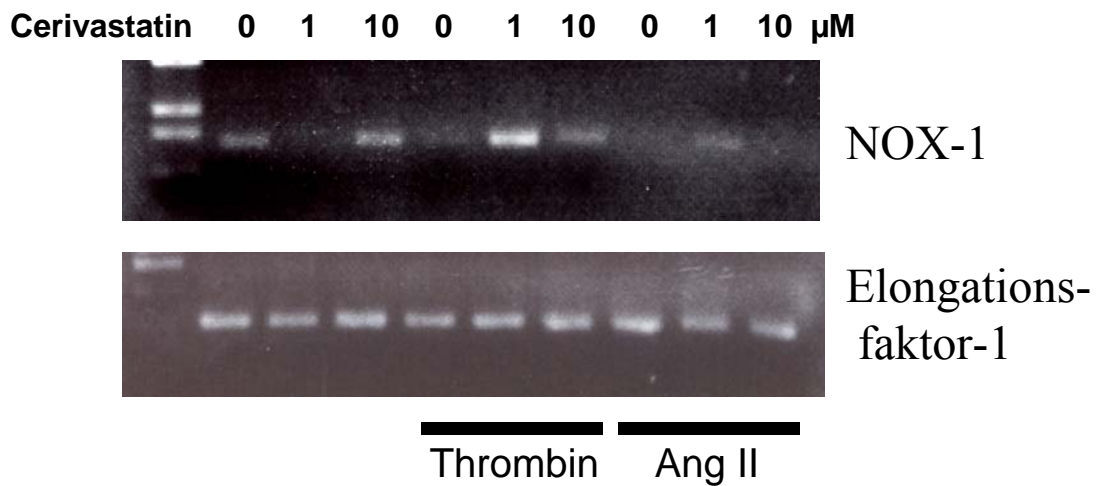
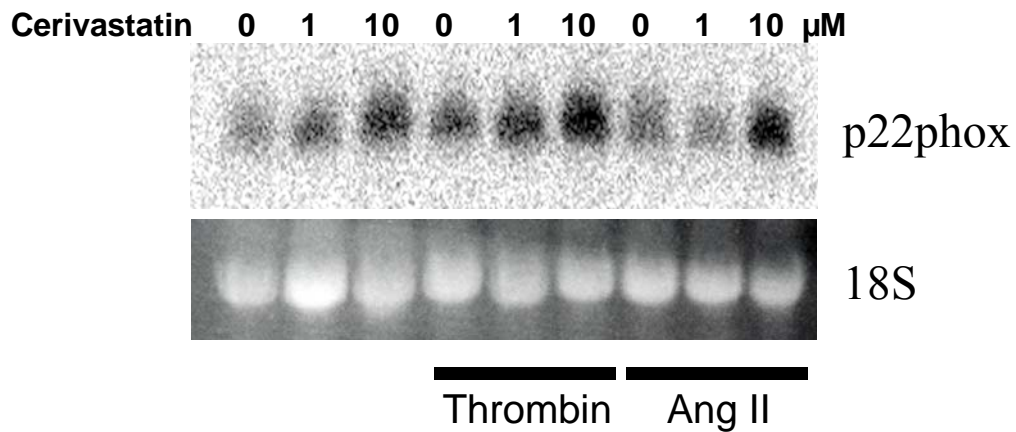
## **2. Effekt von Cerivastatin auf die Expression der NADPH-Oxidase**

### **Untereinheit**

Von den bekannten Untereinheiten der NADPH-Oxidase ist die Expression von p22<sup>phox</sup><sup>49;79</sup> und Nox1 in glatten Gefäßmuskelzellen am besten untersucht.

Der Effekt von Cerivastatin auf die Expression von p22<sup>phox</sup> und Nox1 wurde in Versuchen mit glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte unter Kontrollbedingungen und nach Stimulation mit Thrombin oder Angiotensin II dargestellt. Dabei wurden unterschiedliche Effekte auf die beiden Untereinheiten beobachtet.

Cerivastatin steigerte dosisabhängig die p22<sup>phox</sup> Expression, während für Nox1 kein einheitlicher Effekt beobachtet werden konnte (Abbildung 4).



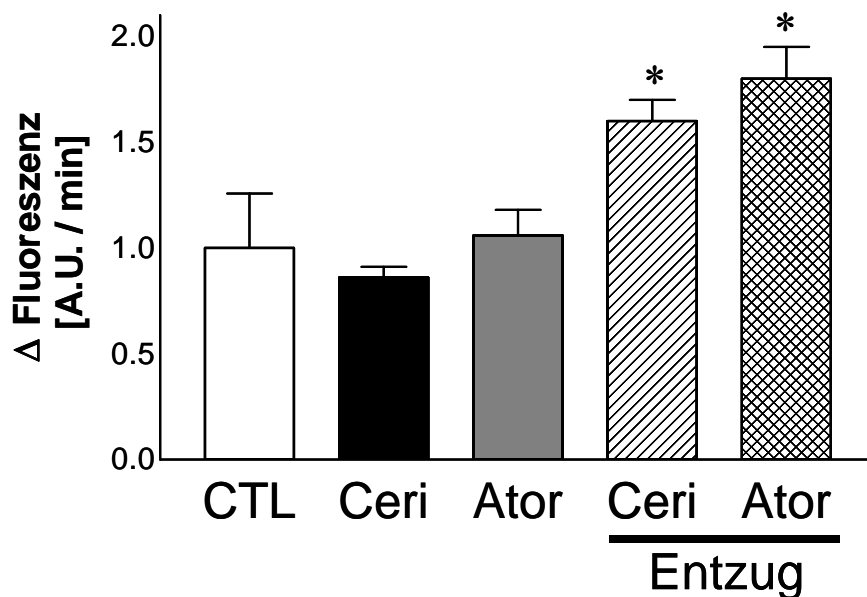
**Abbildung 4: Effekt von Cerivastatin auf die Expression der NADPH-Oxidase Untereinheit mRNA**

Glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte wurden in serumfreiem Medium in Anwesenheit (1 oder 10  $\mu\text{M}$ ) oder Abwesenheit von Cerivastatin inkubiert und mit Thrombin (3 U/ml) oder Angiotensin II (Ang II, 100 nM) für vier Stunden stimuliert. Die Expression von p22<sup>phox</sup> mRNA wurde mit Hilfe der Northern-Blot-Analyse und die Nox1-Expression mittels RT-PCR dargestellt.

### 3. Effekt von Cerivastatin und Atorvastatin sowie Statin-Entzug auf die ROS-Produktion

Behandlung von humanen glatten Gefäßmuskelzellen mit Cerivastatin (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) und Atorvastatin (10  $\mu\text{mol/l}$ ) hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die basale zelluläre ROS-Bildung, die mit der Dihydrodichlorofluorescein-Oxidations-Methode gemessen wurde.

Nach Entzug der Statine kam es hingegen zu einer signifikanten Steigerung der ROS-Produktion (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Effekt von Cerivastatin, Atorvastatin und Statin-Entzug auf die ROS-Produktion**

Effekt von Cerivastatin und Atorvastatin sowie Entzug auf die ROS-Bildung gemessen mit Dihydrodichlorofluorescein-Oxidation. Humane glatte Aortenmuskelzellen wurden für 24 Stunden mit Cerivastatin (Ceri, 0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) und Atorvastatin (Ator, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) vorinkubiert. In Untergruppen wurden die Statine durch wiederholten Mediumwechsel 90 Minuten vor der Messung der Sauerstoffradikale mit Dihydrodichlorofluorescein-Oxidation entfernt (Entzug).

Die Zellen wurden gegen Kontrollen in An- oder Abwesenheit von Cerivastatin und Atorvastatin untersucht. Diese wurden mit Dihydrodichlorofluorescein-Diacetat (10  $\mu\text{mol/l}$ ) für 15 Minuten beladen. (n=4) \*p<0,05

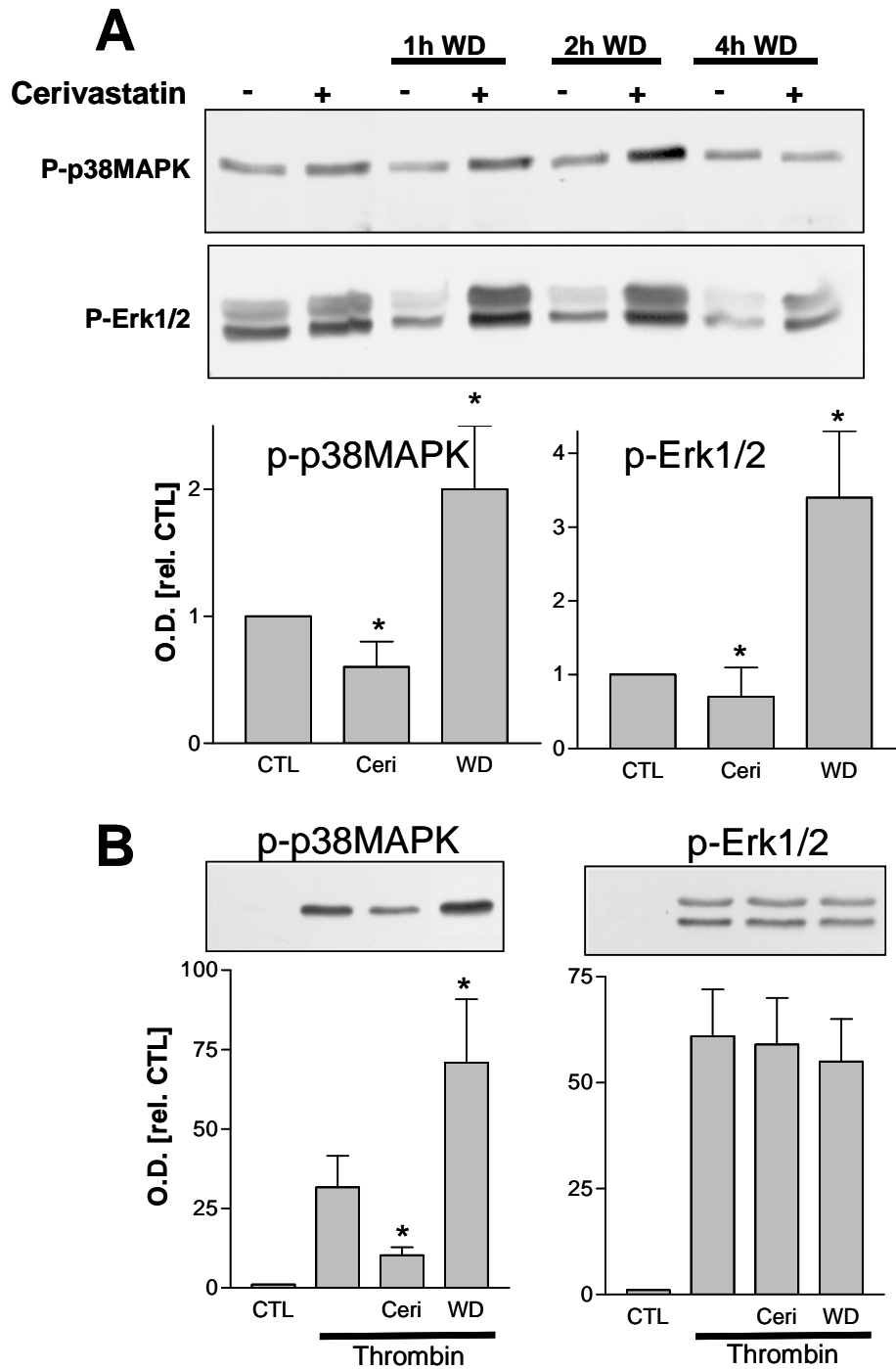
Dargestellt ist die Fluoreszenzänderung pro Minute über die ersten zehn Minuten der Inkubation.

## **4. Effekt von Cerivastatin und Cerivastatin-Entzug auf die MAP-Kinase Aktivierung**

Cerivastatin per se hatte nur einen geringen Effekt auf die niedrige basale Phosphorylierung von p38 MAP-Kinase und ERK 1/2 (Abbildung 6 A). Erst unter dem Einfluss von Thrombin und Angiotensin II verhinderte Cerivastatin die Aktivierung von p38 MAP-Kinase (Abbildung 6 B und Abbildung 7).

Nach Entzug des Statins wurde eine signifikante Steigerung der basalen Phosphorylierung von p38 MAP-Kinase und ERK 1/2 beobachtet. Zwei Stunden nach Entzug von Cerivastatin wurde der Höchstwert in der Phosphorylierung der MAP-Kinasen erreicht (Abbildung 6 A).

Wurden die Zellen nach 24-stündiger Vorinkubation mit Cerivastatin für fünf Minuten mit Thrombin (1 U/ml) stimuliert, kam es zu einem Anstieg der p38 MAP-Kinase Phosphorylierung. In Anwesenheit von Cerivastatin wurde die Thrombin-induzierte Aktivierung der MAP-Kinase unterdrückt. Der Entzug des Statins führte zu einer starken Potenzierung der Agonisten-vermittelten p38 MAP-Kinase Phosphorylierung (Abbildung 6 B). Bei ERK 1/2 wurden unterschiedliche Effekte verzeichnet. Obwohl Thrombin eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung von ERK 1/2 bewirkte, hatten weder Cerivastatin noch dessen Entzug einen Einfluss auf die Thrombin-vermittelte Aktivierung dieser MAP-Kinase (Abbildung 6 B).



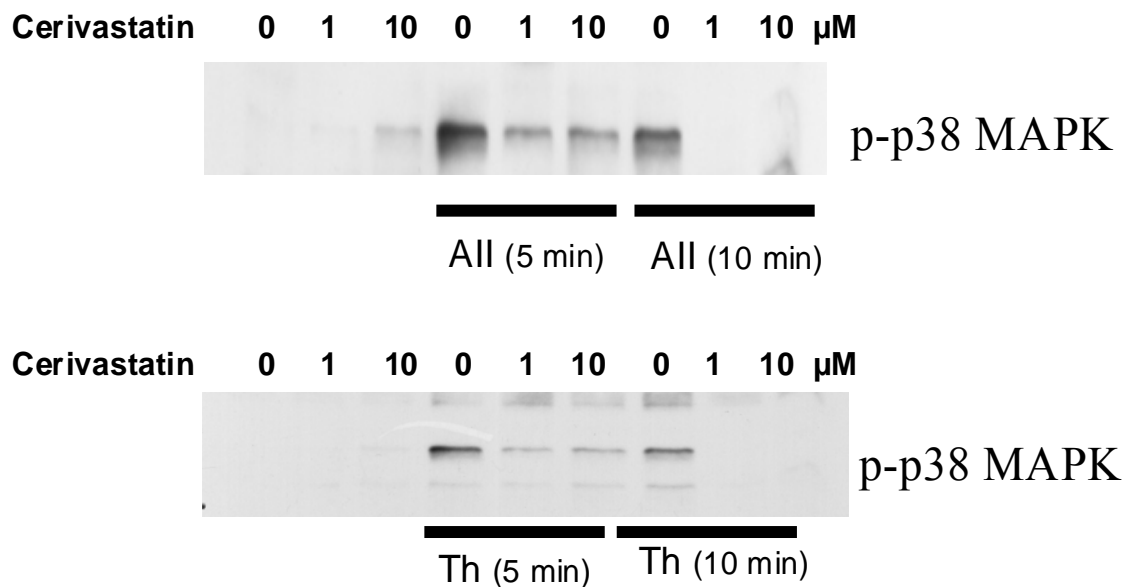
**Abbildung 6: Effekt von Cerivastatin und Cerivastatin-Entzug auf die basale (A) und Thrombin-induzierte (B) Phosphorylierung von p38 MAP-Kinase und ERK 1/2**

Glatte Muskelzellen wurden für 24 Stunden mit Cerivastatin (100 nM) vorinkubiert. In Untergruppen wurde das Statin durch mehrmaliges Waschen entfernt (WD).

Oben: Exemplarischer Westernblot.



Unten: Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung 90 Minuten nach Cerivastatin-Entzug (WD) gegen Cerivastatin-Behandlung (Ceri) und Kontrolle (CTL). (n=4) \*p<0,05 O.D.: Optische Dichte



**Abbildung 7: Effekt der Statin-Behandlung auf die MAP-Kinase Aktivierung in humanen glatten Muskelzellen**

Die Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium mit Cerivastatin (0, 1 und 10 μM) vorbehandelt und mit Thrombin (Th, 3 U/ml) oder Angiotensin II (All, 100 nM) für fünf oder zehn Minuten stimuliert.

Dargestellt sind exemplarische Westernblots unter Anwendung von phosphospezifischen Antikörpern gegen p38 MAP-Kinase.

## **5. Effekt von Cerivastatin und Statin-Entzug auf die Expression von Tissue Faktor**

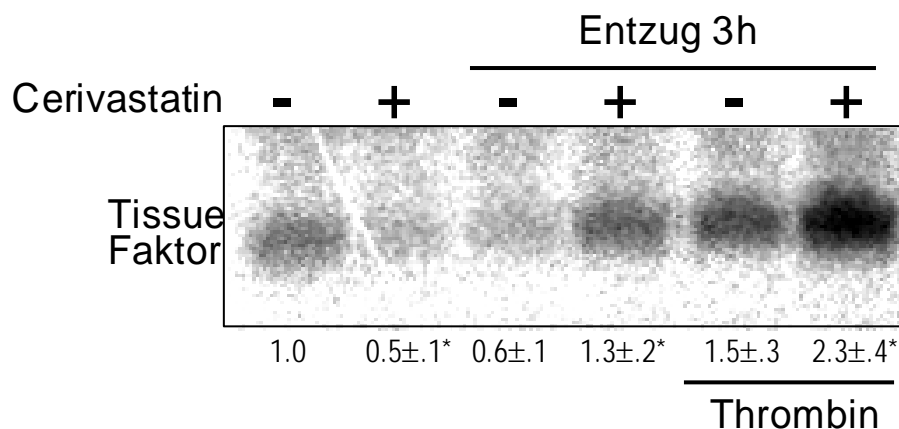
In glatten Muskelzellen der menschlichen Aorta und der Ratte war die basale Expression von Tissue Faktor schwach oder nicht nachweisbar.

Die Behandlung mit Cerivastatin hatte keinen Einfluss auf die basale Expression von Tissue Faktor. Thrombin als Positiv-Kontrolle bewirkte hingegen eine Steigerung der Expression.

Nach Entzug des Statins kam es zu einer verstärkten Induktion von Tissue Faktor mRNA mit einem Maximum nach drei Stunden. Der Effekt des Entzuges führte zu einer deutlichen Potenzierung der Thrombin-vermittelten Induktion von Tissue Faktor mRNA (Abbildung 8).

Um zu klären, ob es durch die Entzug-induzierte Steigerung der Expression von Tissue Faktor mRNA ebenfalls zu einem Anstieg der Aktivität von Tissue Faktor an der Zellmembran kam, wurde der Assay zur prokoagulatorischen Aktivität durchgeführt.

Es stellte sich heraus, dass Cerivastatin (30 nmol/l) keinen Einfluss auf die Tissue Faktor-induzierte Thrombinbildung aus Prothrombin hatte. Der Cerivastatin-Entzug bewirkte jedoch eine Steigerung der prokoagulatorischen Aktivität um 40% (Abbildung 9).

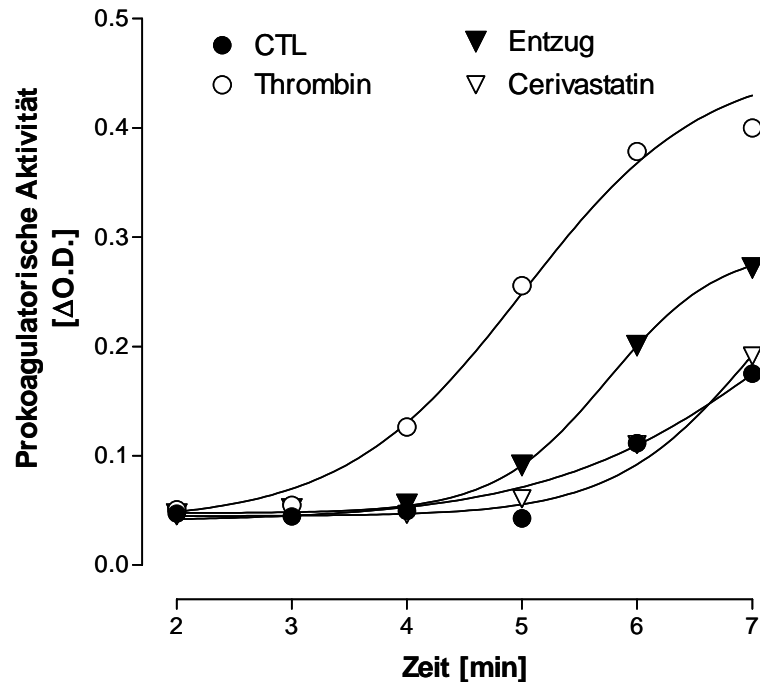


**Abbildung 8: Effekt von Cerivastatin und Statin-Entzug auf die Expression von Tissue Faktor**

Humane glatte Gefäßmuskelzellen wurden für 24 Stunden mit Cerivastatin (100 nmol/l) behandelt. In Untergruppen wurde das Statin durch mehrmaligen Mediumwechsel entfernt (Entzug).

Dargestellt ist ein exemplarischer Northern Blot der Expression des Tissue Faktors unter basalen Bedingungen gegen Cerivastatin-Entzug (drei Stunden vor Ende des Versuchs) mit oder ohne Cerivastatin-Vorbehandlung in An- oder Abwesenheit von Thrombin (1 U/ml).

Die Zahlen unterhalb des Blots sind die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung. (n=4) \*p<0,05



**Abbildung 9: Effekt von Cerivastatin und Cerivastatin-Entzug auf die prokoagulatorische Aktivität**

Humane glatte Muskelzellen wurden für 24 Stunden mit Cerivastatin (30 nmol/l) oder Thrombin (1 U/ml) vorinkubiert. In Untergruppen wurde das Medium sechs Stunden vor dem Versuch mehrfach gewechselt (Entzug). Zu den Zellen wurden humanes Thrombozyten-armes Serum und ein chromogenes Substrat (S-2238) gegeben. Durch Zugabe von Calcium wurde die Gerinnungskaskade gestartet. Die Spaltung des chromogenen Substrates erfolgte durch die Protease Thrombin, die während des Gerinnungsvorgangs gebildet wurde. Das gelbe Reaktionsprodukt wurde im Photometer bei 405 nm gemessen. Die Absorptionswerte dienen als Maß für die prokoagulatorische Aktivität der humanen glatten Gefäßmuskelzellen. Im Ergebnis wurde jeweils der prozentuale Wert gegenüber dem in dem entsprechenden Versuchsansatz gemessenen Höchstwert angegeben und auf der Zeitachse dargestellt. (n=6)

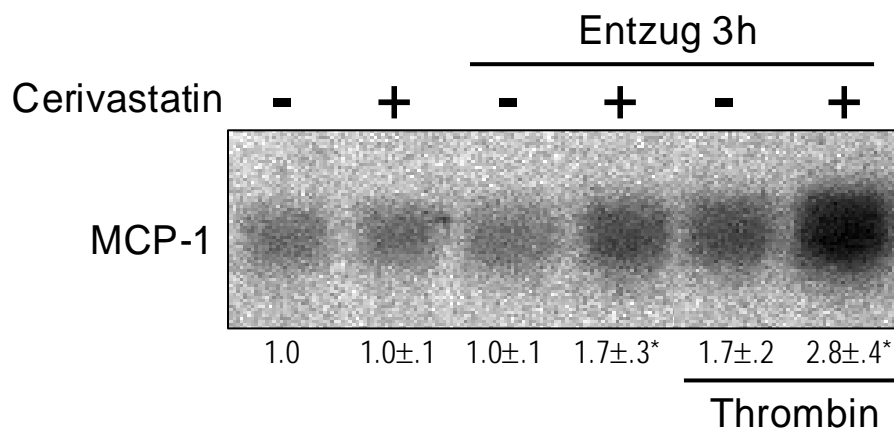
## **6. Effekt von Cerivastatin und Cerivastatin-Entzug auf die Expression von MCP-1**

In glatten Muskelzellen der humanen Aorta und der Ratte war die basale MCP-1 Expression detektierbar, die nicht durch Cerivastatin beeinflusst wurde.

Wurde das Statin entzogen, kam es zu einer signifikanten Steigerung der MCP-1 Expression. Thrombin bewirkte ebenfalls eine Induktion von MCP-1 mRNA, die durch Cerivastatin (0,1 µmol/l) verhindert wurde. Der Entzug des Statins führte zu einer Potenzierung der MCP-1 Expression durch Thrombin (Abbildung 10).

Um zu klären, ob die durch Statin-Entzug vermittelte Induktion von MCP-1 mRNA tatsächlich in einer relevanten Proteinexpression resultiert, wurde die MCP-1 Freisetzung mittels ELISA-Technik quantifiziert.

Es zeigte sich, dass die Positiv-Kontrolle Thrombin eine signifikante Erhöhung der MCP-1 Sekretion bewirkte. Cerivastatin (1 µmol/l), Atorvastatin (10 µmol/l) und Lovastatin (10 µmol/l) hingegen nahmen kaum Einfluss auf die basale MCP-1 Freisetzung, die unter Kontrollbedingungen gemessen wurde. Im Gegensatz dazu führte der Entzug der Statine zu einer deutlichen Steigerung der Sekretion von MCP-1 um 50% des Effektes von Thrombin (Abbildung 11).

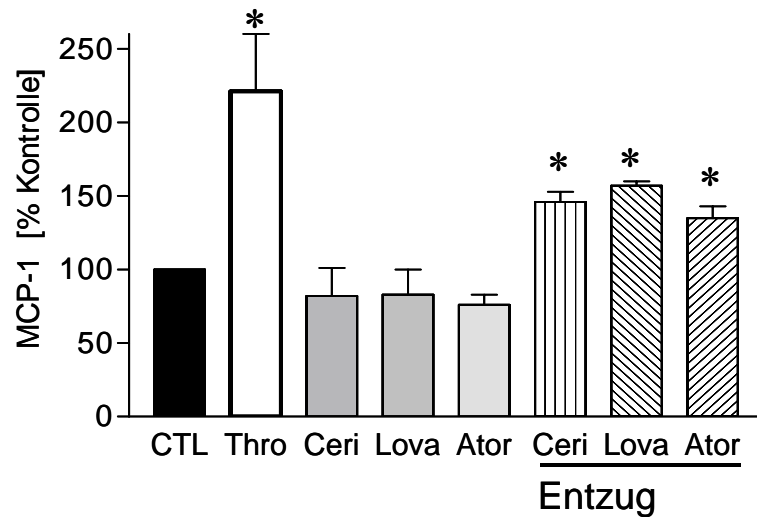


**Abbildung 10: Effekt von Cerivastatin und Cerivastatin-Entzug auf die Expression von MCP-1**

Humane glatte Gefäßmuskelzellen wurden für 24 Stunden mit Cerivastatin (100 nmol/l) vorinkubiert. In Untergruppen wurde das Statin durch wiederholten Mediumwechsel entfernt (Entzug).

Dargestellt ist ein exemplarischer Northern Blot der Expression von MCP-1 unter basalen Bedingungen gegen Cerivastatin-Entzug (drei Stunden vor Ende des Versuchs) mit oder ohne Cerivastatin-Vorbehandlung in An- oder Abwesenheit von Thrombin (1 U/ml).

Die Zahlen unterhalb des Blots sind die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung. (n=4) \*p<0,05



**Abbildung 11: Effekt der Statine und des Statin-Entzuges auf die MCP-1 Sekretion von glatten Muskelzellen**

Glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte wurden für 24 Stunden mit Cerivastatin (Ceri, 1  $\mu\text{mol/l}$ ), Atorvastatin (Ator, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) oder Lovastatin (Lova, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) behandelt. In Untergruppen wurde das Statin durch mehrmaliges Waschen entfernt (Entzug).

Dargestellt ist die mittels ELISA ermittelte MCP-1 Akkumulation über acht Stunden. Thrombin (Thro, 3 U/ml) diente als Positiv-Kontrolle. (n=3) \*p<0,05

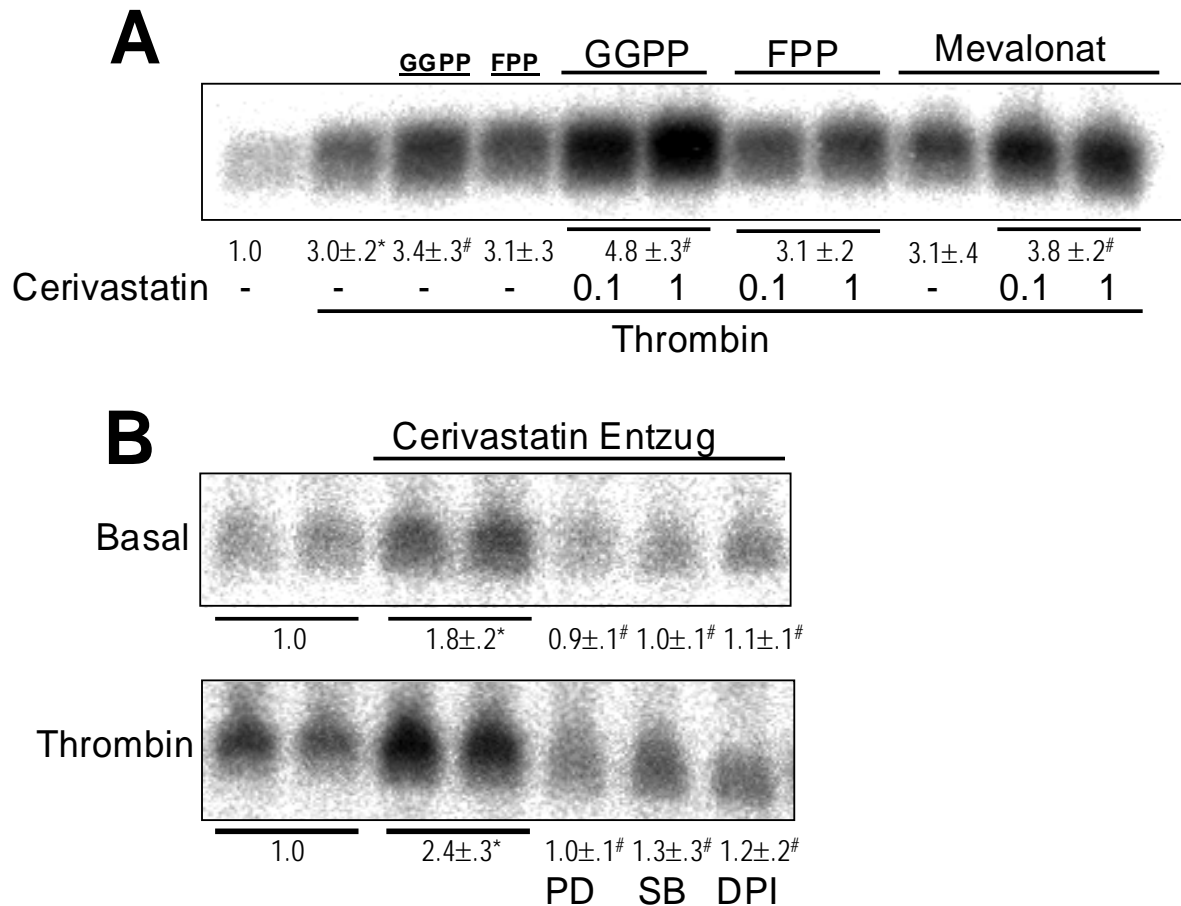


## **7. Mechanismus des Statin-Entzuges auf die MCP-1 Expression in glatten Gefäßmuskelzellen**

Um zu zeigen, dass die durch Entzug von Cerivastatin vermittelte MCP-1 Expression durch Intermediate der Cholesterinbiosynthese beeinflusst wird, wurde der Versuch mit einigen dieser Substanzen in Anwesenheit von Cerivastatin durchgeführt.

Es stellte sich heraus, dass in Anwesenheit von Thrombin, aber Abwesenheit von Cerivastatin Geranylgeranylpyrophosphat (10  $\mu\text{mol/l}$ ), Farnesylpyrophosphat (10  $\mu\text{mol/l}$ ) und Mevalonsäure (100  $\mu\text{mol/l}$ ) nur einen geringen Effekt auf die MCP-1 Expression hatten. In Anwesenheit von Cerivastatin kam es jedoch zu einer signifikanten Erhöhung der MCP-1 Expression durch Geranylgeranylpyrophosphat und Mevalonsäure. Farnesylpyrophosphat hingegen beeinflusste in Gegenwart von Cerivastatin nicht die Induktion von MCP-1 mRNA (Abbildung 12 A).

Um die Rolle der NADPH-Oxidase und der MAP-Kinasen in der Signaltransduktion bezüglich der MCP-1 Expression zu untersuchen, wurden im weiteren Versuch Hemmstoffe eingesetzt. Dabei unterdrückt PD98059 die ERK 1/2 Aktivierung, SB203580 ist ein Hemmstoff der p38 MAP-Kinase und Diphenyliodonium (DPI) hemmt unspezifisch die NADPH-Oxidase. Es zeigte sich, dass die Inhibitoren PD98059, SB203580 und DPI vollständig die durch Statin-Entzug vermittelte Induktion von MCP-1 mRNA sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter Thrombin-Stimulation verhinderten (Abbildung 12 B).



### Abbildung 12: Mechanismus des Statin-Entzuges auf die MCP-1 Expression

Humane glatte Muskelzellen wurden mit Cerivastatin inkubiert. In Untergruppen wurde das Statin ausgewaschen (Entzug).

**(A)** Dargestellt ist ein exemplarischer MCP-1 Northern Blot unter Einsatz von Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, 10  $\mu$ M), Farnesylpyrophosphat (FPP, 10  $\mu$ M) und Mevalonsäure (100  $\mu$ M) unter Thrombin-Stimulation (1 U/ml) in An- oder Abwesenheit der angegebenen Konzentrationen an Cerivastatin (Ceri).

**(B)** Exemplarischer MCP-1 Northern Blot unter basalen Bedingungen (oben) oder mit Thrombin-Stimulation (unten) in An- oder Abwesenheit von PD98059 (PD, 50  $\mu$ M), SB203580 (SB, 20  $\mu$ M) und Diphenyleniodonium (DPI, 10  $\mu$ M). Die Zahlen unterhalb der Blots sind die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung. \* $p < 0,05$

## V. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt des Entzuges einer Statin-Behandlung auf glatte Muskelzellen untersucht. HMG-CoA-Reduktasehemmer führten zu einer Akkumulation von inaktivem Rac im Zytoplasma von glatten Muskelzellen, was die Hemmung der Rac-abhängigen NADPH-Oxidase und konsekutiver Verminderung der Phosphorylierung von mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinasen zur Folge hatte.

Nach Entzug von Statinen kam es zu einer überschiessenden Translokation der kleinen GTPase vom Zytoplasma an die Plasmamembran. Die Aktivierung von Rac resultierte in einer Erhöhung der zellulären ROS-Produktion. Ferner war der Statin-Entzug mit einem Anstieg der Phosphorylierung der MAP-Kinasen und der damit verbundenen Expressionssteigerung von MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) und Tissue Faktor (TF) assoziiert. Die durch Entzug induzierte Genexpression konnte durch Hemmstoffe der MAP-Kinasen und der NADPH-Oxidase unterdrückt werden.

### *1. Der Einfluss von Cerivastatin auf die vaskuläre Homöostase*

In einer Vielzahl von Studien an Zellkulturen, Tiermodellen der Arteriosklerose und letztlich auch am Patienten ist nachgewiesen worden, dass HMG-CoA-Reduktasehemmer die Expression von MCP-1 und Tissue Faktor unterdrücken<sup>80-83</sup>. Eine der am besten untersuchten Effekte der Statine in Tier- und Zellkulturversuchen ist die Hemmung der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK (extracellular signal-regulated kinase) 1/2<sup>84</sup> und p38 MAP-Kinase<sup>84;85</sup>, die zu der Familie der Serin/Threonin Proteinkinasen gehören<sup>48;86</sup>. Da sowohl ERK 1/2 als auch p38 MAP-Kinase bei der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Nuclear Factor (NF)-κB und Aktivator-Protein-1 (AP-1) eine Rolle spielen<sup>87;88</sup>, ist es nicht verwunderlich, dass Statine

auch die Bindung dieser Transkriptionsfaktoren an die DNA verhindern<sup>89-91</sup>. Daher ist die Inhibition der Induktion von MCP-1 und TF, die beide unter der Kontrolle von NF- $\kappa$ B und AP-1 stehen<sup>92,93</sup>, indirekt als Folge der Statin-vermittelten Hemmung der Rho-GTPasen zu sehen.

In diesem Zusammenhang konzentrierten wir uns auf die Rho-GTPase Rac, deren Lokalisation in der Zelle mittels Western-Blot-Technik ermittelt wurde.

Es zeigte sich, dass Behandlung von glatten Gefäßmuskelzellen mit Cerivastatin zu einer signifikanten Rac-Ansammlung im Zytoplasma führte. Dieser Befund konnte in weiteren Versuchen auf die durch HMG-CoA-Reduktasehemmer induzierte Blockierung der Geranylgeranylierung zurückgeführt werden. Es stellte sich heraus, dass die Zugabe von Geranylgeranylpyrophosphat und Mevalonsäure in Gegenwart von Cerivastatin zur Statin-Entzug vermittelten Induktion von MCP-1 und Tissue Faktor führte. Farnesylpyrophosphat hingegen hatte keinen Effekt auf die Wirkung der Statine, da dieser Phosphorsäureester für die Verankerung von Ras in die Membran benötigt wird.

Eine Eigenschaft von Rac ist die Aktivierung der NADPH-Oxidase<sup>45;52;75;94;95</sup>, die die wichtigste Quelle der ROS-Bildung in der Gefäßwand ist<sup>75;76;96</sup>.

Andere Arbeitsgruppen beschrieben, dass HMG-CoA-Reduktasehemmer von den Untereinheiten der NADPH-Oxidase die Expression der p22<sup>phox</sup> mRNA<sup>41</sup> und der Nox2 mRNA<sup>74</sup> reduzieren, so dass es ebenfalls zu einer Senkung der ROS-Bildung kommt.

Eigene Beobachtungen belegten jedoch, dass Cerivastatin dosisabhängig die p22<sup>phox</sup> Expression steigerte. Diese Befunde lassen sich möglicherweise so interpretieren, dass der Effekt von HMG-CoA-Reduktasehemmer auf die NADPH-Oxidase Expression dosis-, produkt- oder zellspezifisch ist.

Es ist allgemein anerkannt, dass Statine einen hemmenden Effekt auf die ROS-Produktion haben<sup>38</sup>; ein Befund, der in der vorliegenden Studie nicht nachvollzogen werden konnte. Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass für die Messung der Sauerstoffradikale mit der Dihydrodichlorofluorescein-Oxidations-Methode nicht-stimulierte Zellen verwendet wurden, aber Statine nur die Agonisten-induzierte und daher Rac-vermittelte ROS-Produktion unterdrücken<sup>38</sup>. Dies steht ebenfalls in Einklang mit der Beobachtung in eigenen Untersuchungen, dass HMG-CoA-Reduktasehemmer per se lediglich einen geringen Einfluss auf die basale Phosphorylierung von p38 MAP-Kinase sowie auf die Expression der proarteriosklerotischen Gene MCP-1 und TF hatten. Erst unter dem Einfluss von Angiotensin II und Thrombin verhinderten Statine die Aktivierung dieser MAP-Kinase und damit die Induktion der proinflammatorischen Faktoren<sup>97;98</sup>.

Da MCP-1 chemotaktisch für Monozyten/Makrophagen wirkt<sup>99-101</sup> und es aufgrund der Makrophageninfiltration von Gefäßwänden zur Entstehung arteriosklerotischer Läsionen kommt<sup>102;103</sup>, tragen HMG-CoA-Reduktasehemmer zur Hemmung der Inflammation in den Blutgefäßen bei. Durch die Unterdrückung der Agonisten-induzierten Expression von TF, der eine wichtige Rolle bei der Thrombusbildung spielt<sup>104</sup>, wirken Statine antiarteriosklerotisch.

## ***2. Die Rolle des Statin-Entzuges für die Signaltransduktion glatter Gefäßmuskelzellen***

Nach Entzug von Cerivastatin aus dem Inkubationsmedium kam es zu einer deutlichen Translokation der kleinen GTPase Rac vom Zytoplasma zurück an die Plasmamembran, was als Reboundeffekt verstanden wurde<sup>105-107</sup>. Dies hatte zur Folge, dass zwei und drei Stunden nach Entzug des Statins die Konzentration von Rac in der Membran höher war als unter Kontrollbedingungen.

Wurde die Messung der Sauerstoffradikale in Abwesenheit der Statine durchgeführt, war zu beobachten, dass der Entzug zu einer signifikanten Steigerung der basalen zellulären ROS-Bildung führte. Aus diesem Befund kann gefolgert werden, dass die überschüssige Translokation der GTPase in einer Aktivierung der NADPH-Oxidase resultierte.

Um zu zeigen, dass die NADPH-Oxidase an der Signaltransduktion beteiligt ist, wurde in eigenen Versuchen die Substanz Diphenyliodonium (DPI) verwendet, die als potenter Hemmstoff der leukozytären NADPH-Oxidase bekannt ist<sup>108</sup>. Es stellte sich heraus, dass die durch Statin-Entzug vermittelte Induktion von MCP-1 mRNA durch DPI unterdrückt wurde.

Der Flavinhemmstoff DPI ist jedoch ausgesprochen unspezifisch gegenüber der leukozytären NADPH-Oxidase und hemmt sowohl die NO-Synthase<sup>109;110</sup>, die Xanthinoxidase<sup>111</sup>, Cytochrom P450-Monooxygenasen<sup>57</sup> als auch die Atmungskette<sup>112</sup>. Diese Beobachtung lässt daher nicht eindeutig die Beteiligung der p22<sup>phox</sup>-enthaltenden NADPH-Oxidase an der ROS-Produktion und der damit verbundenen Genexpression zu.

ROS verändern die Funktion zahlreicher Enzyme, die eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen. Zu ihnen gehört die p38 MAP-Kinase.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Thrombin-induzierte Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase eher auf die Aktivierung der NADPH-Oxidase und konsekutiver ROS-Bildung

zurückzuführen ist als auf eine direkte Aktivierung der MAP-Kinase<sup>97</sup>. Die durch die NADPH-Oxidase vermittelte Phosphorylierung von p38 MAP-Kinase resultierte in der Induktion von MCP-1<sup>97</sup> und TF mRNA<sup>113</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung von p38 MAP-Kinase und der NADPH-Oxidase an der Statin-Entzug vermittelten Genexpression durch Einsatz von Hemmstoffen untersucht. Es zeigte sich, dass unter dem Einfluss der Substanz SB203580, die die p38 MAP-Kinase inhibiert, die durch Statin-Entzug induzierte Expression von MCP-1 unterdrückt wurde. Wie bereits erwähnt, war der Einsatz von DPI ebenfalls mit einer Hemmung der Induktion des proinflammatorischen Faktors verbunden.

Nach Entzug von Cerivastatin wurde eine signifikante Steigerung in der p38 MAP-Kinase Phosphorylierung beobachtet, die ihr Maximum nach zwei Stunden erreicht.

Die Entzug-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinase wurde sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Thrombin-Stimulation beobachtet.

Interessanterweise kam es bei Unterbrechung der Statin-Behandlung ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der Phosphorylierung von ERK 1/2, die jedoch nur unter basalen Bedingungen ausgeprägt war. Thrombin führte zwar auch zu einer deutlichen Steigerung der ERK 1/2 Phosphorylierung, die aber weder durch Cerivastatin noch durch dessen Entzug beeinflusst wurde. Diese Beobachtung stand nicht in Einklang mit Studien anderer Arbeitsgruppen, die beschrieben, dass HMG-CoA-Reduktasehemmer das Potenzial haben, die Aktivierung von ERK 1/2 zu unterdrücken<sup>84;90</sup>. Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich nur so erklären, dass der Effekt der Statine auf eine spezifische Zelllinie oder hohe Konzentrationen an Statin beschränkt ist.

Da der negative Einfluss von Cerivastatin auf die ERK 1/2 Phosphorylierung unter Thrombin-Stimulation ausbleibt, ist zu vermuten, dass die Angiotensin II- und Thrombin-induzierte Aktivierung von ERK 1/2 nicht über die NADPH-Oxidase vermittelt wird, obwohl ERK 1/2 durch ROS aktiviert werden kann. Dieser Befund kann durch Arbeiten anderer<sup>114</sup> und der eigenen Gruppe<sup>97</sup> gestützt werden.

Diese Erkenntnis könnte die Erklärung für die Beobachtung sein, dass die Thrombin-vermittelte Induktion von MCP-1 mRNA nicht durch Inhibitoren von ERK 1/2 unterdrückt wurde<sup>85;97</sup>. In der vorliegenden Arbeit hemmte die Substanz PD98059, die die Funktion dieser MAP-Kinase aufhob, hingegen die Statin-Entzug induzierte Expression dieses Gens sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Thrombin-Stimulation. Es könnte daher angenommen werden, dass andere Mechanismen zusätzlich zu der direkten Aktivierung von ERK 1/2 über den Ras/Raf-MEK-Weg als Antwort auf den Statin-Entzug vorhanden sind, die zur Induktion von MCP-1 mRNA beitragen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in der Zelle bestimmte Phosphatasen vorkommen, die selektiv die Phosphorylierung der MAP-Kinase rückgängig machen.

Über ihre Effekte auf die Signaltransduktion und somit indirekt auf die Genexpression kontrollieren HMG-CoA-Reduktasehemmer wiederum die Expression anderer Enzyme, die eine bedeutende Rolle bei der Signaltransduktion spielen. Es konnte gezeigt werden, dass Lovastatin die Expression der Phosphatase PP1 hemmt<sup>115</sup>. Da PP1 ERK 1/2 dephosphoryliert, hat eine Abnahme der Phosphatase-Konzentration eine Steigerung der Phosphorylierung der MAP-Kinase und Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktionswege zur Folge. Es ist anzunehmen, dass ein ähnliches Phänomen für die Phosphorylierung von ERK 1/2 in der vorliegenden Arbeit verantwortlich ist.

Da p38 MAP-Kinase und ERK 1/2, wie oben erwähnt, eine wichtige Rolle für die Induktion redox-sensitiver Gene spielen, war der Statin-Entzug mit einer Erhöhung der Expression von



MCP-1 und Tissue Faktor verbunden. Die Tissue Faktor-Expressionssteigerung war so ausgeprägt, dass es auch zu einer Steigerung der Aktivität von Tissue Faktor an der Zellmembran kam, wie durch Messung der Tissue Faktor-induzierten Thrombinbildung aus Prothrombin gezeigt werden konnte.

Die durch Abbruch der Statin-Behandlung bedingte Erhöhung der MCP-1 Expression resultierte in einer signifikanten MCP-1 Freisetzung, die mittels ELISA-Technik gemessen wurde.

Wenig ist über die Effekte des Statin-Entzuges auf die zelluläre und vaskuläre Homöostase bekannt. In Arbeiten anderer<sup>116</sup> und der eigenen Gruppe<sup>117</sup> wurde beschrieben, dass der Abbruch der Statin-Behandlung in Mäusen mit einer Senkung der NO-Bioverfügbarkeit assoziiert war. Die Wirkung des Statin-Entzuges auf die endothelabhängige Relaxation läuft dabei auf zwei verschiedenen, aber komplementären Wege ab. Zum einen führt die überschüssige Aktivierung der GTPase RhoA, die wie Rac geranylgeranyliert wird, als Folge des Entzuges zu einer Unterdrückung der Expression der endothelialen NO-Synthase<sup>116</sup>. Zum anderen hat die durch die Unterbrechung der Statin-Behandlung bedingte Translokation von Rac an die Membran die Aktivierung der vaskulären NADPH-Oxidase zur Folge, was mit der Inaktivierung von NO durch ROS verbunden ist<sup>117</sup>.

Zusammenfassend weisen die Befunde in der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass der Entzug von Statinen in kultivierten glatten Muskelzellen die Expression von MCP-1 und TF via eine Aktivierung von ERK 1/2, p38 MAP-Kinase und NADPH-Oxidase induzierte.

### ***3. Die Bedeutung des Statin-Entzuges für die Klinik***

Es ist sicherlich schwierig, Schlüsse über die klinische Relevanz der vorliegenden Beobachtung zu ziehen, da der Effekt des Statin-Entzuges nur in kultivierten Zellen untersucht wurde, wobei hohe Dosen der HMG-CoA-Reduktasehemmer verwendet wurden. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass die Zahl der klinischen Befunde wächst, die eine Relevanz für die Situation am Menschen bei Statin-Entzug erlauben. Es konnte gezeigt werden, dass die Unterbrechung der Statin-Behandlung bei Menschen mit einer Erhöhung der Myokardinfarktrate einhergeht<sup>105-107</sup>.

## VI. Zusammenfassung

Die Wirkung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktasehemmer ist auf die Blockierung der Isoprenoid-Bildung in der Cholesterin-de-novo-Synthese zurückzuführen. Unter Statin-Behandlung von glatten Gefäßmuskelzellen kommt es im Zytoplasma zur Akkumulation der inaktiven GTPase Rac, die für ihre Aktivierung Geranylgeranylpyrophosphat zur Verankerung in die Plasmamembran benötigt. Nach Stimulation von Agonisten wie Angiotensin II und Thrombin hemmen Statine die Rac-abhängige NADPH-Oxidase, die eine wichtige Quelle der vaskulären Sauerstoffradikalproduktion (ROS) ist. Die Senkung der ROS-Bildung hat die Blockierung der Phosphorylierung von ERK 1/2 und p38 MAP-Kinase und der Expression redox-sensitiver Gene zur Folge.

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen an kultivierten glatten Muskelzellen zusammengefasst, die zeigen sollen, dass der Statin-Entzug in der Expression pro-inflammatorischer Gene resultiert, die eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung und Progression der Arteriosklerose spielen.

Es wurde nachgewiesen, dass der Entzug von Cerivastatin in vorbehandelten glatten Gefäßmuskelzellen zur Induktion von MCP-1 und Tissue Faktor (TF) mRNA führt. Die Steigerung der Expression von MCP-1 hat schließlich eine relevante MCP-1 Freisetzung zur Folge. Im Falle von TF ist die Expression so ausgeprägt, dass es auch zu einer Erhöhung der Aktivität von TF an der Zellmembran kommt.

Durch Zusatz von Geranylgeranylpyrophosphat und Mevalonsäure kann die Wirkung der HMG-CoA-Reduktasehemmer wieder aufgehoben werden. Unter dem Einfluss der Hemmstoffe PD98059, SB203580 und Diphenyliodonium (DPI) wird die durch Abbruch der Statin-Behandlung bedingte Expression des proarteriosklerotischen Faktors unterdrückt. Diese

Beobachtung lässt die Beteiligung von ERK 1/2, p38 MAP-Kinase und NADPH-Oxidase an der Signaltransduktion zu.

Der Entzug von Statinen führt zu einer Steigerung der Phosphorylierung der MAP-Kinasen und zu einer Verstärkung der ROS-Bildung. Da die Produktion von Sauerstoffradikalen vermutlich als Folge der Aktivierung der Rac-abhängigen NADPH-Oxidase ist, wurde der Effekt des Entzuges auf die Rac-Translokation in der Zelle untersucht. Es zeigte sich, dass die Unterbrechung der Behandlung mit HMG-CoA-Reduktasehemmer mit einer überschüssigen Translokation der GTPase vom Zytoplasma an die Plasmamembran verbunden ist.

Aus den erhobenen Befunden kann somit gefolgert werden, dass der Entzug von Statinen in einer Aktivierung von Rac und konsekutiver ROS-Bildung resultiert. Durch die Aktivierung der nachfolgenden Signaltransduktionskaskaden kommt es zu einer Induktion von MCP-1 und Tissue Faktor.

## VII. Summary

In addition to their lipid-lowering ability 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins) exert pleiotropic effects on the vascular wall which are mediated by their inhibitory effect on isoprenoid synthesis, including inhibition of Rac. Via this mechanism statins inhibit angiotensin II- and thrombin-mediated activation of the Rac-dependent NADPH oxidase which is known to generate reactive oxygen species (ROS). The decrease of ROS production leads subsequently to an attenuation of p38 MAP kinase and ERK 1/2 phosphorylation which control the expression of many redox-sensitive genes. The withdrawal of HMG-CoA reductase inhibitors deteriorates endothelial function.

The present study was performed in vascular smooth muscle cells to determine whether statin withdrawal results in an induction of proinflammatory genes involved in the development and progression of arteriosclerosis.

It was demonstrated that the removal of cerivastatin from pretreated vascular smooth muscle cells induced an increase in MCP-1 and tissue factor (TF) mRNA expression and enhanced MCP-1 secretion as well as cell surface TF activity.

In the presence of cerivastatin, this effect was mimicked by geranylgeranylpyrophosphate or mevalonate. Withdrawal-induced MCP-1 expression was sensitive to PD98059, SB203580, and diphenylene iodonium, suggesting an involvement of ERK 1/2, p38 MAP kinase, and the NADPH oxidase.

Withdrawal increased the activity of ERK 1/2 and p38 MAP kinase and enhanced radical production. Because the latter effect may result from a Rac-mediated activation of the NADPH oxidase, the effect of withdrawal on Rac translocation was studied.

It was shown that removal of statins was associated with an overshoot translocation of Rac to the plasma membrane.

These observations suggest that statin withdrawal results in the activation of Rac and enhanced oxidative stress. The subsequent activation of redox-activated signal-transduction cascades leads to the expression of MCP-1 and TF.

## VIII. Literaturnachweis

1. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000;101:207-213
2. Gruer PJ, Vega JM, Mercuri MF, Dobrinska MR, Tobert JA. Concomitant use of cytochrome P450 3A4 inhibitors and simvastatin. *Am J Cardiol* 1999;84:811-815
3. Anonymous. Choice of lipid-lowering drugs. *Med Lett Drugs Ther* 1998;40:117-122
4. Norman DJ, Illingworth DR, Munson J, Hosenpud J. Myolysis and acute renal failure in a heart-transplant recipient receiving lovastatin. *N Engl J Med* 1988;318:46-47
5. Gotto AM Jr. Statin therapy: where are we? Where do we go next? *Am J Cardiol* 2001;87:13B-18B
6. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301-1307
7. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-1389
8. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996;335:1001-1009
9. Werner N, Nickenig G, Laufs U. Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol* 2002;97:105-116

10. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1712-1719
11. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;343:425-430
12. Elson CE, Peffley DM, Hentosh P, Mo H. Isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis: potential application to cancer. *Proc Soc Exp Bio Med* 1999;221:294-311
13. Kalinowski L, Dobrucki IT, Malinski T. Cerivastatin potentiates nitric oxide release and eNOS expression through inhibition of isoprenoid synthesis. *J Physiol Pharmacol* 2002;53:585-595
14. Yoshida Y, Kawata M, Katayama M, Horiuchi H, Kita Y, Takai Y. A geranylgeranyltransferase for rhoA p21 distinct from the farnesyltransferase for ras p21s. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;175:720-728
15. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998;97:1129-1135
16. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 1998;273:24266-24271
17. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med* 1995;332:488-493
18. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, Zhang J, Boccuzzi SJ, Cedarholm JC, Alexander RW. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1995;332:481-487



19. O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 1997;95:1126-1131
20. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide*. 2001;5:88-97
21. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:9265-9269
22. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:4651-4655
23. Miwa K, Goto M, Lee JD, Matsuyama F, Shimizu H, Kato T, Hara A, Nakamura T. Supersensitivity of coronary arteries in variant angina to spasm induced by intracoronary acetylcholine. *Am J Cardiol* 1988;61:77-82
24. Furlong B, Henderson AH, Lewis MJ, Smith JA. Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 1987;90:687-692
25. Uttam GC, Hassis A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83:1774-1777
26. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000;101:1899-1906
27. Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* 1999;43:532-541
28. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 2000;6:1004-1010

29. Schmidt G, Sehr P, Wilm M, Selzer J, Mann M, Aktories K. Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* 1997;387:725-729
30. Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, Nishi H, Inoue N, Yokoyama M. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2001;154:87-96
31. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997;100:2153-2157
32. Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 1995;95:187-194
33. Darley-Usmar VM, McAndrew J, Patel R, Moellering D, Lincoln TM, Jo H, Cornwell T, Digerness S, White CR. Nitric oxide, free radicals and cell signaling in cardiovascular disease. *Biochem Soc Trans* 1997;25:925-929
34. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997;95:588-593
35. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1997;96:3602-3609
36. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840-844
37. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia: mechanisms, pathophysiological importance, and therapeutic interventions. *Semin Thromb Haemost* 2000;26:529-537

38. Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Konkol C, Sauer H, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT<sub>1</sub> receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol* 2001;59:646-654
39. Westhuyzen J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. *Ann Clin Lab Sci* 1997;27:1-10
40. Nunes GL, Robinson K, Kalynych A, King SB 3rd, Sgoutas DS, Berk BC. Vitamins C and E inhibit O<sup>2-</sup> production in the pig coronary artery. *Circulation* 1997;96:3593-3601
41. Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Ahlbory K, Linz W, Itter G, Rosen R, Böhm M, Nickenig G. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension* 2001;37:1450-1457
42. Griendling KK, Ushio FM, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* 1997;29:366-373
43. Morre DM, Lenaz G, Morre DJ. Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. *J Exp Biol* 2000;203:1513-1521
44. Morre DJ. Hormone- and growth factor-stimulated NADH oxidase. *J Bioenerg Biomembr* 1994;26:421-433
45. Babior BM. NADPH-oxidase: An Update. *Blood* 1999;93:1464-1476
46. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH-oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002;397:342-344
47. Segal AW. The NADPH-oxidase and chronic granulomatous disease. *Mol Med Today* 1996;2:129-135
48. Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in

- vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2175-2183
49. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griending KK. p22<sup>phox</sup> is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996;271:23317-23321
  50. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q, Taylor WR, Harrison DG, deLeon H, Wilcox JN, Griending KK. p22<sup>phox</sup> mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res* 1997;80:45-51
  51. Marumo T, Schini-Kerth VB, Brandes RP, Busse R. Glucocorticoids inhibit superoxide anion production and p22<sup>phox</sup> mRNA expression in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension* 1998;32:1083-1088
  52. Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, Brasier AR, Bode C, Runge MS. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47<sup>phox</sup> may participate in forming this oxidase in vitro and vivo. *J Biol Chem* 1999;274:19814-19822
  53. Sundaresan M, Zu-Xi Y, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995;270:296-299
  54. Görlach A, Brandes RP, Bassus S, Kronemann N, Kirchmaier CM, Busse R, Schini-Kerth VB. Oxidative stress and expression of p22<sup>phox</sup> are involved in the upregulation of tissue factor in vascular smooth muscle cells in response to activated platelets. *FASEB J* 2000;14:1518-1528
  55. Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986;59:612-619

56. Chamulitrat W, Hughes MF, Eling TE, Mason RP. Superoxide and peroxy radical generation from the reduction of polyunsaturated fatty acid hydroperoxides by soybean lipoxygenase. *Arch Biochem Biophys* 1991;290:153-159
57. Fleming I, Michaelis UR, Breidenkötter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, Busse R. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res* 2001;88:44-51
58. Sligar SG, Lipscomb JD, Debrunner PG, Gunsalus IC. Superoxide anion production by the autoxidation of cytochrome P450cam. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;61:290-296
59. Bondy SC, Naderi S. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol* 1994;48:155-159
60. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992;267:24173-24176
61. Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted vessels leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:6770-6774
62. Spector T, Hall WW, Krenitsky TA. Human and bovine xanthine oxidases. Inhibition studies with oxipurinol. *Biochem Pharmacol* 1986;35:3109-3114
63. Duerrschmidt N, Wippich N, Goettsch W, Broemme HJ, Morawietz H. Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:713-717
64. Bayraktutan U, Blayney L, Shah AM. Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup> in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1903-1911

65. Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91<sup>phox</sup> containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res* 2000;87:26-32
66. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase mox1. *Nature* 1999;401:79-82
67. Lassegue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91<sup>phox</sup> homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 2001;88:888-894
68. Clark RA. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infectious Disease* 1999;179:S309-S317
69. Henderson LM, Banting G, Chappel JB. The arachidonate-activable, NADPH-oxidase-associated H<sup>+</sup> channel. Evidence that gp91<sup>phox</sup> functions as an essential part of the channel. *J Biol Chem* 1995;270:5909-5916
70. Sathyamoorthy M, de Mendez I, Adams AG, Leto TL. p40<sup>phox</sup> down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem* 1997;272:9141-9146
71. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994;344:721-724
72. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annu Rev Physiol* 1986;48:657-667
73. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;222:1-15
74. Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlbory K, Bäumer AT, Linz W, Böhm M, Nickenig G. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:300-305

75. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74:1141-1148
76. Rajagopalan S, Kurz S, Muenzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996;97:1916-1923
77. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:136-147
78. Andreoli TE. Free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000;108:650-651
79. Fukui T, Lassegue B, Kai H, Alexander RW, Griendling KK. Cytochrome b-558 alpha-subunit cloning and expression in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Acta* 1995;1231:215-219
80. Martinez-Gonzalez J, Alfon J, Berrozpe M, Badimon L. HMG-CoA reductase inhibitors reduce vascular monocyte chemoattractant protein-1 expression in early lesions from hypercholesterolemic swine independently of their effect on plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis* 2001;159:27-33
81. Romano M, Diomedede L, Sironi M, Massimiliano L, Sottocorno M, Polentarutti N, Guglielmotti A, Albani D, Bruno A, Fruscella P, Salmona M, Vecchi A, Pinza M, Mantovani A. Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest* 2000;80:1095-1100
82. Diomedede L, Albani D, Sottocorno M, Donati MB, Bianchi M, Fruscella P, Salmona M. In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1327-1332
83. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, Shiomi M, Schoen FJ, Libby P. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses

- growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001;103:276-283
84. Igarashi M, Yamaguchi H, Hirata A, Tsuchiya H, Ohnuma H, Tominaga M, Daimon M, Kato T. Mechanisms of inhibitory effects of cerivastatin on rat vascular smooth muscle cell growth. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;40:277-287
85. Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* 2002;105:1756-1759
86. Duff JL, Marrero MB, Paxton WG, Schieffer B, Bernstein KE, Berk BC. Angiotensin II signal transduction and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cardiovasc Res* 1995;30:511-517
87. Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ. Transcription factor ATF2 regulation by JNK signal transduction pathway. *Science* 1995;267:389-393
88. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995;270:16483-16486
89. Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M, Paoletti R, Tremoli E. Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:265-272
90. Park JK, Muller DN, Mervaala EM, Dechend R, Fiebeler A, Schmidt F, Bieringer M, Schafer O, Lindschau C, Schneider W, Ganten D, Luft FC, Haller H. Cerivastatin prevents angiotensin II-induced renal injury independent of blood pressure- and cholesterol-lowering effects. *Kidney Int* 2000;58:1420-1430
91. Ortego M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Tunon J, Diaz C, Hernandez G, Egido J. Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis* 1999;147:253-261



92. Lo YY, Cruz TF. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem* 1995;270:11727-11730
93. Barnes PJ, Larin M. Mechanisms of disease: nuclear factor  $\kappa$ B - a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066-1071
94. Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 1997;275:1649-1652
95. De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK. Tumour necrosis factor alpha activates a p22<sup>phox</sup>-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 1998;329:653-657
96. Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 1994;266:H2568-H2572
97. Brandes RP, Viedt C, Beer S, Kreuzer J, Busse R, Görlach A. Thrombin-induced MCP-1 expression involves activation of the p22<sup>phox</sup>-containing NADPH oxidase in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 2001;85:1104-1110
98. Baetta R, Camera M, Comparato C, Altana C, Ezekowitz MD, Tremoli E. Fluvastatin reduces tissue factor expression and macrophage accumulation in carotid lesions of cholesterol-fed rabbits in the absence of lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:692-698
99. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998;83:952-959

100. Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, Valente AJ, Berliner JA, Drinkwater DC, Laks H, Fogelman AM. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemoattractant protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* 1991;88:2039-2046
101. Randolph GJ, Furie MB. A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro. *J Immunol* 1995;155:3610-3618
102. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. A perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809
103. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 1981;103:181-190
104. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 1991;30:10363-10370
105. Thomas M, Mann J. Increased thrombotic vascular events after change of statin. *Lancet* 1998;352:1830-1831
106. Heeschen C, Hamm CW, Laufs U, Snapinn S, Böhm M, White HD. Withdrawal of statins increases event rates in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2002;105:1446-1452
107. Laufs U, Wassmann S, Hilgers S, Ribaldo N, Böhm M, Nickenig G. Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of atorvastatin in healthy, normocholesterolemic men. *Am J Cardiol* 2001;88:1306-1307
108. Cross AR, Jones OT. The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem J* 1986;237:111-116

109. Jiang HB, Ichikawa Y. Neuronal nitric oxide synthase catalyzes the reduction of 7-ethoxyresorufin. *Life Sci* 1999;65:1257-1264
110. Xia Y, Roman LJ, Masters BS, Zweier JL. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *J Biol Chem* 1998;273:22635-22639
111. Sanders SA, Eisenthal R, Harrison R. NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase-generation of superoxide anion. *Eur J Biochem* 1997;245:541-548
112. Li Y, Trush MA. Diphenyliodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:295-299
113. Herkert O, Diebold I, Brandes RP, Hess J, Busse R, Görlach A. NADPH oxidase mediates tissue factor-dependent surface procoagulant activity by thrombin in human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2002;105:2030-2036
114. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griending KK. p38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1998;273:15022-15029
115. Skaletz-Rorowski A, Muller JG, Kroke A, Waltenberger J, Pulawski E, Pinkernell K, Breithardt G. Lovastatin blocks basic fibroblast growth factor-induced mitogen-activated protein kinase signaling in coronary smooth muscle cells via phosphatase inhibition. *Eur J Cell Biol* 2001;80:207-212
116. Laufs U, Endres M, Custodis F, Gertz K, Nickenig G, Liao JK, Böhm M. Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of Rho GTPase gene transcription. *Circulation* 2000;102:3104-3110

117. Vecchione C, Brandes RP. Withdrawal of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors elicits oxidative stress and induces endothelial dysfunction in mice. *Circ Res* 2002;91:173-179

## **IX. Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Busse bedanken, der mir die Möglichkeit gab, als Doktorandin in seinem renommierten Institut tätig zu sein.

Herrn PD Dr. med. Brandes möchte ich ebenfalls herzlich für seine gute Betreuung während meiner gesamten Doktorarbeit danken. Er war mit seinem Engagement und seiner Kompetenz eine hilfreiche Stütze.

Meinen Eltern und meinem Bruder bin ich für ihre Unterstützung während des Medizinstudiums sehr dankbar.

## **X. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Tu-Linh Ha

Wohnort: Siegenerstr. 3  
65936 Frankfurt am Main

Geburtstag: 16. August 1977

Geburtsort: Saigon (Vietnam)

Eltern: Vater: Kien Hung Ha  
Mutter: Phung My Khuu

Staatsangehörigkeit: deutsch

Religion: buddhistisch

### **Ausbildungsdaten:**

Grundschule: 1985 – 1989: Albrecht-Dürer-Schule  
in Frankfurt am Main

Mittelstufengymnasium: 1989 – 1994: Helene-Lange-Schule  
in Frankfurt am Main

Oberstufengymnasium: 1994 – 1997: Friedrich-Dessauer-  
Gymnasium in  
Frankfurt am Main

Abitur: Juni 1997

Studium: April 1998: Humanmedizin an der Johann  
Wolfgang Goethe-Universität

März 2003: 2. Staatsexamen

November 2004: 3. Staatsexamen

## **XI. Schriftliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

### **Effekt von Statin-Entzug auf die Genexpression kultivierter glatter Muskelzellen**

in dem Institut der Kardiovaskulären Physiologie

unter Betreuung und Anleitung von PD Dr. med. Ralf P. Brandes

~~mit Unterstützung durch~~ ohne sonstige Unterstützung

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- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wird in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology

Frankfurt, den -----

-----