

**DIE HEMMUNG DER RAS-ABHÄNGIGEN SIGNAL-
TRANSDUKTION DURCH 3-DEAZAADENOSIN
VERHINDERT DIE PROLIFERATION GLATTER
GEFÄßMUSKELZELLEN SOWIE DIE
NEOINTIMABILDUNG**

MONIQUE TRÖBS

INAUGURALDISSERTATION
INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Giessen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Die Hemmung der Ras-abhängigen Signaltransduktion
durch 3-Deazaadenosin verhindert die Proliferation
glatter Gefäßmuskelzellen sowie die Neointimabildung**

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Monique Tröbs

aus Erfurt

Gießen 2007

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
am Zentrum für Innere Medizin
Abteilung für Kardiologie/ Angiologie,
Leiter: Prof. Dr. med. Harald Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. Tillmanns

Gutachter: Frau PD Dr. Lips

Tag der Disputation: 3. Dezember 2007

Meinen Eltern
Petra und Rolf- Dieter Tröbs

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Pathogenese der Atherosklerose und Restenose.....	2
1.2. Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen.....	4
1.3. Zellzyklus	5
1.3.1. Zellzykluseintritt und frühe Zellzyklusprogression.....	5
1.3.2. Späte Zellzyklusprogression.....	6
1.4. Die Rolle der Signaltransduktion über Ras in der Pathogenese vaskuloproliferativer Erkrankungen	7
1.4.1. Struktur und Funktion der Ras-Proteine.....	7
1.4.2. Posttranslationale Modifikation von Ras.....	7
1.4.3. Einfluss von Methylierungsreaktionen auf die Aktivierung von Ras	9
1.4.4. Intrazelluläre Signaltransduktion über Ras.....	11
1.5. 3-Deazaadenosin.....	12
2. Fragestellung.....	15
3. Material und Methoden	16
3.1. Geräte	16
3.2. Chemikalien.....	18
3.3. Medikamente	20
3.4. Operationsbesteck.....	20
3.5. Antikörper.....	21
3.4. Inhibitoren	23
3.5. in vitro-Experimente.....	24
3.5.1. Zellkultur	24
3.5.2. Zellproliferation.....	24
3.5.3. „In Situ Cell Death Detection Kit“ (TUNEL Kit).....	25
3.5.4. Vitalitätstest	26
3.5.5. Bestimmung der Migrationsfähigkeit von VSMC	27
3.5.6. Western Blot.....	27
3.5.7. Durchflusszytometrie.....	32
3.5.8. Nachweis der Ras Translokalisierung	32

3.5.9.	Ras-Activation Assay	33
3.5.10.	Plasmide und Transfektion	34
3.5.11.	Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS).....	35
3.6.	in vivo-Experimente	36
3.6.1.	Versuchstiere und Tierhaltung	36
3.6.2.	pharmakologische Diäten	36
3.6.3.	Gruppeneinteilung	37
3.6.4.	Operation der Mäuse	37
3.6.5.	Entnahme der A. femoralis.....	40
3.6.6.	Schnittgewinnung	40
3.6.7.	Morphometrie	40
3.6.8.	Immunhistochochemischer Nachweis von PCNA	41
3.6.9.	Nachweis apoptotischer Zellen.....	42
3.6.10.	von Willebrand Färbung.....	42
3.7.	Statistik	43
4.	Ergebnisse	44
4.1.	3-Deazaadenosin hemmt dosisabhängig die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen in vitro	44
4.2.	3-Deazaadenosin hat keinen Einfluss auf Apoptose oder Nekrose glatter Gefäßmuskelzellen	47
4.3.	3-Deazaadenosin führt dosisabhängig zu einer Hemmung der Zellzyklusprogression in der G0/G1-Phase.....	50
4.4.	Einfluss von c3Ado auf die Aktivierung der PI3-Kinase/Akt und MAP-Kinase	53
4.5.	c3Ado verhindert die Membranbindung von Ras und somit dessen ... Aktivierung.....	55
4.6.	Der antiproliferative Effekt des c3Ado beruht auf der Inaktivierung . von Ras.	57
4.7.	Die c3Ado vermittelte Hemmung der Ras-Methylierung,	
	Aktivierung und Signalweiterleitung ist abhängig von der ICMT	59
4.8.	3-Deazaadenosin reduziert die Neointimabildung in vivo	62
4.9.	Effekt von c3Ado auf die Proliferation, Apoptose und	
	Reendothelialisierung in vivo.....	66

5. Diskussion.....	70
5.1. 3-Deazaadenosin hemmt die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen übereine Hemmung der Zellzyklusprogression.....	72
5.2. c3Ado verhindert die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt und des ERK- Signaltransduktionsweges über eine Hemmung der ICMT- abhängigen posttranslationalen Methylierung der Ras-Proteine.....	73
5.3. Einfluss von c3Ado auf die Neointimabildung nach Angioplastie	75
5.4. kein apoptotischer oder toxischer Effekt von c3Ado	77
6. Zusammenfassung	80
7. Abstract	82
8. Literaturverzeichnis	83
9. Abkürzungsverzeichnis.....	94
10. Publikationen	96
10.1. Veröffentlichungen.....	96
10.2. Abstracts	96
11. Lebenslauf	98
12. Danksagung.....	100

1. Einleitung

Vaskuloproliferative Erkrankungen stellen auch heute noch eine der Haupttodesursachen in der westlichen Welt dar.¹ Die momentanen präventiven oder therapeutischen Strategien konzentrieren sich auf eine Reduktion der Risikofaktoren (u.a.: Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Hyperlipidämie, Bluthochdruck) oder eine Wiederherstellung des Blutflusses mittels Angioplastie oder chirurgischer Revaskularisation (Bypass-Operation). Der Erfolg der invasiven Therapien wird allerdings durch einen hohen Prozentsatz von Wiederverschlüssen gemindert. Nach den anfänglich sehr positiven Ergebnissen der Ende der 1970er Jahre eingeführten Ballondilatation (PTCA) zeichneten sich schnell die Limitationen dieser Methode ab. Nicht selten kam es direkt nach Dilatation zu akuten Gefäßverschlüssen, auch zeigte sich in den ersten Monaten nach PTCA in 30-50 % der Fälle eine Restenose der erweiterten Gefäße.^{2,3}

Mit der Entwicklung von Stents, die nach Dilatation in den gedehnten Gefäßbereich eingesetzt werden (heute bei circa 80 % der Interventionen), sollte diese inakzeptabel hohe Rate von Wiederverschlüssen reduziert werden. Allerdings kommt es auch bei Einsatz dieser Stents in 30 % zu Restenosen. Die Stents sind zwar in der Lage das unmittelbare Wiederausziehen des Gefäßes nach Angioplastie (elastisches Recoil) zu verhindern, allerdings verstärken sie noch die Proliferation der intimalen glatten Gefäßmuskelzellen.⁴ Folge ist ein bis heute bestehendes Problem: die In-stent-Restenose.

Ein aktueller Ansatz ist die Beschichtung von Stents mit zellzyklushemmenden, antiproliferativen Substanzen. Die größten Erfahrungen liegen zurzeit für Paclitaxel und Rapamycin (Sirolimus) vor.

Doch auch nach Einlage dieser beschichteten Stents kann eine Restenosierung nicht vollständig verhindert werden.⁵ Zusätzlich besteht das Problem der späten Stentthrombose, so dass trotz der anfänglich sehr positiven Studien mit diesen Substanzen die Suche nach neuen, besseren Substanzen erforderlich ist.

20 % der Patienten mit Restenose benötigen letztendlich eine Bypassoperation. Doch auch danach kommt es jährlich bei 10- 30 % der Patienten zu einem Transplantatversagen aufgrund einer Stenosierung der venösen Bypässe.⁶

1.1. Pathogenese der Atherosklerose und Restenose

Die Atherosklerose ist eine chronische, multifaktorielle Erkrankung, deren Entstehung in einem ständig andauernden Reiz auf die Gefäßwand verstanden wird. Wichtige Risikofaktoren sind u.a. Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und Rauchen. Ihr ständiges Einwirken führt zur Dysfunktion oder Schädigung des Endothels. Folge ist eine chronische Entzündungsreaktion des Gefäßes mit Einwanderung von Leukozyten, Aktivierung und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie Aktivierung von Thrombozyten mit Thrombusbildung. Die eingewanderten Leukozyten akkumulieren in den entstehenden atherosklerotischen Läsionen und sezernieren zusammen mit den geschädigten Endothelzellen, Entzündungszellen, Thrombozyten und glatten Gefäßmuskelzellen multiple Wachstumsfaktoren und Zytokine. Diese vermitteln dann die Chemotaxis, die Migration und Proliferation oder Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen sowie die Synthese extrazellulärer Matrixproteine.⁷ In der Folge kommt es zu chronischen Umbauprozessen in der Gefäßwand mit Akkumulation von atherosklerotischem Gewebe und einer Hyperplasie der Intima.

Viele Studien betonen die Schlüsselrolle einer Entzündungsreaktion in allen Phasen der Atherosklerose von der Entstehung der Plaque bis hin zu thrombotischen Komplikationen.^{8,9} Zusätzlich zur Entzündung stellt die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen einen Schlüsselprozess sowohl in der Entstehung der Atherosklerose als auch bei restenotischen Prozessen dar.^{7,10,11} Ein Vorläufer der sich entwickelnden Läsionen scheint die Akkumulation von glatten Gefäßmuskelzellen in der Intima zu sein, welche sich beim Menschen bereits im Kindesalter entwickelt und im Alter verdickt.^{11,12}

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen. Diese sind nämlich in der Lage aus der Media oder sogar Adventitia in die entstehende Neointima einzuwandern.¹³

Auch eine Herkunft neointimaler glatter Gefäßmuskelzellen aus Endothelzellen scheint denkbar. In Studien konnte gezeigt werden, dass sich embryonale Endothelzellen zu mesenchymalen Zellen transdifferenzieren und „smooth muscle cell actin“ exprimieren können.^{13,14} Tierstudien zeigen, dass neointimale glatte Gefäßmuskelzellen ihren Ursprung auch aus Progenitorzellen, die aus dem Knochenmark stammen, oder anderen zirkulierenden Zellpools haben können.¹⁵⁻¹⁸ Zirkulierende Glattmuskelzell- Progenitorzellen konnten auch aus humanem peripheren Blut isoliert werden.¹⁹ Ungeachtet ihres Ursprungs sind diese Zellen maßgeblich an der Entwicklung der intimalen Hyperplasie und an der

Entstehung der fibrösen Deckkappe (fibrous cap) der atherosklerotischen Läsionen beteiligt.

In weiter fortgeschrittenen Läsionen formen glatte Gefäßmuskelzellen zusammen mit Fibroblasten und extrazellulärer Kalzifikation eine stabile, fibrokalzifizierte Läsion.

Die Faktoren, die zu einer Restenose führen sind im Wesentlichen elastisches Recoil (unmittelbares Zusammenziehen des Gefäßes nach Angioplastie), Intimahyperplasie und vaskuläres Remodelling.^{20,21}

Das akute Gefäßtrauma führt zu einer Verletzung der Gefäßwand mit Abscherung des Endothels. An der jetzt offen liegenden Gefäßwand lagern sich Thrombozyten an. Durch diese Thrombozytenaggregation kommt es zur Adhäsion, Akkumulation und Aktivierung inflammatorischer Zellen. Folge ist eine Entzündungsreaktion²² in der Gefäßwand. Dies führt zu einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren (z.B.: Interleukine, TNF, MCP-1) und Wachstumsfaktoren (z.B.: PDGF, bFGF), die den Zellzykluseintritt glatter Gefäßmuskelzellen aktivieren. Dadurch kommt es zur Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen sowie zu chronischen Umbauprozessen in der Gefäßwand (negatives Remodeling), die zu einer Hyperplasie der Intima führen.

Das unmittelbare elastische Recoil des Gefäßes kann durch den Einsatz von Stents verhindert werden. Allerdings verstärken die Stents die Proliferation der intimalen glatten Gefäßmuskelzellen⁴ und auch die Entzündungsreaktion in der Gefäßwand scheint nach Einlage von Stents ausgeprägter zu sein.

1.2. Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen

Mit wachsendem Verständnis über die molekularen Mechanismen von proliferativen Gefäßerkrankungen wurden einige Ansätze untersucht, um die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen zu hemmen. Zahlreiche antiproliferative Medikamente wie Heparine, ACE-Hemmer, Antagonisten gegen Wachstumsfaktoren wie Terbinafin oder Trapidil, Angiopeptin, zytostatische Agenzien wie Etoposide oder Doxorubicin wurden getestet, brachten aber nicht den erhofften Erfolg.²³ Dies kann zum einem auf Speziesunterschiede zum anderen auf falsche Dosierungen zurückzuführen sein.

Es zeigt sich darin aber auch, dass multifaktorielle Prozesse wie die Atherosklerose oder Restenose nicht durch die Hemmung eines einzelnen proliferativen oder inflammatorischen Stimulus zu beeinflussen sind. Aus diesem Grund liegt der Fokus des Interesses seit einigen Jahren in der Beeinflussung des Zellzyklus als gemeinsame Endstrecke multipler proliferativer Stimuli.

Die Hemmung des Zellzyklus kann durch pharmakologische Substanzen, gentherapeutische Ansätze oder Strahlentherapie erreicht werden.

Die zurzeit vielversprechendste Substanz ist das Makrolidantibiotikum Rapamycin (Sirolimus). Weitere Substanzen sind Paclitaxel (Taxol), das die Ausbildung von Mikrotubuli hemmt²⁴, Flavopiridol, das die ATP- bindende Seite der Zyklin-abhängigen Kinasen blockiert²⁵ oder CVT-313, das die Zyklin- abhängige Kinase 2 hemmt.²⁶ Ein möglicher Einsatz dieser Substanzen liegt, wie oben bereits für Rapamycin und Paclitaxel beschrieben, in der lokalen Anwendung z.B.: in der Beschichtung von Stents.

Ein weiterer Ansatz zur Reduktion der Restenoserate sind strahlentherapeutische Methoden.²⁷⁻²⁹ Diese Strahlentherapie erfolgt entweder mit Hilfe radioaktiver Drähte, sog. „seeds“ oder radioaktiven Lösungen, mit denen die dilatierten Gefäße über einen Zeitraum von wenigen Minuten bestrahlt werden. Auch die direkte Implantation von radioaktiven Stents ist möglich. Allerdings kommt es zum Auftreten von Nebenwirkungen wie der späten In- Stent-Thrombose oder der Ausbildung von Stenosen an den Enden der Stents („candy- wrapper“-Stenosen).

Die gentherapeutischen Ansätze reichen von „antisense“-Oligodesoxynukleotiden (AS-ODN) über Transkriptionsfaktor-„decoy“-Konstrukte bis hin zur Überexprimierung proliferationshemmender Gene.²³ So konnte gezeigt werden, dass „decoy-ODN“ gegen das Zellzyklusprotein E2F die Neointimabildung in peripheren und koronaren Bypässen signifikant verringern kann.^{6,30}

Die Zellzyklushemmung stellt somit den erfolgversprechendsten und effektivsten Ansatz zur Verhinderung vaskuloproliferativer Erkrankungen dar.

1.3. Zellzyklus

Ruhende Zellen (G₀) treten in die erste „gap“ Phase ein (G₁), in der die Zellzyklusproteinsynthese und-aktivierung stattfindet. In der nachfolgenden S-Phase findet die Replikation der DNA statt. Nach dem diese vollständig abgeschlossen wurde, treten die Zellen in eine weitere „gap“-Phase ein (G₂), wo sie für die Mitose vorbereitet werden. Restriktionspunkte am Übergang der G₁-Phase in die S-Phase und der G₂ in die Mitose-Phase kontrollieren den geordneten Übergang von einer Phase des Zellzyklus in die nächste.

1.3.1. Zellzykluseintritt und frühe Zellzyklusprogression

Zellzykluseintritt und -progression sind abhängig von der geordneten Expression und Aktivierung der „Cyclin-dependent“ Kinasen, die mit ihren regulatorischen Untereinheiten, den Zyklinen, Holoenzyme bilden. In der frühen G₁-Phase akkumulieren die D-Zykline (D1, D2 und D3) und bestimmte Cdks (Cdk4 und Cdk6). Der Spiegel des PCNA (proliferating cell nuclear antigen) steigt. PCNA stimuliert die Aktivität der DNA-Polymerase δ ³¹ und assoziiert mit dem ZyklinD/Cdk4-Komplex.³²⁻³⁴

Die simultane erhöhte Expression der Zykline D, E und A in Zusammenarbeit mit PCNA koordiniert die DNA-Replikation, indem sie die Progression von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus regulieren.³²

Der koordinierte Ablauf des Zellzyklus wird außerdem durch Cdk-Inhibitoren reguliert, wie p21^{Cip1} und p27^{Kip1}. Diese binden an Zyklin-abhängige Kinasen und verhindern so deren Aktivierung.³⁵

p27^{Kip1} bindet an die G₁-Phase-Zyklin/ Cdk-Komplexe und hemmt deren Aktivierung. Es ist in ruhenden Zellen stark exprimiert und wird nach mitogener Stimulation schnell herunterreguliert.^{35,36}

Dessen Herunterregulation und stöchiometrische Bindung an die ZyklinD/ Cdk4/ PCNA-Komplexe führt zur Aktivierung eines weiteren G₁-Phase Cdks, dem Cdk2. Dies formt mit den später in der G₁-Phase exprimierten Zyklinen E und A Komplexe. ZyklinD/Cdk4 und

ZyklusinE/Cdk2 sind an der Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) am R-Punkt beteiligt. Unter ruhenden Bedingungen liegen die verschiedenen Isoformen des Transkriptionsfaktors E2F als inaktiver Komplex gebunden an das hypophosphorylierte Retinoblastom-Protein vor. Nach mitogener Stimulation führt der ZyklusinD/Cdk4-Komplex zu einer Hyperphosphorylierung von Rb, wodurch es zur Dissoziation vom E2F kommt. Freigewordene E2Fs kontrollieren die Expression von Genen, die für die weitere Zellzyklusprogression durch die S-, G2- und M-Phase benötigt werden (z.B.: Zyklusin E, Zyklusin A, Cdk1).³⁷

Als weiteres Zellzyklus-inhibierendes Protein ist p21^{Cip1} bekannt. Mehrere dieser Proteine hemmen die Zyklusin/Cdk-Komplexe ähnlich wie p27^{Kip1}. Es wird jedoch erst am Ende der G1-Phase hochreguliert.^{35,36}

Die Zellzyklusprogression wird außerdem durch Transkriptionsfaktoren moduliert, die die Expression von Cdk und Cdk-Inhibitoren aktivieren.³⁸⁻⁴¹ So aktivieren z.B. das Tumorsupressorprotein p53, GAX und GATA 6 die Expression der Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1}.⁴²⁻⁴⁴

Auch NO kann zum Zellzyklusarrest führen, indem es CDK2 und Zyklusin A herunterreguliert und p21 hochreguliert.⁴⁵

1.3.2. Späte Zellzyklusprogression

Nach vollständiger DNA- Replikation steigt der Proteingehalt des Zyklusin B an. Nach Komplexbildung mit Cdk1 formen sie zusammen den „Mitosis promoting factor“ (MPF). Um MPF aktivieren zu können, muss zuerst Cdk1 am Threonin 161 durch die Cdk aktivierende Kinase (CAK) phosphoryliert und am Thyrosin (Tyr15) durch die Cdc 25 Phosphatase dephosphoryliert werden.⁴⁶ Aktivierter MPF initiiert die Prophase und leitet gleichzeitig den proteolytischen Abbau von Zyklusin B ein. Dadurch kommt es zur Anaphase.⁴⁷ Anschließend wird Cdk1 durch Dephosphorylierung am Thr161 inaktiviert und der Zellzyklus kann von vorn beginnen.

1.4. Die Rolle der Signaltransduktion über Ras in der Pathogenese vaskuloproliferativer Erkrankungen

1.4.1. Struktur und Funktion der Ras- Proteine

Die Ras- Proteine gehören zur Familie der Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine). Sie funktionieren wie ein Schalter zwischen 2 verschiedenen Konformitätszuständen. Aktiv, wenn sie GTP gebunden haben, inaktiv, als GDP gebundene Form.⁴⁸ Bei der Aktivierung, z.B. durch Wachstumsfaktoren, wird GDP durch GTP ausgetauscht, wodurch das Protein aktiviert wird. Ras selbst besitzt eine GTPase, wodurch GTP zu GDP hydrolysiert wird und Ras wieder in einen inaktiven Zustand überführt wird.⁴⁹

Es sind 3 Ras Proto-Onkogene bekannt: H-Ras, N-Ras und K-Ras, die 4 Ras Proteine codieren H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B und N-Ras.⁵⁰

An die Membran gebundenes aktiviertes Ras ist in der Lage Signale von außerhalb der Zelle (wie z.B. von Wachstumsfaktoren) zum Zellkern weiterzuleiten. Es ist an der Regulation von Proliferation, Zelldifferenzierung, Migration und Apoptose beteiligt.⁵¹ Durch Mutationen aktiviertes Ras ist bei circa 30 % der menschlichen Tumoren zu finden. In den letzten Jahren gab es darüber hinaus zunehmende Hinweise auf eine zentrale Rolle der Ras-abhängigen Signaltransduktionswege in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen.⁵²

1.4.2. Posttranslationale Modifikation von Ras

Damit Ras aktiviert werden kann, muss es an der Zellmembran verankert werden.⁵³⁻⁵⁵ Ras-Proteine können jedoch erst nach einer Reihe von posttranslationalen Modifikationen an ihrem carboxyterminalen Ende mit der Zellmembran assoziieren.⁵⁶

Das C-terminale Ende besteht aus dem sog. CAAX-Motiv (C= Cystein, A= aliphatische As, A= aliphatische As, X= beliebige As).⁵⁷ Dieses Motiv dient als Signal für die folgenden Modifikationen:

1. Farnesylierung des Cysteins des CAAX-Motivs
2. Abspaltung der 3 Aminosäuren (AAX) nach Farnesylierung
3. Methylierung des farnesylierten Cysteins

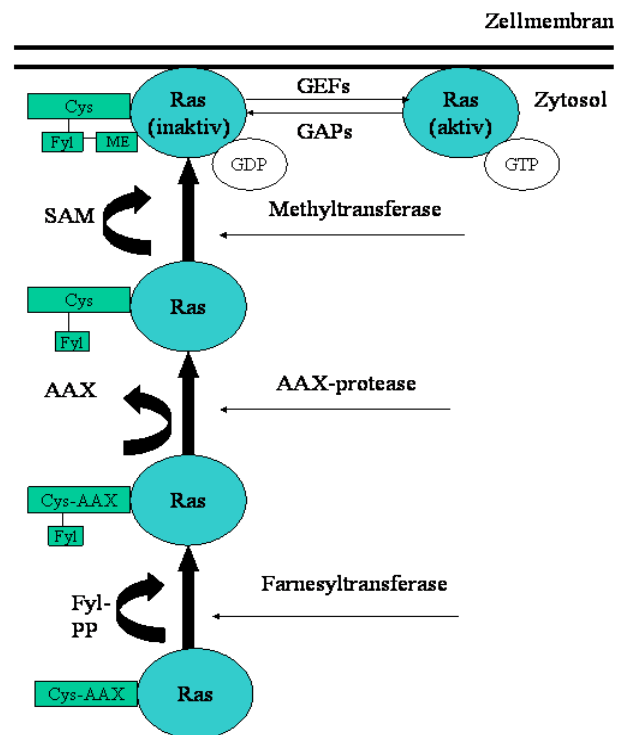


Abb. 1: posttranslationale Modifikation von Ras

Der erste Schritt ist die Farnesylierung des Cysteins mit Hilfe einer Farnesyltransferase. Dabei wird ein 15Carbonpolyisoprenlipid über eine stabile Thioesterbindung an das Cystein angehängt.⁵⁶

Anschließend werden mit Hilfe einer Rce1protease die AAX Aminosäuren von dem farnesylierten Cystein abgespalten.⁵⁸ Das jetzt freigelegte carboxyterminale Farnesylcystein dient als Substrat für die Isoprenylcysteincoylmethyltransferase (ICMT), die das farnesylierte Cystein methyliert. Als Methylgruppendonator dient S-adenosylmethionin (SAM).⁵⁹

Der Sinn dieser Modifizierungen besteht darin, dass C-terminale Ende des Ras-Proteins in eine hydrophobe Domäne zu verwandeln, um so die Assoziation mit der Zellmembran zu ermöglichen.⁵⁶

1.4.3. Einfluss von Methylierungsreaktionen auf die Aktivierung von Ras

Biologische Methylierungsreaktionen spielen eine unentbehrliche Rolle in zellulären Funktionen.

Die zwei hauptsächlichlichen Methylgruppendonatoren sind Folate und SAM.

Zelluläre Methylierungsreaktionen sind beteiligt an der Synthese von Phospholipiden, Nucleinsäuren und Aminosäuren, sie regulieren die Expression von Genen und können Proteine modifizieren. So spielt die DNA-Methylierung eine kritische Rolle in der Genregulation und der Karzinogenese.⁶⁰ Für den geordneten Ablauf von Methylierungsreaktionen werden Methyltransferasen benötigt, die die Methylgruppe vom SAM auf einen Akzeptor übertragen können.

Der letzte Schritt in der Modifizierung des carboxyterminalen Endes der Ras-Proteine ist die Methylierung des farnesylierten Cysteins. Dafür benötigt die Zelle Methyltransferasen, insbesondere die spezifisch Ras methylierende ICMT. Diese katalysiert die reversible Carboxymethylveresterung des farnesylierten Cysteins. Als Methylgruppendorer dient dabei SAM. Eine Hemmung der ICMT führt folglich zu einer verminderten Methylierung und somit Aktivierung der Ras-Proteine.⁶¹

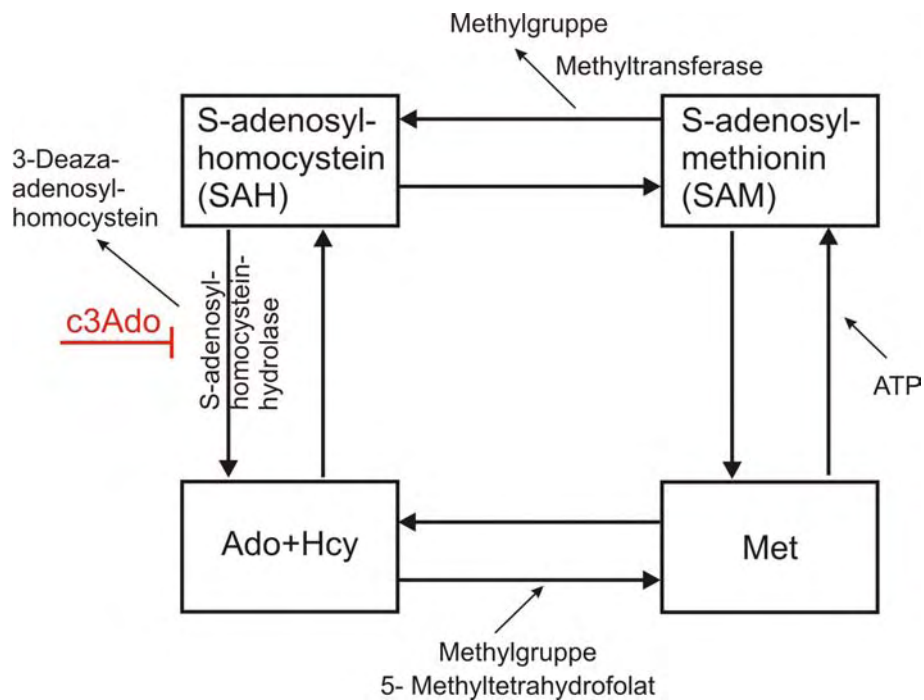


Abb. 2: Wirkung von c3Ado auf den Methylierungszyklus

Bei Methylierungsreaktionen dient SAM als Methylgruppendonor. Die Methylgruppe wird mit Hilfe einer Methyltransferase (ICMT) auf den Akzeptor übertragen. Als weiteres Produkt entsteht S-adenosylhomocystein (SAH). SAH wird durch die S-adenosylhomocysteinhydrolase (SAH-hydrolase) in Adenosin und Homocystein gespalten. Homocystein wird sofort remethyliert, wodurch Methionin entsteht. Als Methylgruppendonor dient bei dieser Reaktion 5-Methyltetrahydrofolat.⁶² 3-Deazaadenosin hemmt die SAH-hydrolase, wodurch das Reaktionsgleichgewicht zum SAH verschoben wird. Dies hemmt zelluläre Methyltransferasen und somit Methylierungsreaktionen.

1.4.4. Intrazelluläre Signaltransduktion über Ras

Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und bioaktiven Peptiden, z.B.: PDGF, bFGF, Endothelin-1 (ET-1) und Angiotensin II ist an der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen beteiligt.⁶³⁻⁶⁵ Alle diese mitogenen Stimuli laufen letztendlich im Zellzyklus zusammen. Ras ist eine zentrale Komponente dieser Signaltransduktionswege. Die Zellen können so die ruhende G₀-Phase verlassen und in den Zellzyklus eintreten.^{66,67} Aktiviertes Ras stimuliert eine Vielzahl an nachfolgenden Signaltransduktionskaskaden, zum Beispiel über Raf, die PI3- Kinase, RalGDS und Rho.⁶⁸

Einer der am besten charakterisierten Signalwege unterhalb des Ras ist der MAP-Kinase Signaltransduktionsweg.

Ras-GTP bindet Raf (MAP kinase-kinase-kinase), wodurch dieses aus dem Zytosol an die Zellmembran transloziert. Dort wird Raf dann phosphoryliert und somit aktiviert. Raf interagiert dann mit MEK (MAP-kinase-kinase) und phosphoryliert diese. MEK wiederum bindet an ERK (MAP-Kinase) und phosphoryliert diese. Die Phosphorylierung führt dabei zur Aktivierung dieser Kinasen.

Die Aktivierung der MAP-Kinase führt dann zu einer Reihe nachfolgender Reaktionen. Über eine Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen ist die MAP-Kinase beispielsweise unmittelbar an der Zellzyklusprogression beteiligt. Cdk formen mit ihren regulatorischen Untereinheiten, den Zyklinen, Holoenzyme, was schließlich in einer Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins Rb und nachfolgenden Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus resultiert.^{67,69}

Der Signaltransduktionsweg über ERK1/2 ist außerdem wichtig für die Herunterregulation der CDK-Inhibitoren, wie p21^{cip/waf1} und p27^{Kip1} wodurch ihre hemmende Aktivität auf den Zellzyklus verhindert wird.⁷⁰⁻⁷²

Ras vermittelt über den Ras/ Raf/ MEK/ ERK 1/2 Signaltransduktionsweg die Proliferation und Migration von VSMC und ist somit auch an der Restenose nach PTCA beteiligt.⁷³

Ein anderer Ras-Effektor ist die PI3-Kinase. Eine Hauptaufgabe dieser Kinase ist die Konversion von Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat zu Phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃). Erhöhte zelluläre Spiegel an PtdIns(3,4,5)P₃ führen zu einer Aktivierung von Akt/PKB⁵⁰. Akt ist über eine Vielzahl nachgeordneter Signalmoleküle an der Regulation multipler Prozesse wie dem Zellmetabolismus, der Proteinsynthese, der Proliferation oder der Apoptose beteiligt.⁷⁴ So kann aktiviertes Akt zum Beispiel die Forkhead-Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und dadurch inaktivieren.⁷⁵ In ruhenden

Zellen sind die Forkhead-Transkriptionsfaktoren nicht phosphoryliert. Sie binden an den Promotor des $p27^{Kip1}$ ^{76,77}, aktivieren diesen und gewährleisten dadurch eine konstante Transkription der $p27^{Kip1}$ mRNA und somit einen konstanten Proteinspiegel dieses Zellzyklusinhibitors. Werden die Forkhead-Transkriptionsfaktoren nun durch aktivierte Akt/PKB phosphoryliert, so dissoziieren sie vom $p27^{Kip1}$ -Promotor und führen zu einer Hemmung der Transkription von $p27^{Kip1}$. Dies ist eine Voraussetzung für den Eintritt glatter Gefäßmuskelzellen in den Zellzyklus.⁷⁸ Auch konnte gezeigt werden, dass Akt in vitro $p21^{cip/waf1}$ phosphoryliert und dadurch dessen zellzyklus-hemmende Wirkung vermindern kann.⁷⁹

1.5. 3-Deazaadenosin

3-Deazaadenosin (c3Ado) ist ein Strukturanalogon von Adenosin, dessen Wirkung nicht über den Adenosinrezeptor vermittelt wird.⁸⁰

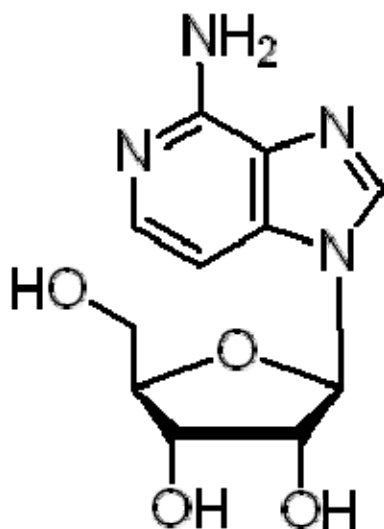


Abb. 3: Strukturformel von c3Ado

Strukturformel übernommen von www.sigmaaldrich.com

Es ist einer der stärksten Inhibitoren der SAH-hydrolase, was zu einer Akkumulation von SAH und SAM in der Zelle führt. SAH ist ein potenter Hemmstoff für zelluläre Methyltransferasen.⁸¹ 3-Deazaadenosin ist somit ein Hemmstoff für zelluläre Methylierungsreaktionen.

In *in vitro* Zellkulturversuchen zeigten sich antiinflammatorische und immunmodulatorische Fähigkeiten dieser Substanz. So konnte gezeigt werden, dass c3Ado die Leukozytenadhäsion und ICAM-1 Biosynthese in TNF- α stimulierten humanen Endothelzellen hemmt.⁸² Außerdem schwächte c3Ado das chemotaktische Potenzial von Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten und die Phagozytosefähigkeit von Monozyten und Makrophagen.⁸³

Daüber hinaus hemmt es die Lipopolysaccharid-(LPS) induzierte TNF- α und Interleukin 1 β induzierte Liberation von Leukozyten^{84,85} und verhindert die zelluläre Produktion von Arachidonsäure und ROS.^{86,87}

Aufgrund seiner antiinflammatorischen Fähigkeiten wurde es in klinischen Studien bei Patienten mit rheumatoider Arthritis getestet⁸⁸ und seine antivirale Aktivität gegenüber dem HIV untersucht.⁸⁹

In vorausgegangenen *in vivo* Studien unserer Arbeitsgruppe konnten Walker et al.⁹⁰ zeigen, dass c3Ado die frühe Plaqueentstehung und die Neointimabildung in der absteigenden Aorta in C57BL/J6 Mäusen unter 9-wöchiger atherogener Diät hemmt. Außerdem zeigten sie, dass es zu einer deutlichen Abnahme der endothelialen VCAM-1 und ICAM-1 Expression und Monocytenadhäsion an die Gefäßwand kommt.

Die Aktivität der Gene für ICAM-1 und auch VCAM-1 wird durch den nukleären Faktor NF- κ B reguliert.

C3Ado beeinflusst auch die Expression weiterer Moleküle, die an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind. So kann es z.B. die Thrombin- stimulierte Expression von Platelet- derived growth factor und die Expression von endothelialen Leukozyten- Adhäsionsmolekül-1 in humanen Endothelzellen verhindern.⁹¹

In einer weiteren *in vivo* Studie unserer Arbeitsgruppe nutzen Langheinrich et al.⁹² apoE- knockout Mäuse, da bei diesen die atherosklerotische Plaqueentstehung eher der des Menschen gleicht. Auch in dieser Studie zeigte sich, dass Zugabe von c3Ado zu einer atherosklerotischen Diät über 12 und 24 Wochen im Gegensatz zur atherosklerotischen Diät allein die Plaqueentstehung hemmt. Dies war assoziiert mit einem signifikant erniedrigten Blut-Homocysteinspiegel.

Erhöhte Homocysteinwerte gelten als ein wichtiger Risikofaktor für die Atherosklerose in koronaren, zerebralen und peripheren Gefäßen.⁹³ Außerdem konnten sie erneut zeigen, dass die endotheliale ICAM-1 und VCAM-1 Expression sowie die Anzahl CD11b- positiver Monocyten/ Makrophagen am Endothel und in der Neointima unter c3Ado-Gabe reduziert wird.

Aufgrund seiner antiinflammatorischen Eigenschaften wurde c3Ado von unserer Arbeitsgruppe in einem Ratten- Modell getestet ⁸⁰, bei dem durch Gabe von Lipopolysaccharid eine septische Kardiomyopathie induziert wurde. Intraperitoneale Gabe von c3Ado 30 min vor Endotoxin-Stimulation und 4h nach LPS-Gabe konnte die Einschränkung der myokardialen Dysfunktion verhindern. Dies war assoziiert mit einer verminderten ICAM-1 und VCAM-1 Expression und daraus folgender Einwanderung von PMN und Makrophagen in die Myozyten. Dies resultierte in einer verminderten lokalen Freisetzung von ROS und NO. Außerdem konnte Behandlung mit c3Ado den Endotoxin vermittelten Anstieg der plasmatischen Konzentration an TNF- α signifikant verringern. Des Weiteren konnte ein hemmender Effekt von c3Ado auf die Aktivität von nF- κ B gezeigt werden. Jeong et al ⁹⁴ hatten diesen hemmenden Einfluß von c3Ado auf die nF- κ B Aktivität schon in vitro an einer Makrophagenzelllinie zeigen können.

Die Arbeitsgruppe von Ciang et al ⁹⁵ konnte zeigen, dass der Zusatz von c3Ado zur University of Wisconsin Lösung zu einem vermindertem Ischämie- und Reperfusionsschaden in einem isolierten Lungenmodell führt.

In einem vollständig allogenen Herztransplantationsmodell der Ratte wurde der Einfluss von c3Ado auf die zelluläre Infiltration des Transplantates untersucht, was einen Impuls für die frühe Abstoßung nach Transplantation darstellt.⁹⁶

Durch die 2mal tägliche Gabe von c3Ado konnte ein Einwandern von MCHII positiven Zellen, T-Zell-Rezeptor- positiven Zellen (R73) sowie ED1 positiven Monozyten und Makrophagen reduziert werden. Dies war assoziiert mit einer fast vollständigen Hemmung der ICAM-1 und VCAM-1 Expression am 1. und 3. postoperativen Tag. Allerdings konnte durch die Gabe von c3Ado die Apoptose nicht verhindert werden und auch die Überlebenszeit des Transplantates konnte nicht verlängert werden.

2. Fragestellung

3-Deazaadenosin ist ein potenter Hemmstoff der SAH-hydrolase und somit ein Inhibitor zellulärer Methylierungsreaktionen.

Vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass c3Ado die Ausbildung chronischer atherosklerotischer Läsionen verhindern kann. Die genauen zellulären Effekte und der molekulare Wirkmechanismus dieser durch c3Ado vermittelten Effekte sind allerdings weitestgehend unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung des molekularen Wirkungsmechanismus des c3Ados. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob c3Ado auch einen Effekt auf die Restenoseentstehung nach akuten Gefäßläsionen hat und somit ggf. ein interessantes Molekül zur Hemmung unterschiedlicher vaskuloproliferativer Erkrankungen darstellt.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte

Adobe Photoshop 4.0 LE	ADOBE SYSTEMS INC., San Jose, USA
Akku Pipettierhilfe	HIRSCHMANN, Eberstadt
Biofuge Fresco und Pico	HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau
Blockthermostat 1302	HAEP LABOR CONSULT, Bovenden
Chamber Slide 4 well	NALGE NUNC INTERNATIONAL; Naperville
Cellstar® Zellkulturflaschen	GREINER BIO- ONE GmbH; Frickenhausen
Combitips	EPPENDORF, Hamburg
Deckgläser (24x50mm)	MENZEL GLÄSER
Elektrophoresekammer	BIO-RAD, München
Elisa- Platte (96 Loch Platte)	GREINER BIO- ONE GmbH; Frickenhausen
FACS cell sorter EPICs Altra	BECKMAN COULTER, Miami, USA
Feinwaage	SARTORIUS, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	
Leica DMRB	LEICA MICROSYSTEMS WETZLAR; Wetzlar
Grobwaage	SARTORIUS, Göttingen
Hämatocytometer	
High Voltage Power Pack P30	BIOMETRA, Göttingen
Hyperfilm ECL	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
Inkubator 1000	HEIDOLPH, Kehlheim
KS 300 Imagine System	
Release 3.0	CARL ZEISS VISION GmbH; Hallbergmoos
Kunststoff Pipetten, steril	FALCON BECTON DICKINSON LABWARE; Franklin Lakes, NJ USA
Kryostat Leica CM 1900	LEICA MICROSYSTEMS NUSSLOCH GmbH; Nussloch
MACselect selections-Kit	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach
MACselect Magnet und Säulen	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer Ikamag	IKA LABORTECHNIK, Staufen

Mikroskop Leica DMIL	LEICA MICROSYSTEMS WETZLAR GmbH; Wetzlar
Mikrotiterplatte	GREINER, Frickenhausen
Mini-Blot Gelapparatur	BIO-RAD, München
Multiwell Zellkulturplatten	GREINER BIO- ONE GmbH; Frickenhausen
Nitrozellulose Blot-Membran (Hybond ECL)	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
PC Pentium 600	UNI-COMP, Giessen
Photometer SLT Spectra	SLT LABINSTRUMENTS, Crailsheim
Pipetten	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen, steril	GREINER BIO- ONE GmbH; Frickenhausen
Polypropylen Röhrchen 15ml/50ml	GREINER BIO- ONE GmbH; Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,65/1,5/2ml	EPPENDORF, Hamburg
Röntgenkassette	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
Scanner (Scan Maker III)	MICROTEK, Ratingen
Schüttler Duomax 1030	HEIDOLPH, Kehlheim
Serologische Einmalpipetten	BECKTON DICKINSON, Heidelberg
Sterile Zellkultur-Arbeitsbank	HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau
SuperFrost®Plus Objektträger	R.LANGENBRINK; Emmendingen
Transwell- Platten	CORNING INCORPORATED; Corning NY USA
Whatman-Filterpapier	SCHLEICHER&SCHÜLL, Dassel
Zellschaber	GREINER BIO- ONE GmbH; Frickenhausen
Zentrifuge Hettich Roxita /RP	HETTRICH ZENRIFUGEN; Tuttlingen

3.2. Chemikalien

30% Acrylamidstammlösung	
(8% Bisacrylamid)	ROTH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	SIGMA, Steinheim
Antibody diluent reagent solution	ZYMED LABORATORIES INC. San Francisco, USA
Aprotinin	SIGMA, Steinheim
Aqua dest.	BRAUN, Melsungen
BSA	
(Bovines Serum Albumin)	BIO-RAD, München
Bromphenolblau	ROTH, Karlsruhe
Dulbecco's 1x PBS	
(Phosphate buffered saline)	PAA LABOR. Linz, Österreich
ECL Plus	
(Western blotting detection reagent)	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
Ethanol	RIEDEL-DE HAEN, Seelze
Fugene	ROCHE, Basel; Schweiz
Goat Serum	ZYMED LABORATORIES INC., San Francisco, USA
Glycerol	SIGMA, Steinheim
Glycin	ROTH, Karlsruhe
HCL 37,3% (rauchend)	SIGMA, Steinheim
Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	B. BRAUN MELSUNGEN AG, Melsungen
Leupeptin	SIGMA, Steinheim
Methanol	RIEDEL DE HAEN, Seelze
2-Mercaptomethanol	SIGMA, Steinheim
Milchpulver	BIO-RAD, München
NaCl	ROTH, Karlsruhe
Natrium Deoxycholot	SIGMA, Steinheim
Natrium Orthovanadat	ACROS, Geel, Belgien
NP40 (Igepal Ca-630)	SIGMA, Steinheim
Ocadaic acid	SIGMA, Steinheim
Para- Formaldehyd	SIGMA, Steinheim

PCNA Staining Kit	ZYMED LABORATORIES INC., San Francisco, USA
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	SIGMA, Steinheim
Protein Assay (A,B,C)	BIO-RAD, München
Rainbow marker	AMERSHAM, Braunschweig
Ras activation assay kit	UPSTATE CELL SIGNALING SOLUTIONS, Lake Placid, USA
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	PIERCE BIOTECHNOLOGY Rockford,IL, USA
Salzsäure 37,3 % rauchend	SIGMA, Steinheim
SDS ultra pure (Sodium Dodecyl Sulfate)	ROTH, Karlsruhe
TEMED (N,N,N,N-Tetra-Methylthylenediamin)	BIO-RAD, München
Trizma Base	SIGMA, Steinheim
Trypanblau- Lösung	SIGMA, Steinheim
Trypsin	CLONETICS CELLSYSTEM; St.Katharinen
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaureat)	SIGMA, Steinheim

3.3. Medikamente

Atropinsulfat-Lösung 0,5mg/ml GmbH, Isofluran-Baxter	FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND Bad Homburg BAXTER DEUSCHLAND GmbH, Unterschleißheim
Ketamin Incesa 50mg/ml Lysostypt®	INCRESA ARZNEIMITTEL GmbH, Freiburg BRAUN/AESULAP AG & Co. KG, Tuttlingen
Rompun® 2 % Xylocain® 2 %	BAYER VITAL GmbH, Leverkusen ASTRA ZENECA GmbH, Wedel

3.4. Operationsbesteck

1 Schere Typ BC 61 R	AESULAP AG & Co. KG, Tuttlingen
1 Schere Typ BC 60 R	AESULAP AG & Co. KG, Tuttlingen
1 Schere nach Vannas Typ OC 498 R	AESULAP AG & Co. KG, Tuttlingen
2 kleine Pinzetten Typ OC 21 R	AESULAP AG & Co. KG, Tuttlingen
1 Pinzette Typ 12-505-10	MARTIN Medizin Technik, Tuttlingen
1 gerader Führungsdraht (20cm lang, 0,5mm dick)	COOK Deutschland GmbH, Mönchengladbach
Fäden Ethilon 6-0 (Nadel P-3)	JOHNSON & JOHNSON Intl, St- Stevens-Woluwe,Belgium
Spritzen Injekt F 1ml	B. BRAUN, Melsungen
Spritzen Injekt 5ml	B. BRAUN, Melsungen
Injektionsnadeln BD Microlance™3	BECTON, DICKINSON and Company, Drogheda, Co. Louth, Ireland

3.5. Antikörper

Primärantikörper

	pAkt (Ser473)	pFKHR(Thr24)/ pFHKRL1(Thr32)	pPDK1 (Tyr373/376)	p27(F-8) sc- 1641
Wirt	Kaninchen	Kaninchen	Kaninchen	Maus
Isotyp	IgG polyklonal	IgG polyklonal	IgG polyklonal	IgG monoklonal
Konzentration	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	500 µg/ 0,25 ml
verwendete Konzentration	1: 500	1: 500	1: 500	1: 500
Lagertemperatur	-20°C	-20°C	-20°C	4-8°C
Bezug	Cell Signaling	Cell Signaling	Cell Signaling	Santa Cruz

	p21 (sc- 397)	pRb (Ser807/811)	Cyclin A (H-432)	Cyclin B (M- 20)
Wirt	Kaninchen	Kaninchen	Kaninchen	Kaninchen
Isotyp	IgG polyklonal	IgG polyklonal	IgG polyklonal	IgG polyklonal
Konzentration	200 µg/ml		100 µg/ml	200 µg/ml
verwendete Konzentration	1: 500	1: 1000	1: 500	1: 500
Lagertemperatur	4-8°C	-20°C	4°C	4°C
Bezug	Santa Cruz	Cell Signaling	Santa Cruz	Santa Cruz

	anti-Cyclin D1	Cyclin E (M-20)	p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	anti-RAS clone RAS10
Wirt	Kaninchen	Kaninchen	Maus	Maus
Isotyp	IgG polyklonal	IgG polyklonal	IgG monoklonal	IgG monoklonal
Konzentration	200 µg/ 200 µl	200 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ 100 µl
verwendete Konzentration	1: 1000	1: 200	1: 4000	1: 1000
Lagertemperatur	-20°C	4°C	-20°C	-20°C
Bezug	Upstate	Upstate	Cell Signaling	Upstate

	pRaf	von Willebrand
Wirt	Kaninchen	Kaninchen
Isotyp	IgG polyklonal	IgG polyklonal
verwendete Konzentration	1: 1000	1:10
Lagertemperatur	-20°C	2-8°C
Bezug	Cell Signaling	Dako Cytomation

Sekundärantikörper Western blot

	Anti-Maus	Anti-Kaninchen
Isotyp	IgG-HRP	IgG-HRP
Wirt	Ziege	Ziege
Konzentration	200 µg/500 µl	200 µg/500 µl
verwendete Konzentration	1: 2000	1: 2000
Lagertemperatur	2- 8° C	2- 8° C
Bezug	Santa Cruz	Santa Cruz

Sekundärantikörper Immunhistochemie

	Alexa Fluor 546 Anti- Kaninchen	Alexa Fluor 488 Anti- Maus
Isotyp	IgG	IgG
Wirt	Ziege	Ziege
Konzentration	2 mg/ml	2 mg/ml
verwendete Konzentration	1: 200	1: 200
Lagertemperatur	4- 8°C	4- 8°C
Bezug	Molecular Probes Eugene, Oregon; USA	Molecular Probes Eugene, Oregon; USA

3.4. Inhibitoren

Substanz	Hemmung	Hersteller
Adenosin-2',3'-dialdehyd (Adox)	S-adenosylhomocystein-hydrolase	Sigmaaldrich
AGGC	Isoprenylcysteinocarboxylmethyltransferase	Biomol GmbH, Hamburg
AGC	Isoprenylcysteinocarboxylmethyltransferase	Biomol GmbH, Hamburg

3.5. in vitro-Experimente

3.5.1. Zellkultur

Humane glatte Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien (HCASMC) wurden von der Firma CellSystems® (CellSystems® Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen) bezogen. Die Kultivierung erfolgte in Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 (Firma CellSystems®).

Alle Arbeiten mit den Zellen wurden an der sterilen Zellkultur-Arbeitsbank und mit sterilen Materialien und Lösungen durchgeführt.

3.5.2. Zellproliferation

Um den Einfluss von c3Ado auf das Proliferationsverhalten von VSMCs zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet: zum einen die direkte Zählung der Zellzahl mittels einer Neubauer-Kammer und zum anderen die Anwendung eines Zellproliferations-ELISA, (BrdU-ELISA).

Für die direkte Bestimmung der Zellzahl wurden glatte Gefäßmuskelzellen auf Sechsfach-Zellkulturplatten ausgesät, pro Platte 35.000.

Nach 48 h Kultivierung in Wachstumsmedium wurde die Zellzahl einer dieser Platten durch Auszählen in der Neubauer-Kammer bestimmt. Diese Zahl diente als Anfangszellzahl und wurde als 100 % gesetzt. Die restlichen Zellen wurden erneut mit Wachstumsmedium stimuliert und je nach Kondition mit verschiedenen Konzentrationen c3Ado (10, 50 und 100 μ M) versetzt.

Nach weiteren 48 h wurde auch deren Zellzahl durch Auszählen in einer Neubauer-Kammer bestimmt.

Der Zellproliferations-ELISA beruht auf dem Prinzip, dass nach Zugabe des Pyrimidinanalogons BrdU dieses anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird.

Für diesen Versuch wurden HCASMC auf 96well Mikrotiter-Platten ausgesät. Pro well 7000 Zellen. Nach 24 h wurden die Zellen mit serumfreiem Medium ruhend gesetzt. Schon jetzt erfolgte die Zugabe der Inhibitoren.

Nach weiteren 24 h wurde Wachstumsmedium auf die Zellen gegeben, um sie zur Proliferation durch im Medium enthaltene Wachstumsfaktoren zu stimulieren. Auch jetzt erfolgte die erneute Zugabe der Inhibitoren.

20 h nach Beginn der Proliferation wurden 10 µl/well BrdU labeling solution auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte über 4 h bei 37 °C.

Anschließend wurde das Medium durch Klopfen entfernt und es erfolgte die Zugabe von 200 µl/ well Fixierungslösung, durch die die DNA denaturiert wird. Dieser Schritt ist notwendig, damit das inkorporierte BrdU von einem Antikörper erreicht werden kann.

Die Fixierungslösung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen. Nach dem Ausklopfen der Lösung wurden 100 µl/ well „anti- BrdU working solution“ auf die Zellen gegeben. Nach 90 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen 3mal mit 200 µl Waschpuffer gespült.

Die jetzt gebildeten Immunkomplexe konnten mit Hilfe einer Substratlösung sichtbar gemacht werden. 100 µl dieser Lösung wurden bei Raumtemperatur für 20-30 Minuten auf den Zellen belassen. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 25 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt.

Mit Hilfe eines ELISA-Readers konnte die Farbentwicklung quantifiziert werden. Die entwickelte Farbe und somit die Absorption korreliert direkt mit der Menge an synthetisierter DNA und somit der Anzahl proliferierender Zellen.

3.5.3. „In Situ Cell Death Detection Kit“ (TUNEL Kit)

Bei der Apoptose entstehen spezifische DNA-Bruchstücke. Diese können an ihrem freien 3'OH- Ende mit Hilfe der terminalen Deoxynucleotidyltransferase nachgewiesen werden.

Das verwendete TUNEL-Kit (Terminal desoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) besteht aus einer Enzymlösung, die die terminale Deoxynucleotidyltransferase erhält und aus einer Markierungslösung, die eine Nukleotid-Mischung in einem Reaktionspuffer enthält.

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden auf beschichteten Objektträgern ausgesät. Nachdem die Zellen dort 2 Tage proliferierten, wurden sie für 24 h mit den zu testenden Konzentrationen an c3Ado versetzt. Zur Positivkontrolle wurde die Apoptose mit 1:1000 verdünnten Actinomycin D eingeleitet.

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Die für 1 h in 4 % PFA fixierten Zellen wurden nach einem Waschgang in PBS für 2 Minuten in eine 4 °C kalte Permeabilisationslösung (0,1 % Triton X-100 gelöst in 0,1 % Natriumcitratlösung) gestellt. Nach einem erneuten Waschgang in PBS erfolgte die Inkubation der Zellen mit der TUNEL Reaktionslösung für 1 h bei 37 °C. Zur Negativkontrolle erfolgte die Inkubation unbehandelter Zellen ohne terminale Deoxynukleotidyltransferase.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen 3mal in PBS gewaschen. Zum Abschluss wurde ein Dapi enthaltendes Eindeckmedium (1 µl/ml Dapi) auf die Zellen gegeben

Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica.

Zunächst wurden 200 Zellen mit Hilfe der Zellkernfärbung (Dapi) ausgezählt. Die apoptotischen Zellen weisen eine Grünfluoreszenz auf, wodurch ihre Anzahl im Bereich der vorher ausgezählten Zellen durch einfaches Auszählen bestimmt werden konnte.

Anschließend wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen zu den 200 vorher ausgezählten Zellen ins Verhältnis gesetzt, wodurch die Apoptoserate bestimmt werden konnte.

3.5.4. Vitalitätstest

Das Prinzip dieses Testes besteht darin, dass bei lebenden Zellen mit intakter Zellmembran bestimmte Farbstoffe nicht in das Zellinnere gelangen können, während abgestorbene Zellen den Farbstoff in sich aufnehmen und dadurch blau anfärben.

Zur Ermittlung der Anzahl abgestorbener bzw. vitaler Zellen wurden 50 µl Zellsuspension mit der gleichen Menge einer 4 %-igen Trypanblaulösung vermischt.

Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurden 20 µl dieser Lösung in eine Neubauer-Zählkammer überführt und unter 10facher Vergrößerung wurden vier Quadrate der Kammer im Phasenkontrast lichtmikroskopisch ausgezählt.

Anschließend erfolgte die Berechnung der Konzentration vitaler Zellen über folgende Formel:

$$\text{Anzahl vitale Zellen in \%} = \frac{\text{Anzahl gefärbte Zellen}}{\text{Gesamtzahl der Zellen}} \times 100 \%$$

3.5.5. Bestimmung der Migrationsfähigkeit von VSMC

Die Migrationsfähigkeit der Zellen wurde mit Hilfe von 12well-Transwell-Platten der Firma Corning Incorporated untersucht.

Die Einsätze dieser Platten bestehen an ihrer Unterseite aus einer Polycarbonatmembran. Diese besitzt unregelmäßig angeordnete 8 µm große Poren, durch die die Zellen migrieren können. Um nach dem Durchwandern eine bessere Adhäsion der Zellen an der Unterseite der Membranen zu ermöglichen, wurden diese mit Fibronektin beschichtet.

Der Migrationsreiz wurde ausgelöst durch Zugabe von 20 ng/ml PDGF-BB.

Die Zellen wurden vor dem Versuch 24 h mit serumfreien Medium (SmBM + 0,5ml Gentamycin/ AmphotericinB) ruhend gesetzt.

Die untere Kammer der Transwell-Platten wurde mit 600 µl Medium gefüllt. Je nach Kondition erfolgte die Zugabe von 20 ng/ml PDGF-BB und 10, 50 oder 100 µM c3Ado. In die obere Kammer wurden 100 µl Zellsuspension (5×10^4 Zellen) gegeben.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Platten für 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂.

Danach wurde die Zellsuspension abgezogen und die Membran 1x mit PBS gewaschen. Auf der Oberfläche verbliebene Zellen konnten mit Hilfe eines Baumwolltupfers abgelöst werden. Die sich an der Unterseite angehefteten migrierten Zellen wurden 2 Minuten in 70 % Methanol fixiert und anschließend mit Dapi gefärbt.

Die Anzahl der Zellen wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 40facher Vergrößerung in 3 randomisierten Feldern ausgezählt.

3.5.6. Western Blot

Proteinbestimmung:

DC Protein Assay der Firma BioRad:

Reagent A

1-5 % Natriumhydroxid

<1 % Natriumtartrat

<1 % Kupfersulfat in destilliertem Wasser

Reagent B

<1 % Lithiumsulfat

<1 % Tungstische Säure

<1 % Molybden Säure

<1 % Salzsäure

<1 % Phosphorische Säure in destilliertem Wasser

Reagent S

5-10 % Natriumdodecylsulfat in destilliertem Wasser

RIPA Puffer:

1 x PBS ohne Calcium und Magnesium

1 % NP 40

0,5 % Natriumdeoxycholat

0,1 % SDS

ad 500ml H₂O, Lagerung bei +4° C

Inhibitoren (bei jedem Ansatz frisch hinzugeben)

10 µl/ml von 10 mg/ml PMSF in Isopropanol

30 µl/ml Aprotinin

10 µl/ml 100 mM Natrium Orthovanadat

1 µg/µl Leupeptin in H₂O

10 mM Okadaic acid in H₂O

10 x Probenpuffer

3,3 ml 3,75 M Tris pH 6,8

2 g SDS

5 ml Glycerol

3 mg Bromphenolblau

1 ml 2-Mercaptomethanol

ad 10 ml

5 x Elektrophoresepuffer

15 g Tris

72 g Glycin

5 ml 10 %iges SDS dazugeben

pH 8,3, ad 1000 ml H₂O

Transferpuffer

25 mM	Tris	3,03 g
192 mM	Glycin	14,4 g
20 %	Methanol	200 ml
0,1 %	SDS (optional)	10 ml 10 % SDS

ad 1 Liter H₂O,
Aufbewahrung bei 4° C

Strippingpuffer

Restore™ Western Blot Stripping Puffer der Firma Pierce Biotechnology Inc.,
Rockford, IL

Waschpuffer

1x PBS
0,1 % Tween 20 (vor Gebrauch zugeben)
pH 7,6
ad 1 Liter H₂O

Blocklösung

1 x PBS
0,1 % Tween
7,5 % Magermilchpulver

Gele

Es wurden Fertiggele der Firma BioRad mit den Porengrößen 7,5 %, 10 %, 12 % und 4-15 % (Gradientengel) genutzt.

Präparation der Zellysate

Der erste Schritt beim Western Blot ist das Lysieren der Zellen. Für eine Zellkulturflasche mit 25 cm² Fläche wurden 100 µl Lyse-Puffer (RIPA plus Inhibitoren) auf die Zellen pipettiert. Danach wurden sie mit einem Zellscraper von der Wachstumsfläche abgelöst und 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Zur Gewinnung der Proteinsuspension wurden die Zellen in einer vorgekühlten Biozentrifuge 15 Minuten mit 13000 Umdrehungen bei 4 °C zentrifugiert.

Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde ein kommerziell erhältlicher Assay (DC Protein Assay der Firma BioRad) verwendet, der auf der modifizierten Methode nach Lowry beruht.

BSA (Bovines Serum Albumin 0,17 µg; 0,35 µg; 0,7 µg; 1,4 µg) wurde als interner Standard verwendet, um den Proteingehalt in µg/µl zu bestimmen. Der RIPA-Puffer wurde als extra Probe gemessen und das Ergebnis vom Proteingehalt der Proben abgezogen. Von den Proben wurde 5 µl in je eine Küvette gegeben. Die Proben wurden mit Aqua dest. auf 10 µl aufgefüllt und in alle Küvetten wurde 50 µl Reagenz A' (1000 µl Reagenz A, 20 µl Reagenz S) und 400 µl Reagenz B zugegeben.

Nach 15 Minuten Inkubationszeit war der Farbumschlag abgeschlossen und die maximale Absorption bei 570,8 nm konnte mittels eines Photometers bestimmt werden.

Jede Proteinbestimmung erfolgte doppelt, um so Pipettierungenauigkeiten durch das Bilden eines Mittelwertes zu minimieren.

Proteinaufbereitung

Alle folgenden Schritte der Proteinaufbereitung fanden auf Eis statt. Pro Probe wurden 20 µg Gesamtprotein eingesetzt.

Das der Proteinmenge entsprechende Lysat-Volumen wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, ein zehnfach konzentrierter Ladepuffer zugegeben und bis auf das gewünschte Endvolumen mit Aqua dest. aufgefüllt. Das im Ladepuffer enthaltene SDS umhüllt bei diesem Schritt die Proteine und versieht sie so entsprechend ihrer Länge mit einer negativen Ladung.

Ein Gewichtsstandard aus Proteinen unterschiedlicher Größe, welche später auf dem Gel sichtbare Banden bilden, wurde wie die Lysate aufbereitet und in einer Tasche des Gels parallel zu den Proben geladen. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben 5 Minuten gekocht.

Elektrophorese

Während der Elektrophorese wandern Moleküle entsprechend ihrer Ladung und ihrer Größe in einem elektrischen Feld unterschiedlich schnell in Richtung der angelegten Spannung. Die Elektrophorese dient so der Separation unterschiedlicher Moleküle, um deren spezifischen Nachweis zu erleichtern. Die Porengröße des Polyacrylamidgels ist hierbei für die unterschiedliche Laufgeschwindigkeit der Proteine je nach ihrer Größe verantwortlich.

Die Elektrophoresekammer des verwendeten vertikalen Systems besteht aus einer oberen und einer unteren Kammer. Das zwischen den beiden Glasplatten befindliche Gel bildet die einzige Verbindung zwischen den beiden Kammern und gewährt den Stromfluss von Kathode zu Anode. Nach Befüllung der Kammern mit Elektrophoresepuffer wurden die aufbereiteten Proteinlysate in die entsprechenden Geltaschen geladen. Die Elektrophorese lief mit 90 V über einen Zeitraum von 1,5 h. Die sichtbaren Banden des Gewichtsstandards zeigten hier die ausreichende Laufweite der Proteine an.

Für den weiteren Nachweis wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und auf eine etwa gleich große Nitrozellulosemembran gelegt. Nach 15minütigem Equilibrieren in Transferpuffer wurden Gel und Membran in einer Klemmvorrichtung in der Blotkammer fixiert. Die Proteine wurden unter einer Spannung von 100 V über eine Stunde aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Die nach dem Blot auf der Membran erkennbaren farbigen Gewichtsstandards dienten als Kontrolle für einen effektiven Transfer. Die Membran wurde entweder direkt für die weitere Immundetektion verwendet oder bei +8 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Immundetektion

Zunächst wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in Blocklösung inkubiert. Dies diente dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen. Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper in der entsprechenden Konzentration in Milchpulverlösung verdünnt und über Nacht auf die Membran gegeben.

Um nichtgebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran anschließend 3 x 5 Minuten in Waschpuffer geschwenkt und der Überstand verworfen. Jetzt wurde der Sekundärantikörper in der entsprechenden Konzentration nach den Angaben des Herstellers für 1 h auf die Membran gegeben. Anschließend erfolgte ein neuer Waschgang. Die Detektion der spezifischen Proteine erfolgte mittels eines verstärkten Chemilumineszenz-Systems (ECL+) der Firma Amersham. Die Membran wurde für 5 Minuten in der ECL+ Lösung inkubiert, wobei die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase; HRP) die chemilumineszierende Lösung aktivierte.

Anschließend wurde die Membran in einer Dunkelkammer auf einem hochsensitiven Röntgenfilm exponiert und der Film entwickelt.

3.5.7. Durchflusszytometrie

Die Zellen wurden durch 5minütige Inkubation mit Trypsin von ihrer Unterlage abgelöst und über Nacht in 70 % Methanol fixiert.

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 100 µg/ml RNase (Oncogene Research Products, Cambridge, Massachusetts USA) und 10 µg/ml Propidium Jodid für 1h bei 37°C inkubiert.

Die Untersuchung der Zellen auf ihren DNA-Gehalt erfolgte nun in einem Hochgeschwindigkeitsdurchflusszytometer (EPICs Altra, Beckman Coulter, Miami Florida; USA).

3.5.8. Nachweis der Ras Translokation

Zunächst wurde die Translokation von Ras an die Zellmembran mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung untersucht.

Dazu wurden HCASMC auf beschichteten Objektträgern ausgesät. Nachdem die Zellen dort 3 Tage proliferierten, wurden sie ruhend gesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe der zu testenden Substanzen in folgenden Konzentrationen: 50 und 100 µM c3Ado, 20 und 50 µM Adox. Eine erneute Zugabe dieser Substanzen erfolgte nach 21 h.

Eine 15minütige Aktivierung der Zellen erfolgte nach 24 h durch Zugabe von Wachstumsmedium.

Vor Beginn der Färbung wurden die Objektträger in PBS gewaschen und für 10 Minuten in 2 % PFA fixiert. Anschließend erfolgte eine 15minütige Rehydrierung in PBS bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Ziegenerum inkubiert. Dieser Schritt dient dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen.

Als Primärantikörper diente der Anti-RAS Antikörper der Firma Upstate. Mit diesem wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:50 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Danach wurden sie 2 x 5 Minuten in PBS gewaschen.

Im Anschluss erfolgte die 1stündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Alexa fluor goat anti- mouse 488) in einer Verdünnung von 1:200.

Anschließend erfolgte ein erneuter Waschgang.

Zum Schluss wurde ein DAPI (1 μ l DAPI auf 1 ml Vectashield®) enthaltendes Eindeckmedium auf die Zellen gegeben.

Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica.

Eine weitere Möglichkeit die Translokalisierung von Ras an die Plasmamembran zu untersuchen, ist eine Auftrennung der Ras-Proteine in die zytosolische und die membrangebundene Fraktion. Dazu wurden Zellen nach 24 stündiger Vorinkubation mit c3Ado 10 Minuten in Wachstumsmedium aktiviert. Anschließend wurden die Zellen mit folgendem Puffer lysiert: 20 mM Tris- HCL (pH 7,5), 3 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1 mM DDT, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml Leupeptin und 10 μ g/ml Aprotinin. Das Lysat wurde in einer Ultrazentrifuge bei 100.000 x g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (zytosolische Fraktion) wurde abgehoben und das Pellet (membrangebundene Fraktion) wurde in dem Lyse-Puffer mit 2 % Triton X-100 gelöst. Für die Elektrophorese wurden äquivalente Mengen der membrangebundenen und der zytosolischen Fraktion in ein 12 % Tris-HCL Gel geladen. Alle weiteren Schritte erfolgten wie beim Western Blot beschrieben. Als Primärantikörper diente der anti-Ras clone 10 Antikörper in einer Verdünnung von 1:20000.

3.5.9. Ras- Activation Assay

Verwendete Puffer:

5 x Mg^{2+} Lyse/Wasch- Puffer:	1 ml 5 x Mg^{2+}
	0,1 % Glycerol in 4 ml dAqua gelöst
	10 μ g/ml Aprotinin
	10 μ g/ml Leupeptin
	1 mM Natriumorthovanadat
	25 mM Natriumfluorid

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in 25 cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät und proliferierten bis zu einer Dichte von 85 %. Anschließend wurden sie für 24 h ruhend gesetzt unter gleichzeitiger Zugabe der Inhibitoren. Nach 21 h erfolgte die erneute Zugabe der Inhibitoren.

Die Stimulierung der Ras-Aktivierung erfolgte nach 24 h durch 15minütige Inkubation der Zellen in Wachstumsmedium.

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskalten PBS gewaschen.

Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml Lysepuffer pro Zellkulturflasche und anschließendem scrapen der Zellen. Das Lysat wurde in Eppendorfgefäße auf Eis überführt und danach für 5 Minuten in der auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 14000 x g zentrifugiert. Nach Abheben des Überstandes erfolgten die Proteinbestimmung nach Bradford und der anschließende Volumenausgleich mit Lysepuffer.

Immunpräzipitation

Pro Probe wurden 10 µl Raf-1 RBD (Ras assay Reagent) Agarosebeads zugegeben und für 45 Minuten bei 4°C unter Rotation inkubiert.

Danach wurden die Proben 10 Sekunden bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Anschließend wurden die Beads 3mal mit Waschpuffer gewaschen.

Nach Zugabe von 40 µl 2x Laemmli Puffer wurden die Proben 5 Minuten gekocht und anschließend zentrifugiert.

Für die Elektrophorese wurden pro Tasche 20 µl der Proben in ein 12 % Tris-HCL Gel geladen. Alle weiteren Schritte erfolgten wie beim Western Blot beschrieben.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolge bei einer Verdünnung von 1 µg/ml.

Alternativ und für die in vivo Versuche wurde ein sensitiverer, auf einem ELISA basierender Ras activity assay benutzt. Der Assay wurde genau nach Herstellerangaben angewendet. (Ras GTPase Chemi ELISA kit, Active Motif, Rixensart, Belgium).

3.5.10. Plasmide und Transfektion

Die Zellen wurden kotransfiziert, in dem der Zellkultur equimolare Mengen des pMACS K^k II Plasmids und des Plasmids mit der kodierenden Sequenz des zu untersuchenden Proteins in einem Verhältnis von 1:3 (H-Ras cDNA (activated) in pUSEamp(Q61L Mutant) Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid; USA) zugegeben wurden. Die Transfektion erfolgte mit Fugene der Firma Roche.

Für eine 35 mm Zellkulturschale wurden 6 µl Liposomen zu 100 µl Opti-MEM (Gibco Brl, Rockville, Maddison; USA) hinzugegeben und mit 2 µg Plasmid-DNA gemischt. Dieses Gemisch wurde dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde

das Gemisch auf Zellen mit serumfreien Medium pipettiert. Nach 4 h erfolgte die Zugabe von Wachstumsmedium.

Mit dieser Methode konnte eine Transfektionseffizienz von 20-30 % erreicht werden.

3.5.11. Magnet- aktivierte Zellsortierung (MACS)

Nach 24 h wurden die transfizierten Zellen trypsinisiert und mit magnetischen MACSelect K^k -II Micro Beads (MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach, Deutschland) markiert. Die erfolgreich transfizierten Zellen (K^k -II positiven) und nicht transfizierten Zellen (K^k -II negativen) wurden mit Hilfe von MS+/RS+Säulen (MILTENYI BIOTEC), welche einem magnetischen Feld ausgesetzt wurden, selektiert und anschließend in 96well Platten erneut ausgesät.

Die positiv selektierten Zellen waren zu >85 % positiv für die K^k-II Expression.

Nach 12h erfolgte ein Mediumwechsel mit FCS-haltigem Medium und die Zugabe von 50 µM c3Ado. Die weitere Bearbeitung der Zellen erfolgte nach dem Protokoll des Cell Proliferating ELISA, BrdU. Die Inkubation mit der BrdU labeling solution erfolgte allerdings für 8 h bei 37 °C.

Mit Hilfe eines ELISA-Readers konnte anschließend die Menge der synthetisierten DNA bestimmt werden.

3.6. in vivo- Experimente

3.6.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Die in der Studie verwendeten C57BL\J6 Mäuse wurden von der Firma Charles River (CHARLES RIVER; Sulzfeld; Deutschland) bezogen.

Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Mäuse in Gruppen von höchstens 2 Tieren in Käfigboxen in einem klimatisierten Tierstall mit konstantem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Jeden zweiten Tag wurde ein Wasser und Futterwechsel durchgeführt.

3.6.2. pharmakologische Diäten

1. atherogene Diät

Das atherogene Futter wurde von der Firma Altromin; Lage, Deutschland bezogen. Es ist hinsichtlich Aminosäuren, Mineralstoffe und Vitamine genauso zusammengesetzt wie das Standardfutter nach EG-Richtlinie, lediglich die Rohnährstoffe unterscheiden sich wie folgt:

Standardfutter:		atherogenes Futter:	
Rohprotein:	225 mg/kg	Rohprotein:	15,4 g/kg
Rohfett:	5 g/kg	Rohfett:	10,8 g/kg
		Cholesterin:	10 g/kg
Umsetzbare Energie:	3000 kcal/kg	Umsetzbare Energie:	3793,3 Kcal/kg

2. atherogene Diät mit c3Ado-Zusatz

Dem atherogenen Futter wurde 25 bzw. 50 mg/kg 3- Deazaadenosin zugesetzt (fertig bezogen von der Firma Altromin). Die täglich aufgenommene Dosis betrug 0,075 bzw. 0,15 mg.

3.6.3. Gruppeneinteilung

Die Mäuse wurden zufällig in drei gleichgroße Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1(n=7): atherogene Diät

Gruppe 2(n=7): atherogene Diät + 25 mg/kg c3Ado

Gruppe 3(n=7): atherogene Diät + 50 mg/kg c3Ado

3.6.4. Operation der Mäuse

Zur Vorbereitung der Narkose wurde zunächst 1 ml Rompun® (2 %ig) mit 4 ml Ketanest® gemischt. Von dieser Lösung wurden dann 0,5 ml 1:1 mit NaCl verdünnt. Des Weiteren wurde 1 ml Atropin mit 4 ml NaCl verdünnt, anschließend wurden 0,5 ml dieser Lösung nochmals mit 0,5 ml NaCl verdünnt.

Die Narkoseeinleitung erfolgte durch Inhalation von Isofluran®. Zusätzlich wurden 0,1 ml der oben beschriebenen Lösungen subkutan in einen Hinterlauf der zu operierenden Maus injiziert.

Nach vorsichtiger Entfernung des Fells und Desinfektion des Operationsgebietes wurde die Haut seitlich des Gefäßverlaufes in der Mitte des Hinterbeins eingeschnitten und nach proximal erweitert. Danach erfolgte die Freilegung des Gefäß-Nerven-Stranges und die Präparation der einzelnen Leitungsbahnen. Dabei wurde zunächst die A. femoralis bis zum Abgang der A. femoralis profunda präpariert und anschließend proximal dieses Abgangs bis zur A iliaca externa. Somit konnten Arterie und Vene von einander getrennt werden, was die spätere Entnahme der Arterie erleichterte. Nach Auftrennung der Leitungsbahnen an der A. femoralis profunda erfolgte die vorsichtige Verlagerung des N. femoralis nach lateral, um eine intraoperative Schädigung zu vermeiden.

Anschließend wurden die Ligaturen angebracht. Zunächst der distalen A. femoralis, dann der A. femoralis profunda und schließlich der A. iliaca communis. Diese Ligatur erfolgte möglichst proximal, um eventuell abgehende Anastomosen mit unterbinden zu können. Durch Festziehen der Ligaturen wurde nun der Blutfluss unterbunden. Die anschließende Applikation von Xylocain® auf das Op- Gebiet führte zu einer Weitstellung der A. femoralis profunda. Dadurch wurden der Einschnitt in diese Arterie und auch die Einführung des Führungsdrahtes erleichtert. Über eine in den Schnitt eingesetzte gebogene Injektionsnadel als Führungsschiene wurde der Dilatationsdraht in die Arterie eingeführt

und bis in die A. iliaca communis vorgeschoben. Der Draht verblieb für eine Minute in der Arterie. Um eine unnötig lange Ischämie zu vermeiden, wurden während dieser Zeit die Ligaturen gelockert. Nach Ablauf der Dilatationszeit wurden sie wieder gestrafft, um den Draht mit möglichst geringem Blutverlust entfernen zu können. Die A. femoralis profunda wurde nach Entfernung des Drahtes mit Hilfe eines doppelten chirurgischen Knotens ligiert. Anschließend erfolgte die Entfernung der anderen Ligaturen. Die Leitungsbahnen wurden nun wieder in ihre ursprüngliche Lage repositioniert.

Die Hautnaht wurde mit 6-0 Prolene® Faden in Einzelknopf- oder fortlaufender Naht durchgeführt.

Um ein Austrocknen des Op-Gebietes während der Operation zu verhindern, erfolgte eine Anfeuchtung mit NaCl.

Nach erfolgreicher Operation wurde die Maus in einen Käfig unter einer Rotlichtlampe gelegt, um den intraoperativen Wärmeverlust auszugleichen.



Abb. 4: Präparation

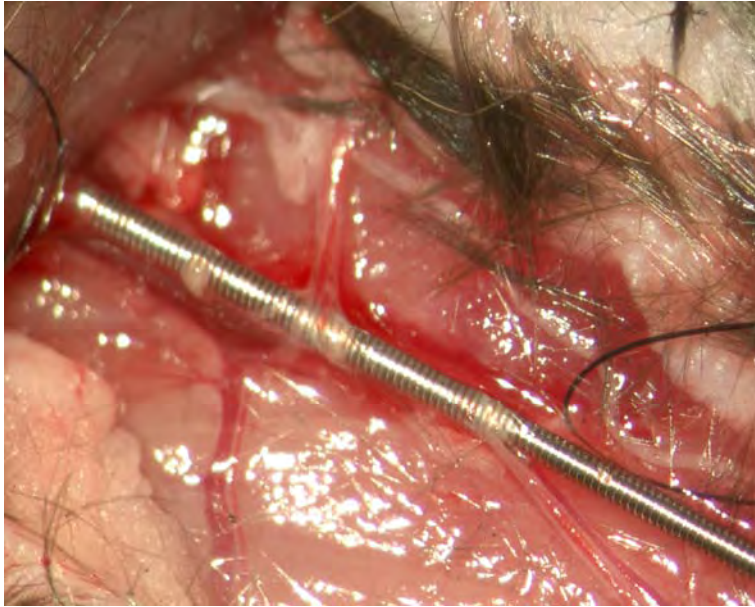


Abb. 5: Dilatation

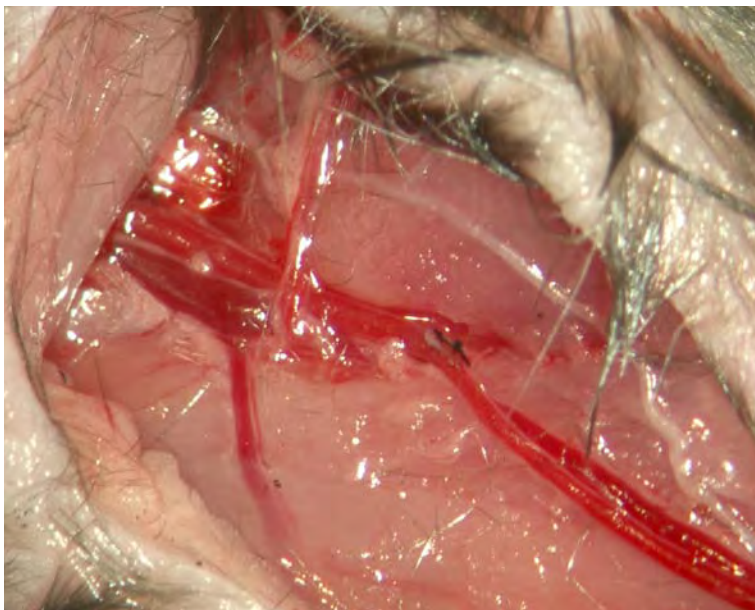


Abb. 6: Wiederherstellung des Blufflusses

3.6.5. Entnahme der A. femoralis

Der Kreislaufstillstand wurde ausgelöst durch Inhalation von Isofluran®. Anschließend wurde die alte Nahtstelle wieder eröffnet. Der dilatierte Abschnitt der A. femoralis konnte nun entnommen werden. Die Ligatur der A. femoralis profunda diente dabei zur Orientierung.

Zur Entfernung von Blutresten aus dem Lumen, wurde die entnommene Arterie in destilliertem Wasser in einer Petrischale geschwenkt. Anschließend wurde sie in ein mit Tissue Tek® gefülltes Eppendorfgefäß eingebracht. Dieses wurde dann in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Lagerung bei minus 80°C.

3.6.6. Schnittgewinnung

Zur Anfertigung der histologischen Schnitte wurde der Kryostat LEICA CM 1900 verwendet. Das Schneiden erfolgte bei einer Temperatur von -24°C.

Die in Tissue Tek® eingefrorene Arterie wurde auf einen Stempel aufgebracht und in eine Schneidevorrichtung eingespannt. Die Schnittdicke betrug 7 µm. Auf jeden Objektträger wurden 3 Schnitte aufgebracht. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

3.6.7. Morphometrie

Zunächst wurden die Schnitte 10 Minuten in 4 % PFA fixiert und anschließend 15 Minuten in PBS rehydriert.

Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Objektträger 5 Minuten in Hämalaun gestellt und danach 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut.

Die Gegenfärbung erfolgte durch 3minütige Inkubation in van Gieson-Lösung, wodurch das Bindegewebe rot angefärbt wurde. Anschließend wurden die Objektträger nochmals in Leitungswasser gewaschen.

Die Vermessung der Gefäße erfolgte unter dem Mikroskop Leica DMRB und mit Hilfe des Computerprogramms Zeiss KS 300 Release 3.0.

3.6.8. Immunhistochemischer Nachweis von PCNA

Für den immunhistochemischen Nachweis von Proliferating Nuclear Cell Antigen (PCNA) wurde das PCNA Staining Kit der Firma Zymed® Laboratories Inc. genutzt.

Als Positivkontrolle diente Mäusedarm. Zur Negativkontrolle erfolgte die Inkubation der Schnitte ohne Primärantikörper.

Vor Beginn der Färbung wurden die Kryoschnitte 10 Minuten in 4°C Aceton fixiert. Anschließend erfolgte die Rehydrierung für 20 min in PBS bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Blocking solution inkubiert. Dieser Schritt dient dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen im Gewebe.

Als Primärantikörper diente ein Biotin-gekoppelter Maus anti-PCNA Antikörper. Mit diesem wurden die Schnitte 50 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden sie 3 x 2 Minuten in PBS gewaschen. Im Anschluß erfolgte die 10minütige Inkubation mit einem Streptavidin gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschgang. Jetzt konnte die kurz vor Gebrauch frisch angesetzte DAB-Lösung auf die Objektträger gegeben werden. Nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten wurden die Schnitte 3 x 2 Minuten in dAqua gewaschen. Um ein besseres Auszählen der Zellen zu gewährleisten, wurden die Zellkerne mit Dapi angefärbt.

Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica.

Zunächst wurde die Anzahl PCNA positiver Zellen unter Durchlicht in Neointima und Media bestimmt und anschließend die Gesamtzellzahl durch Zählung der Dapi-positiven Zellen unter Fluoreszenzlicht.

Nun konnten die PCNA exprimierenden Zellen in ein Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt werden, wodurch eine Aussage über die Anzahl der momentan proliferierenden Zellen möglich war.

3.6.9. Nachweis apoptotischer Zellen

Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte mit Hilfe des „In situ Cell Death Detection Kit“ (Tunel Assay) der Firma Roche. Es wurde nach dem originalen Protokoll vorgegangen.

Die 7 µm dicken Gefrierschnitte wurden 20 Minuten in 4 % Paraformaldehyd fixiert und danach für 30 Minuten in PBS rehydriert.

Anschließend wurden sie für 2 Minuten bei 4°C in eine Permeabilisierungslösung (0,1 % Triton X-100 und 0,1 % Natriumcitrat in PBS) gestellt. Nach 2 Waschgängen in PBS erfolgte die Zugabe von 50 µl Tunel reaction mixture, die kurz vorher zusammengemischt wurde, pro Schnitt. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei 37°C.

Nach 3 weiteren Waschgängen in PBS wurden die Schnitte mit einem DAPI- enthaltenen Eindeckmedium eingedeckelt.

Die Anzahl apoptotischer Zellen konnte nun anhand ihrer Rotfluoreszenz mit Hilfe eines Immunfluoreszenzmikroskops bei einer Wellenlänge von 450- 500 nm durch einfaches Auszählen bestimmt werden. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte durch Auszählen der Dapi-positiven Zellen. Die Anzahl der apoptoischen Zellen wurde dann zur Gesamtzellzahl ins Verhältnis gesetzt, wodurch die Apoptoserate bestimmt werden konnte.

3.6.10. von Willebrand Färbung

Zunächst wurden die Gefrierschnitte 10 Minuten bei Raumtemperatur in 4 % PFA fixiert und anschließend 15 Minuten in PBS rehydriert. Nach dem die Schnitte 10 Minuten mit Ziegenerum geblockt wurden, erfolgte nun die Inkubation mit dem Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:10 für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Danach wurden die Schnitte 2 x 5 Minuten in PBS gewaschen.

Im Anschluss erfolgte die 1stündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Alexa fluor goat anti-rabbit 546) in einer Verdünnung von 1:200.

Anschließend erfolgte ein erneuter Waschgang.

Zum Schluss wurden die Schnitte mit einem DAPI enthaltenden Eindeckmedium eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica.

Um beurteilen zu können, in welchem Maß eine Reendothelialisierung nach PTCA stattfand, wurde folgendes Scoring von 0- 4 benutzt. Ein Score von 0 bedeutete keine

Reendothelialisierung, während bei einem Score von 4 das Endothel vollständig ausgebildet war. Die Zahlen 1, 2 und 3 standen für eine jeweils um ein Viertel des Gefäßes zunehmende Reendothelialisierung.

3.7. Statistik

Die aufgeführten Daten wurden analysiert mit Exel 2000 (Microsoft) und Sigma Stat 2.03 (Systat, Erkrath, Deutschland)

Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA, der paarweise Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen erfolgte nach der Holm- Sidak Methode.

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Eine Wahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. 3-Deazaadenosin hemmt dosisabhängig die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen in vitro

Zunächst sollte der Einfluss des 3-Deazaadenosins auf das Proliferationsverhalten von glatten Gefäßmuskelzellen untersucht werden, da diesem Vorgang neben der Inflammation eine Schlüsselfunktion in der Entstehung der Atherosklerose und bei restenotischen Prozessen zu kommt.

Die Inkubation der Zellen mit c3Ado reduzierte dosisabhängig den Wachstumsfaktor induzierten Anstieg der Zellzahl, im Gegensatz zur alleinigen Stimulation mit FCS (152 ± 41 % vs. 299 ± 35 %, $*P < 0,05$ bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ c3Ado; $n = 4$) (Abb. 7).

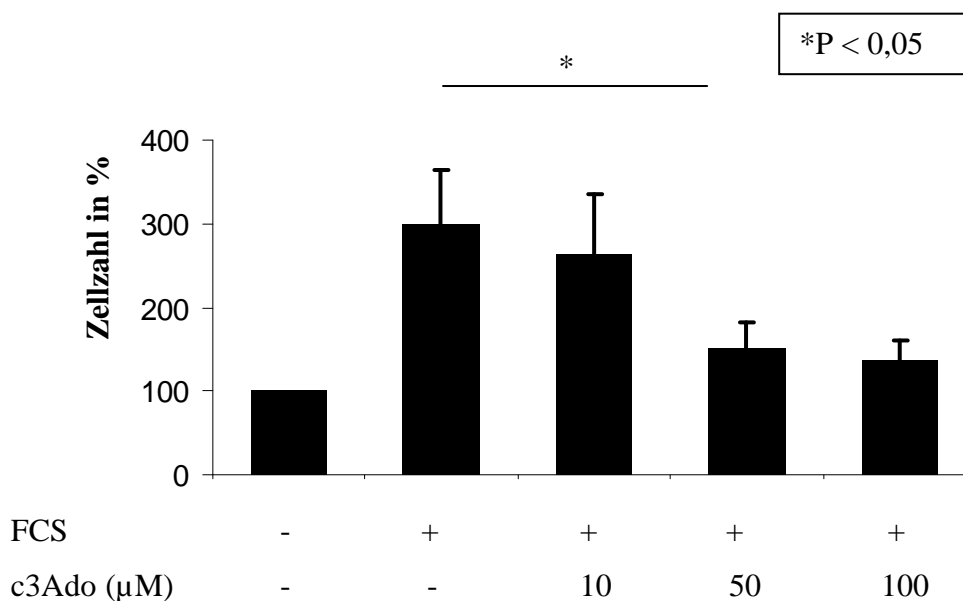


Abb. 7: Einfluss des 3-Deazaadenosins auf das Proliferationsverhalten von humanen glatten Gefäßmuskelzellen

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden über 48 h in Wachstumsmedium mit und ohne Zusatz von c3Ado kultiviert. Es zeigt sich eine dosisabhängige Abnahme der Proliferation. Eine signifikante Hemmung der Proliferation zeigt sich bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ c3Ado.

Abbildung 8 stellt die Ergebnisse des BrdU-Incorporation assay dar. Behandlung der VSMCs mit 50 μM c3Ado resultierte in einer 60 %-igen Hemmung der DNA-Replikation verglichen mit der Kontrollgruppe (n=4, *P < 0,05).

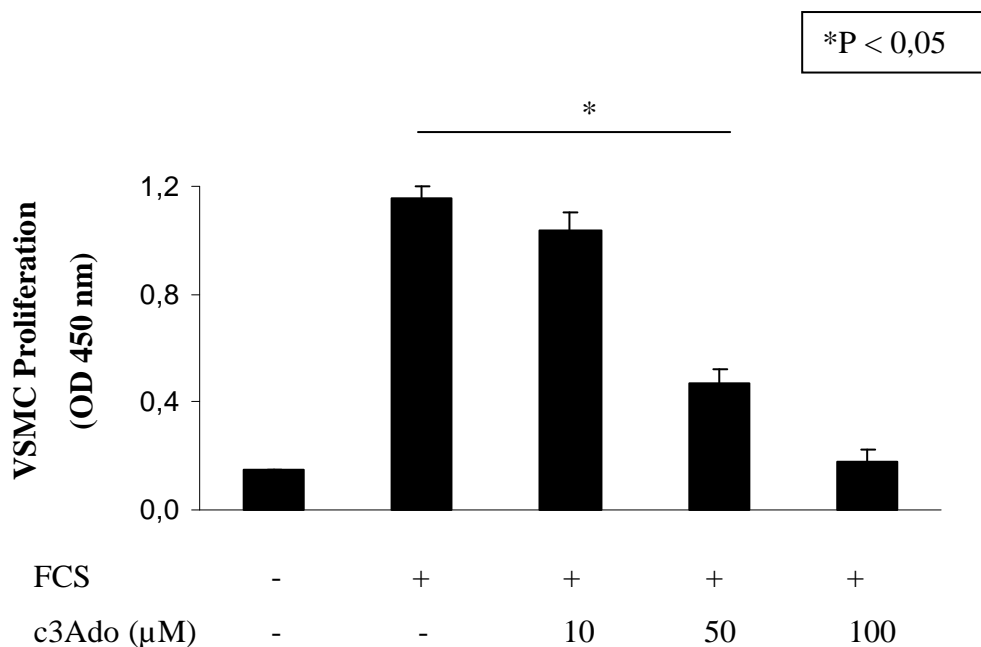


Abb. 8: VSMC BrdU-ELISA

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden für 24 h in Wachstumsmedium, mit oder ohne den verschiedenen Konzentrationen c3Ado, unter Zugabe von BrdU inkubiert. Die Proliferation, bestimmt mittels anti-BrdU-ELISA, ist angegeben als durchschnittliche Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die dabei ermittelte Absorption korreliert direkt mit der Menge an synthetisierter DNA und somit der Anzahl proliferierender Zellen.

Auch der Migration glatter Gefäßmuskelzellen kommt eine Schlüsselfunktion in der Entstehung der Atherosklerose und bei restenotischen Prozessen zu. Bei den aufgeführten Experimenten diente PDGF-BB (20 ng/ml) als Migrationsstimulus. Vor dem Versuch wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert.

Nach Inkubation der Zellen mit 3-Deazaadenosin zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der Anzahl migrierender Zellen (Abb. 9). Die Zugabe von 50 μM c3Ado führte zu einer signifikanten Abnahme der Migration gegenüber PDGF- Stimulation allein (29 ± 2 vs. 74 ± 10 , *P < 0,05; n = 4).

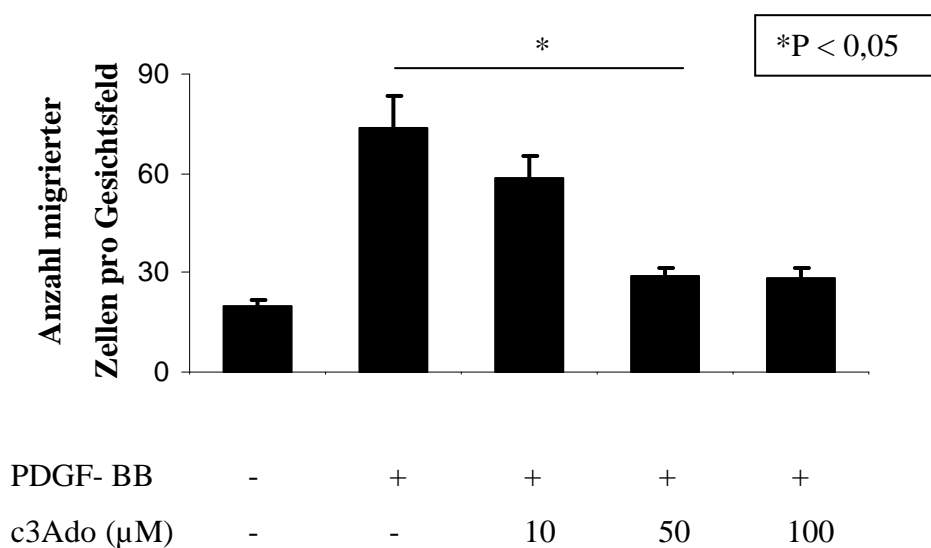


Abb. 9: Effekt von c3Ado auf das Migrationsverhalten glatter Gefäßmuskelzellen

Das Migrationsverhalten von glatten Gefäßmuskelzellen unter Zugabe von PDGF-BB (20 ng/ml) und nach Zugabe verschiedener Konzentrationen c3Ado wurde nach 6 h untersucht. Nach dieser Zeit zeigte sich unter Einwirkung von 50 μM c3Ado im Gegensatz zur Stimulation durch PDGF allein eine signifikante Abnahme der Anzahl migrierender Zellen.

4.2. 3-Deazaadenosin hat keinen Einfluss auf Apoptose oder Nekrose glatter Gefäßmuskelzellen

Eine Abnahme der Zellzahl unter Behandlung mit c3Ado kann über mehrere Wege verursacht werden. Zum einen durch einen Eingriff in den Zellzyklus mit nachfolgender Hemmung der Zellzyklusprogression und Proliferation, zum anderen über ein vermehrtes Absterben der Zellen durch Apoptose oder Nekrose.

Um zwischen diesen Möglichkeiten differenzieren zu können, untersuchten wir zunächst, ob 3-Deazaadenosin in der Lage ist Apoptose zu induzieren. Dazu wurden glatte Gefäßmuskelzellen über 24h mit verschiedenen Konzentrationen c3Ado inkubiert und anschließend mit Hilfe des TUNEL-Assays angefärbt.

Nach Behandlung der Zellen mit 3-Deazaadenosin zeigte sich keine Steigerung der Apoptoserate im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 10). Der Anteil apoptotischer Zellen betrug bei Kultivierung in Wachstumsmedium 2,2 %, nach Zugabe von 10 μM c3Ado 1,9 %, bei 50 μM c3Ado 1,7 % und nach Behandlung mit 100 μM c3Ado 1,6 % (*P = n.s., n = 4). Als Positivkontrolle diente die Inkubation mit Aktinomycin D (AmD), welches bekanntermassen Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen induziert.

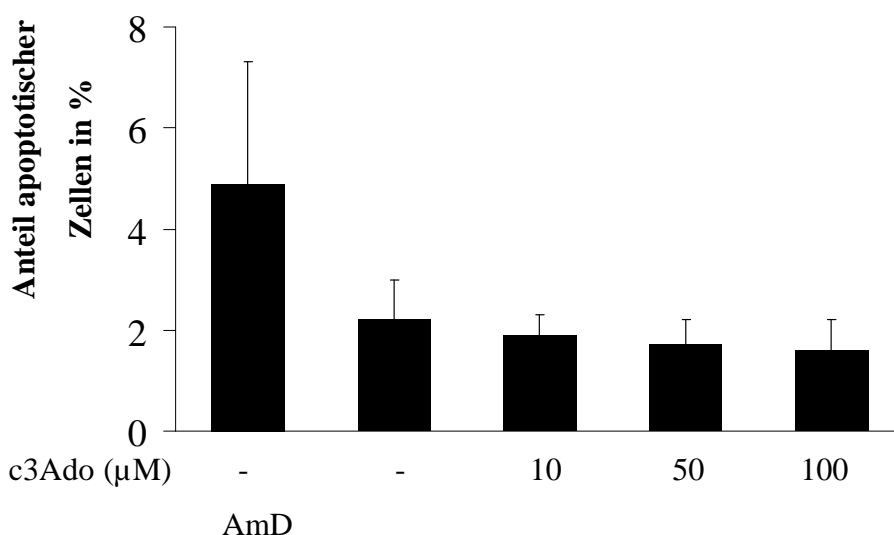


Abb. 10: Einfluss von c3Ado auf die Apoptoserate

Das Diagramm zeigt die Apoptoserate der Zellen unter den verschiedenen Konditionen. Die Apoptoserate wurde bestimmt, indem die TUNEL-positiven Zellen zur Gesamtzellzahl der Zellen ins Verhältnis gesetzt wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Behandlung mit 3-Deazaadenosin selbst in der höchsten getesteten Konzentration keine Apoptose induziert.

Um eine zytotoxische Wirkung von 3-Deazaadenosin auszuschließen, wurden VSMC nach 24stündiger Vorinkubation mit c3Ado (10, 50 und 100 μM) mit Hilfe der Trypanblau-Methode angefärbt. Es zeigte sich unabhängig von der Kondition nach Trypsinisierung eine Vitalitätsrate der Zellen von über 80 % ($80,89 \pm 8,8$ % gegenüber $81,4 \pm 6,2$ % lebende Zellen, $n = 4$; *P = n.s. bei einer Konzentration von 100 μM c3Ado) (Abb. 11).

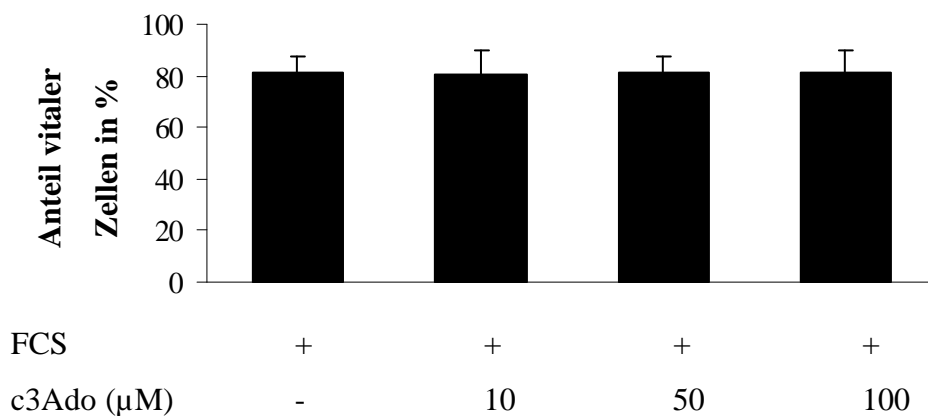


Abb. 11: Vitalitätstest nach Behandlung der Zellen mit 3-Deazaadenosin

Mit Hilfe der Trypanblaufärbung kann gezeigt werden, dass die Inkubation der Zellen mit c3Ado nicht zu einer Abnahme ihrer Vitalität führt.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Frage nach der Reversibilität des antiproliferativen Effektes. Dafür wurden VSMC für 24 h mit c3Ado vorbehandelt. Nach 3 Waschschritten erfolgte die 24stündige Inkubation dieser Zellen in Wachstumsmedium.

C3Ado behandelte Zellen zeigten anschließend die gleiche Proliferationsrate wie Zellen, die in Kontrollpuffer inkubiert wurden (*P = n.s., n = 4). Im Gegensatz dazu proliferierten Aktinomycin D inkubierte Zellen nach Zugabe von FCS nicht mehr. Diese Ergebnisse zeigen nochmals, dass c3Ado in den getesteten Konzentrationen keinen apoptotischen oder toxischen Effekt aufweist, der für die Hemmung der Proliferation und Migration verantwortlich sein könnte, und dass c3Ado nur eine reversible Hemmung der Proliferation hervorruft.

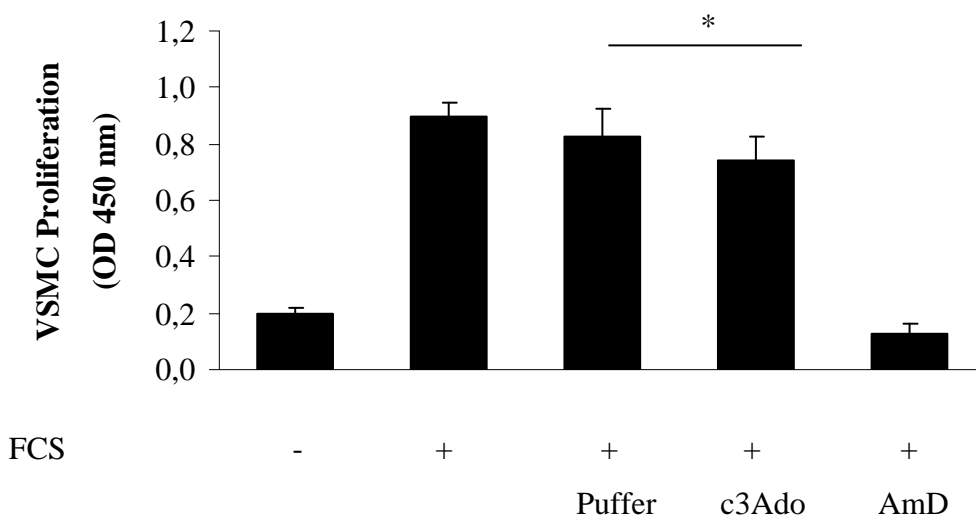


Abb. 12: Reversibilität des antiproliferativen Effektes

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden für 24 h in Wachstumsmedium mit oder ohne c3Ado oder Aktinomycin D inkubiert. Nach 3 Waschschritten wurden die Zellen erneut für 24 h in Wachstumsmedium inkubiert. Die Proliferationsrate wurde anschließend mit Hilfe des BrdU-ELISA quantifiziert.

4.3. 3-Deazaadenosin führt dosisabhängig zu einer Hemmung der Zellzyklusprogression in der G0/G1-Phase

Um die Mechanismen, die für den antiproliferativen Effekt des c3Ado verantwortlich sind, näher zu bestimmen, wurde mit Hilfe der FACS-Analyse Propidiumjodid- gefärbter Zellen die Zellzyklusverteilung der VSMC nach Inkubation mit c3Ado untersucht.

Es zeigte sich, dass die Anzahl der Zellen, die in die S-Phase des Zellzyklus eintreten nach Inkubation mit 50 μ M c3Ado im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert war (7,6 % \pm 0,91 vs. 17,1 % \pm 1,62; *P < 0,05). 89,2 % der Zellen befanden sich in der G0/G1-Phase des Zellzyklus (Abb. 13)

Als Zeichen der tatsächlichen Hemmung der Zellzyklusprogression am Übergang von der G0/G1- in die S-Phase zeigte sich in Western Blot Untersuchungen ein dosisabhängiger Rückgang der Phosphorylierung des Retinoblastom-Genproduktes, wie es auch in ruhenden Zellen zu finden ist. (Abb. 11) Hypophosphoryliertes Rb bindet an die verschiedenen Isoformen des Transkriptionsfaktors E2F und hemmt dessen Aktivität. Die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie kontrollieren die Expression von Genen, die für die nachfolgende S-Phase benötigt werden, wie z.B. die Zykline E und A, Cdk1.

Weitere Western Blot-Analysen zeigten, dass c3Ado dosisabhängig die Herunterregulation der Zellzyklus-inhibierenden Proteine (cyclin-dependent kinase inhibitor = CKI) p27^{Kip1} und p21^{cip/waf1} verhindert. (Abb. 14)

Zyclin-abhängige Kinasen und ihre regulatorischen Untereinheiten, die Zykline, sind für Zellzykluseintritt und -progression verantwortlich.

Die Zykline der frühen G1-Phase sind die D-Zykline (D1, D2 und D3).

Die Expression der Zykline D und E wurde durch c3Ado dosisabhängig reduziert. Somit ist der Eintritt der Zellen in die nachfolgende S-Phase gehemmt, was durch eine verminderte Expression der Zykline B1 (Synthese in späten S-Phase) und A (Synthese während der S- Phase) nach Inkubation mit 50 und 100 μ M c3Ado in weiteren Western-blot-Analysen gezeigt werden konnte (Abb. 15).

Es zeigte sich keine spezifische Regulation eines einzelnen hier getesteten Zellzyklusmoleküls, was die Vermutung nahe legt, dass c3Ado nicht die Expression eines bestimmten zellzyklusregulierenden Proteins beeinflusst, sondern vielmehr in übergeordnete Signaltransduktionsmechanismen eingreift, die den frühen Zellzykluseintritt regulieren.

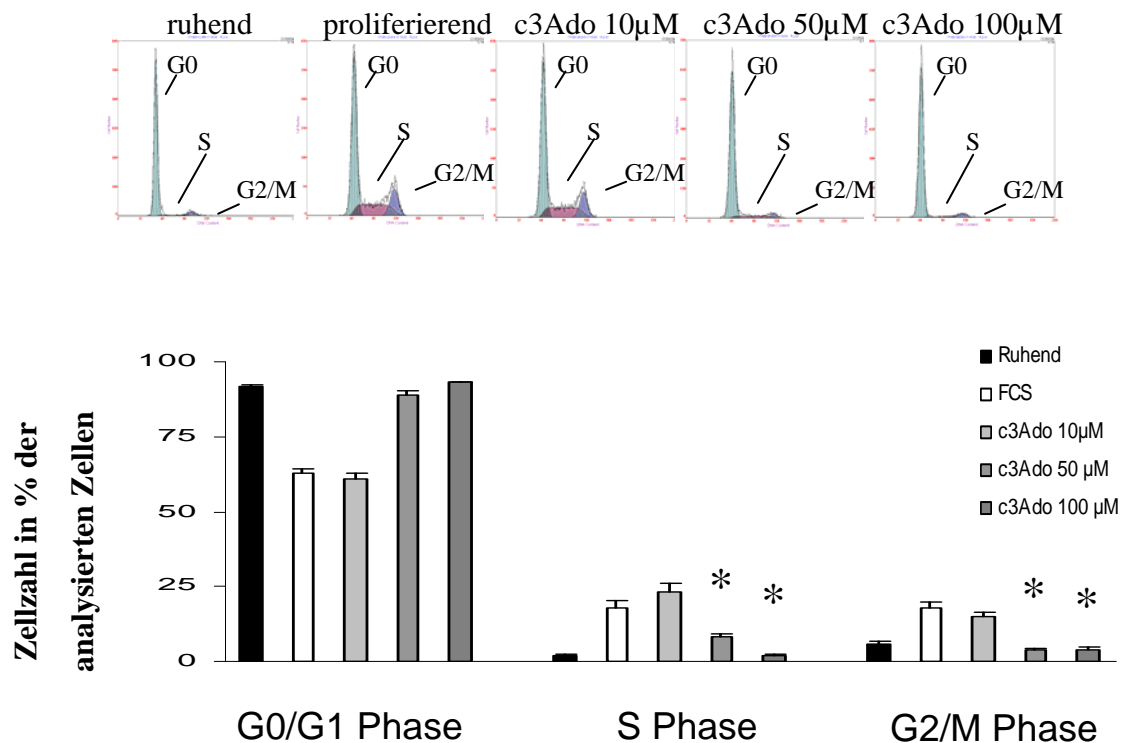


Abb. 13: c3Ado moduliert die Zellzyklusprogression von VSMC

Die Zellzyklusverteilung wurde mittels FACS-Analyse Propidiumjod-gefärbter Zellen ermittelt. Die schwarzen Balken stellen die Zellzyklusverteilung nach 24 h Serumentzug dar (synchronisierte Zellen), die weißen Balken proliferierende Zellen nach 24 h Inkubation in FCS-haltigem Wachstumsmedium. Die verschiedenen Grautöne stellen die Zellzyklusverteilung proliferierender Zellen in Wachstumsmedium unter Zugabe der verschiedenen Konzentrationen des c3Ado (10 µM, 50 µM und 100 µM) dar (n = 4; *P < 0,05). Über dem Diagramm ist ein für jede Kondition repräsentatives Verteilungsmuster dargestellt.

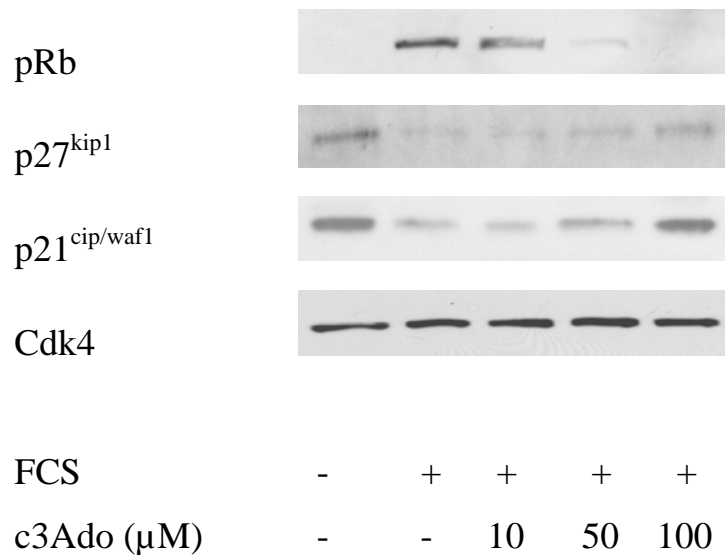


Abb. 14: Glatte Gefäßmuskelzellen wurden über 24 h in Wachstumsmedium oder Basalmedium und je nach Kondition unter Zugabe der verschiedenen c3Ado-Konzentrationen inkubiert. Die Expression der Zellzyklusproteine wurde unter Nutzung spezifischer Antikörper im Western Blot bestimmt. Die Phosphorylierung des Retinoblastom Genproduktes wurde dosisabhängig durch Inkubation mit c3Ado reduziert, während die Expression der zellzyklushemmenden Proteine p21^{cip/waf1} und p27^{kip1} dosisabhängig gesteigert wurde. Cdk4 diente als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung der Proben.

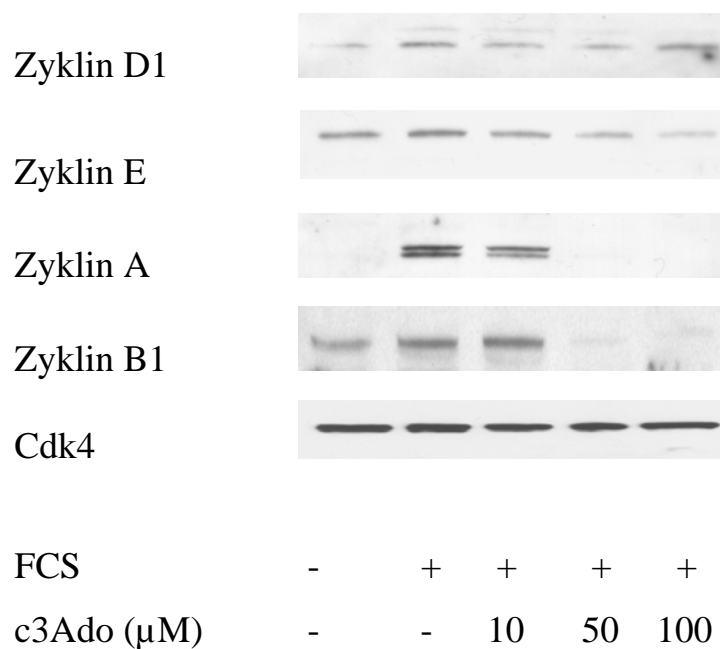


Abb. 15: Die Zellen wurden 24 mit Wachstumsmedium oder Basalmedium inkubiert und je nach Kondition erfolgte der Zusatz von c3Ado. Die Bestimmung auf den Proteingehalt der Zykline erfolgte mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens. Auch hier diente Cdk4 als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung.

4.4. Einfluss von c3Ado auf die Aktivierung der PI3-Kinase/Akt und MAP-Kinase

Vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass sowohl der MAP-Kinase- als auch der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweg von essentieller Bedeutung für die Regulation früher Zellzyklusprozesse sind. So führt ihre Aktivierung beispielsweise zu einer Aktivierung von Zyklin-abhängigen Kinasen und zu einer Hemmung der Expression von Zellzyklusinhibitoren, wie z.B. p21^{cip/waf1} und p27^{Kip1}.

In den folgenden Versuchen sollte daher der Effekt von c3Ado auf diese übergeordneten Signaltransduktionswege untersucht werden.

Interessanterweise greift c3Ado in die Wachstumsfaktor-assoziierte Aktivierung beider Signaltransduktionswege ein:

Die Inkubation mit c3Ado hemmte dosisabhängig die durch Wachstumsmedium induzierte Aktivierung von p42/44 MAPK (ERK) und seiner übergeordneten Kinase pRaf (Abb. 16).

Des Weiteren verhinderte die Inkubation mit c3Ado dosisabhängig die Phosphorylierung der Protein-abhängigen Kinase 1 (PDK1), der Proteinkinase B (Akt) sowie des Forkhead-Transkriptionsfaktors FoxO1a, der bekannt ist für die Regulation der Expression von p27^{Kip1} und den D- Zyklinen. (Abb. 17).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass c3Ado in Prozesse eingreift, die diesen Signaltransduktionswegen übergeordnet sind.

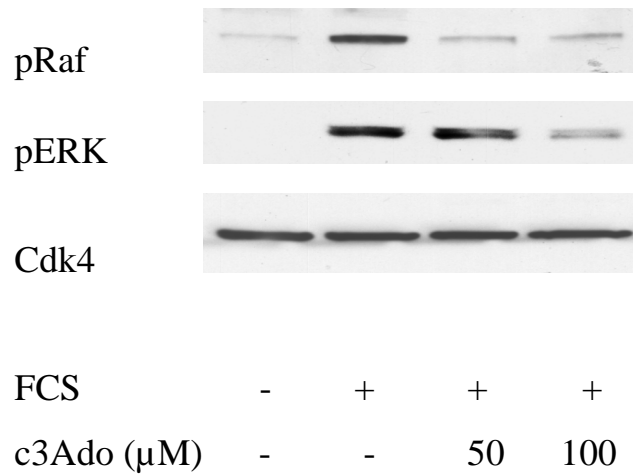


Abb. 16: Western Blot Analysen zeigen, dass nach 24 stündiger Vorinkubation der Zellen mit c3Ado der Proteingehalt von pRaf und dessen nachfolgenden Effektor pERK abnimmt. Raf und ERK sind Kinasen, die nur im phosphorylierten Zustand aktiv sind und nachfolgende Effektoren aktivieren können. Deshalb wurden hier Antikörper benutzt, die spezifisch nur an die phosphorylierte Form dieser Kinasen binden. Cdk4 dient als Nachweis der gleichmäßigen Proteinbeladung.

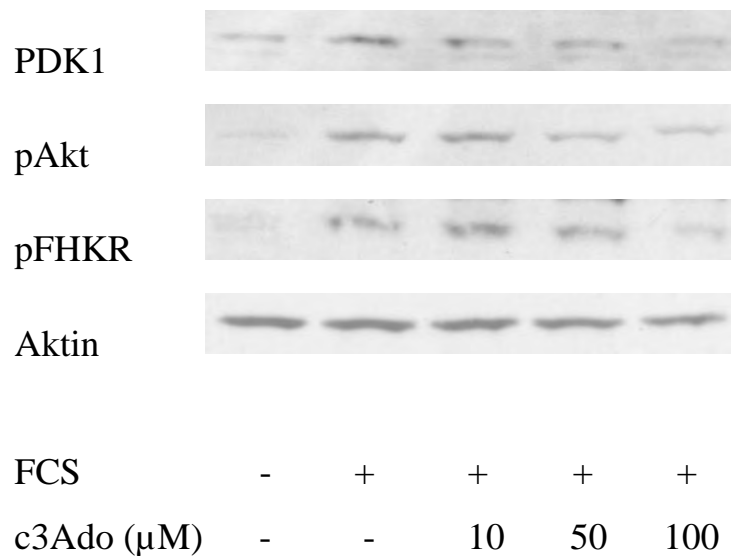


Abb. 17: Weitere Western Blot Analysen zeigen eine Abnahme des Proteingehaltes von PDK1, pAkt und der phosphorylierten Form der Forkhead Transkriptionsfaktoren. Aktin diente als Nachweis für die gleichmäßige Proteinbeladung der einzelnen Proben.

4.5. c3Ado verhindert die Membranbindung von Ras und somit dessen Aktivierung

Eine wichtige Rolle in der Regulation von Proliferation, Migration, Zelldifferenzierung und Apoptose spielen die Ras-Proteine. Aktiviertes Ras kann durch Aktivierung der MAPK- und PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionswege Signale von der Zellmembran zum Zellkern weiterleiten.

Die Bindung von Ras an die Plasmamembran und die nachfolgende Aktivierung sind abhängig von der posttranslationalen Modifikation des carboxyterminalen Endes der Ras-Proteine. Der letzte Schritt hierbei erfolgt mit Hilfe zellulärer Methyltransferasen.

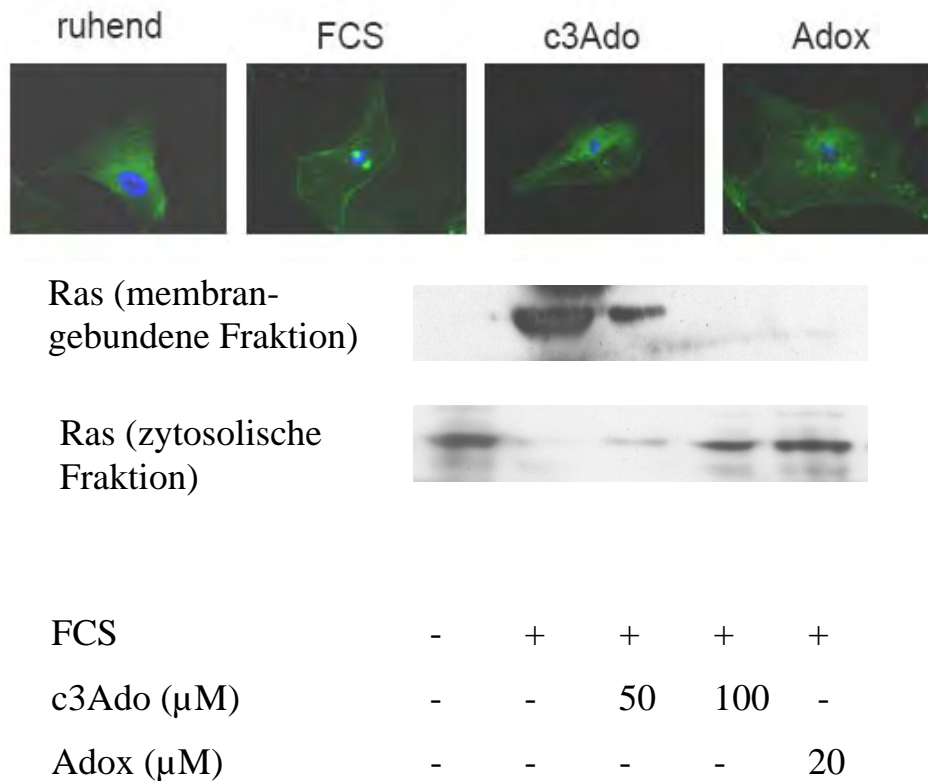
Da c3Ado über eine Anhäufung von Ado/Hyc zelluläre Methyltransferasen hemmt, sollte nun untersucht werden, ob es über ein Eingreifen in die Ras abhängigen Signalwege die Wachstumsfaktor induzierte Aktivierung der MAPK- und PI3-Kinase verhindern kann.

Mit Hilfe einer immunhistochemischen Darstellung von Ras wird deutlich, dass c3Ado die Translokation von Ras aus dem Zytosol an die Plasmamembran verhindert. (Abb. 18)

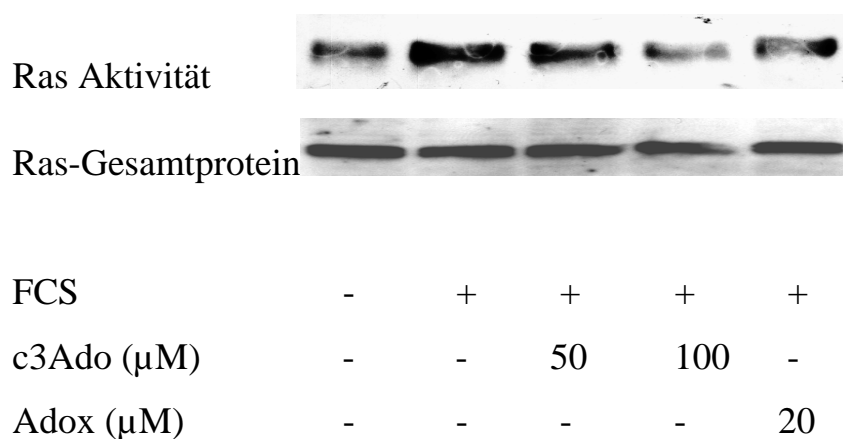
In einem nächsten Schritt erfolgte eine Auftrennung der Ras-Proteine in die zytosolische und membrangebundene Fraktion. Anschließend wurden diese mit Hilfe des Western Blot Verfahrens unter Nutzung spezifischer Antikörper dargestellt. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen, dass c3Ado dosisabhängig die Wachstumsfaktor induzierte Translokation von Ras an die Plasmamembran verhindert. Die alleinige mitogene Stimulation (FCS) hingegen, führte zu einer deutlichen Membranbindung von Ras. Inkubation mit 50 μ M Adox, einem weiteren Hemmstoff zellulärerer Methyltransferasen, führte ebenso wie c3Ado, zu einer verminderten Membranbindung von Ras. (Abb. 19)

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich in einem Ras-Aktivitäts Assay, dass c3Ado dosisabhängig die Wachstumsfaktor induzierte Aktivierung von Ras hemmt.

Auch die Inkubation mit Adox führte zu einer verminderten Aktivität der Ras Proteine. (Abb. 19)

**Abb. 18: Translokation von Ras**

In ruhenden Zellen liegt Ras im Zytosol vor. Nach mitogener Stimulation wird es an die Plasmamembran gebunden. c3Ado und Adox, Hemmstoffe zellulärer Methyltransferasen, verhindern diese Membranbindung von Ras. Mit Hilfe der Western Blot Analysen konnten die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung für Ras bestätigt werden.

**Abb. 19: Ras Aktivität**

Mit Hilfe des Ras activity assay kann gezeigt werden, dass die Aktivität der Ras Proteine nach Inkubation mit c3Ado deutlich reduziert ist. Auch nach Inkubation mit Adox, einem weiteren Methylierungshemmer, kommt es zu einer Abnahme der Ras Aktivität. Die Gesamtprotein-menge des Ras dient als Nachweis der gleichmäßigen Proteinbeladung.

4.6. Der antiproliferative Effekt des c3Ado beruht auf der Inaktivierung von Ras.

Die oben aufgeführten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Hemmung der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen durch c3Ado über eine Hemmung der Membranbindung und somit Aktivierung der Ras Proteine vermittelt wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Zellen mit einer konstitutiv aktiven H-Ras-Mutante transfiziert. In diesen Zellen ist Ras ständig aktiviert und kann somit unabhängig von der posttranslationalen Modifikation (Methylierung) Signale (z.B.: von Wachstumsfaktoren) von außerhalb der Zelle zum Zellkern weiterleiten.

In dem folgenden Diagramm ist zu sehen, dass nach Zugabe von Wachstumsmedium die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen im Gegensatz zu ruhenden Zellen um den Faktor 5 zunimmt ($5,3 \pm 0,61$ vs. $1,0 \pm 0,29$). Durch Zusatz von $50 \mu\text{M}$ c3Ado konnte dieser Anstieg der Proliferation vermindert werden.

Allerdings konnte c3Ado die Proliferation der Zellen, die zuvor mit einer aktiven H-Ras-Mutante transfiziert wurden, nicht verhindern ($2,57 \pm 0,16$ vs. $4,7 \pm 0,3$). Sie waren gegen den antiproliferativen Effekt des c3Ado resistent.

Die Transfektion mit einem Leervektor (Plasmid ohne eine für ein Protein kodierende Sequenz) hingegen hatte keinen Einfluss auf die durch c3Ado vermittelte Hemmung der Proliferation. (Abb. 20)

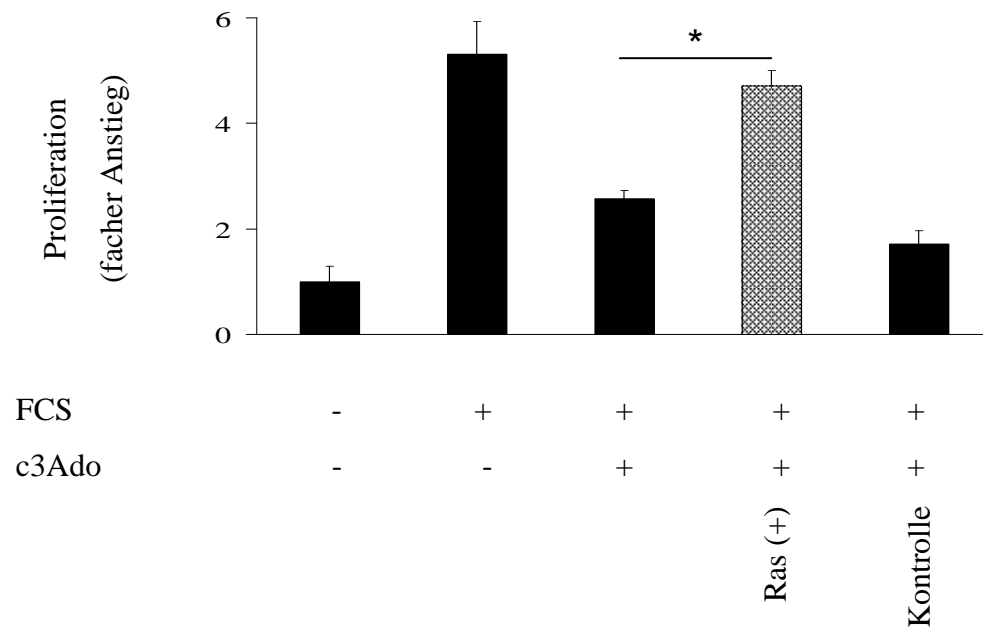


Abb. 20: Die Zellen wurden kotransfiziert mit einem Vektor, der für die aktive Form von H- Ras codiert, zusammen mit einer equimolaren Menge eines pMACS.K^k-II Vektors und anschliessend selektiert. Danach wurden die Zellen für 24 h mit 50 μ M c3Ado versetzt. Mit Hilfe des Cell Proliferating ELISA, BrdU konnte die Menge der neu synthetisierten DNA quantifiziert werden.

4.7. Die c3Ado vermittelte Hemmung der Ras- Methylierung, Aktivierung und Signalweiterleitung ist abhängig von der ICMT

Der letzte Schritt in der Modifizierung des carboxyterminalen Endes der Ras-Proteine ist die Methylierung des farnesylierten Cysteins. Dafür benötigt die Zelle Methyltransferasen, wie z.B.: die ICMT. Hemmung der ICMT führt zu einer verminderten Methylierung und somit einer verminderten Aktivierung der Ras-Proteine.

3-Deazaadenosin ist ein Hemmstoff für zelluläre Methyltransferasen und somit für Methylierungsreaktionen in der Zelle.

Es stellt sich nun die Frage, ob c3Ado über eine Hemmung der ICMT die Methylierung, die Membranbindung und somit die Aktivierung von Ras verhindert.

Mit Hilfe eines Ras-Aktivitäts ELISAs wurde die Ras-Aktivität in Zellen, die mit c3Ado, dem ICMT Hemmstoff AGGC oder dem inaktiven Analogon AGC behandelt wurden, bestimmt.

Die Inkubation der Zellen mit c3Ado und AGGC führte zu einer signifikanten Reduktion der Ras-Aktivität. (Abb. 21A)

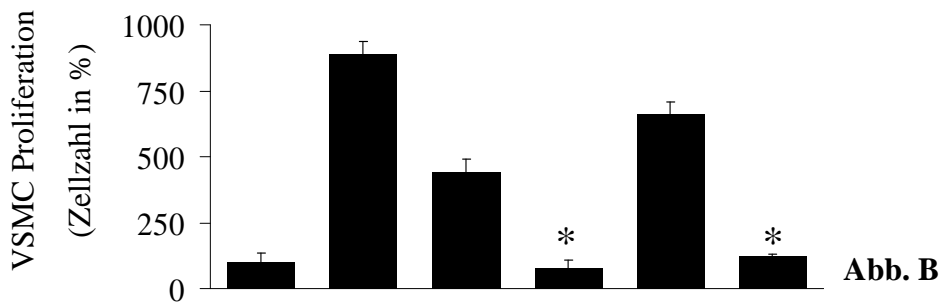
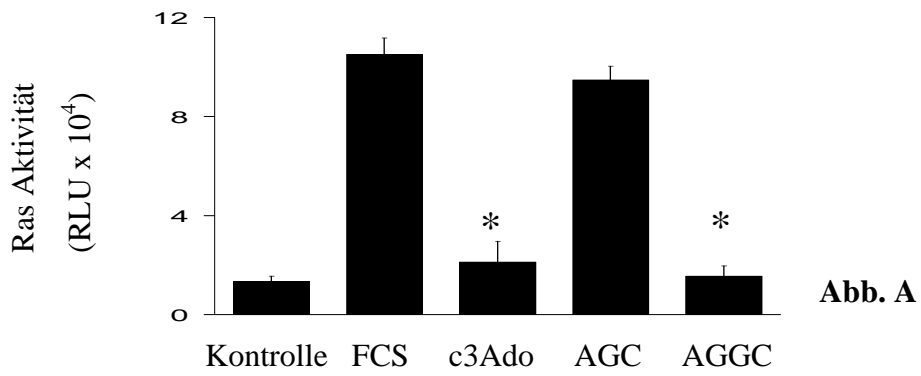
Auch zeigte sich, dass der ICMT Hemmstoff AGGC die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in gleichen Maßen hemmt wie c3Ado, während das inaktive AGGC Analogon AGC keinen Einfluss auf die Proliferationsrate hatte. (Abb. 21B)

In einem nächsten Schritt wurde nun die ICMT in glatten Gefäßmuskelzellen überexprimiert. Anschließend wurden diese Zellen mit c3Ado inkubiert. Die Überexpression der ICMT konnte die durch c3Ado vermittelte Hemmung der Ras-Aktivität verhindern. (Abb. 21C)

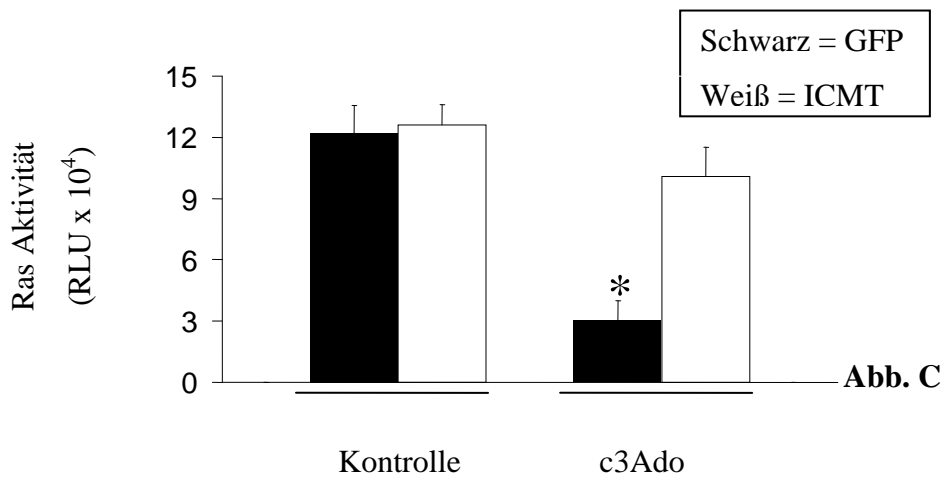
Dieses Ergebnis zeigt, dass c3Ado die Aktivierung von Ras verhindert, indem es die Aktivität der ICMT hemmt.

Des Weiteren wurde die AGGC- vermittelte Hemmung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen durch die Überexpression einer aktiven Ras-Mutante verhindert. (Abb. 21D)

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass c3Ado die Ras-Methylierung und Aktivierung verhindert, indem es die Aktivität der ICMT hemmt.



FCS	-	+	+	+	+	+
c3Ado (µM)	-	-	50	100	-	-
AGC	-	-	-	-	+	-
AGGC	-	-	-	-	-	+



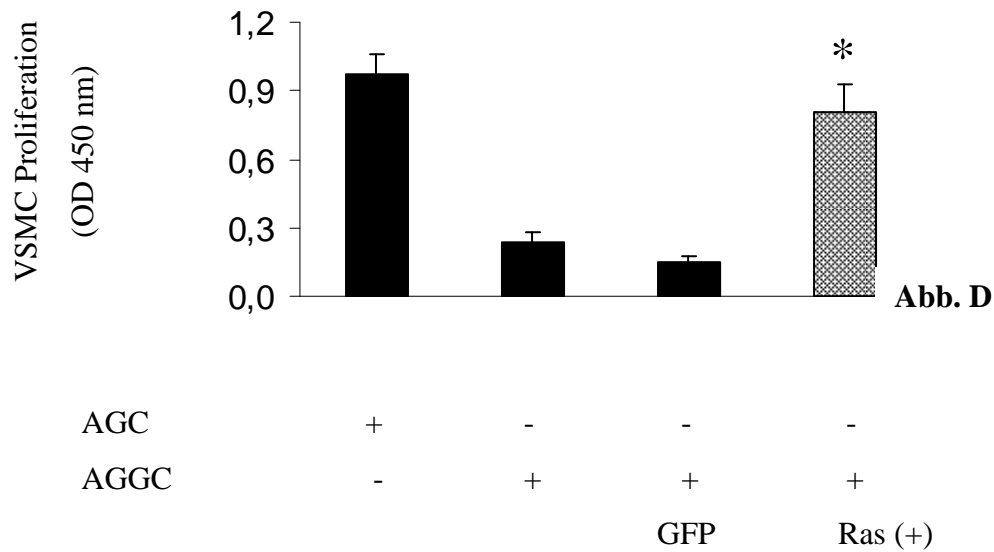


Abb. 21: In **Abb. A** wurde die Ras- Aktivität mit Hilfe eines ELISA Aktivitätsassays bestimmt. Die Ergebnisse sind als relative Absorbtionswerte dargestellt (RLU; *P < 0,05; n = 4),

Abb. B: VSMC wurden mit Wachstumsmedium und verschiedenen Konzentrationen c3Ado, dem ICMT Hemmstoff AGGC oder seinem inaktiven Analogon AGC für 24 h inkubiert. Die Zellzahl wurde nach 48 h bestimmt. (*P < 0,05; n = 4)

Abb. C: VSMC wurden mit einem ICMT-exprimierenden oder einem Kontrollplasmid (Expression von GFP) transfiziert. Die Ras- Aktivität wurde durch einen Ras Aktivitäts ELISA bestimmt (*P < 0,05; n = 4).

Abb. D: VSMC wurden mit einer konstitutiv aktiven Ras Mutante (Ras +) oder einem Kontrollplasmid (GFP) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit AGGC oder AGC versetzt und ihre Proliferation mit Hilfe des BrdU-Incorporations ELISAs bestimmt (*P 0,05; n = 4).

4.8. 3-Deazaadenosin reduziert die Neointimabildung in vivo

Zunächst wurde der in vivo Effekt von c3Ado auf die Ras Aktivität und die dehnungsinduzierte Phosphorylierung von ERK und Akt untersucht

Die Mäuse wurden mit einer täglichen Menge von 150 µg c3Ado über 2 Tage gefüttert. Anschließend wurde die A. femoralis dilatiert. Die Phosphorylierung von Akt und ERK sowie die Ras Aktivität wurden 20 Minuten nach Dilatation bestimmt. Vorbehandlung der Mäuse mit c3Ado führte zu einer signifikanten Reduktion der durch die Dilatation induzierten Aktivierung von Ras (*P < 0,05; n = 6; Abb. 22) und der Phosphorylierung von Akt und ERK (Abb. 23).

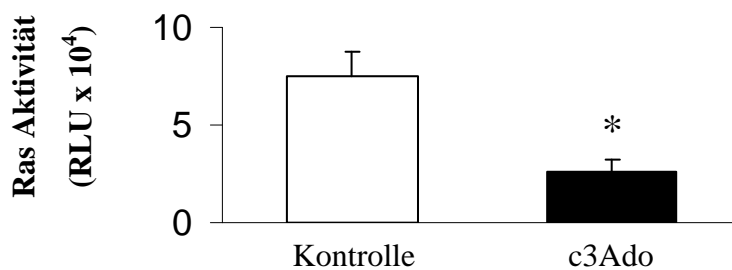


Abb. 22: Dargestellt ist die Ras Aktivität nach Dilatation der A. femoralis von Mäusen, die zuvor über 48 h die Kontrolldiät oder die Kontrolldiät + 150 µg c3Ado pro Tag erhalten hatten. Die Fütterung mit c3Ado reduzierte signifikant die dilatationsinduzierte Ras Aktivierung.

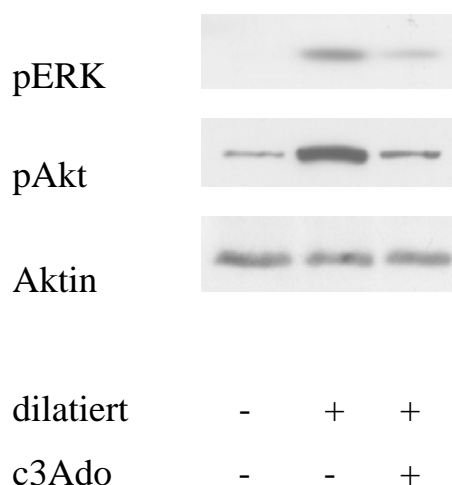


Abb. 23: Die Phosphorylierung von Akt und ERK wurde 20 Minuten nach Dilatation der A. femoralis ermittelt. Dazu wurden die Lysate der entnommenen Arterien unter Nutzung spezifischer Antikörper mit dem Western Blot Verfahren untersucht. Aktin diente als Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung der Proben.

Die Neointimabildung nach PTCA wird hervorgerufen durch Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen sowie durch Entzündungsreaktionen.

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass c3Ado die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro* hemmt, sollte nun dessen Einfluss auf die Neointimabildung in einem *in vivo* Modell untersucht werden.

Dazu wurde die Arteria femoralis von C57BL/6-Mäusen dilatiert.

Nach der Operation wurden die Mäuse mit verschieden zusammengesetztem Futter über 21 Tage gefüttert. Gruppe 1 erhielt atherogenes Futter, Gruppe 2 atherogenes Futter mit 25 mg/kg c3Ado und Gruppe 3 atherogenes Futter mit Zusatz von 50 mg/kg c3Ado. Die tägliche Aufnahme von c3Ado betrug somit in Gruppe 2: 75 µg und in Gruppe 3: 150 µg.

Die Dosierungen des c3Ado beruhen auf Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe^{90,92}, in denen wir unter gleicher oraler Dosierung einen hemmenden Einfluss von c3Ado auf die Ausbildung chronischer atherosklerotischer Läsionen nachweisen konnten.

Die täglich aufgenommene Futtermenge war in beiden Gruppen gleich, so dass ein Einfluss von c3Ado auf das Fressverhalten und somit die Kalorienaufnahme ausgeschlossen werden kann. Die Futteraufnahme betrug in der Gruppe mit Zusatz von 50 mg/kg c3Ado durchschnittlich $2,93 \pm 0,23$ g/d und in der Gruppe ohne Zusatz von c3Ado $2,95 \pm 0,18$ g/d.

Nach 21 Tagen wurde die dilatierte A. femoralis entnommen und die Neointima-Bildung untersucht.

Es zeigte sich, dass durch Fütterung mit 3-Deazaadenosin die Neointima-bildung signifikant vermindert werden konnte.

Dies kann anhand der Neointima/ Media-Ratio verdeutlicht werden. Unter atherogener Diät allein lag sie nach 21 Tagen bei $1,94 \pm 0,6$. Die tägliche Aufnahme von 150 µg c3Ado führte zu einer signifikanten Abnahme der Neointima/Media-Ratio auf $0,62 \pm 0,3$. (*P < 0,05) (Abb. 24A).

Auch die Fläche der Neointima konnte durch die Fütterung von 150 µg/d c3Ado signifikant verringert werden (Abb. 24B).

Sie betrug 4 Wochen nach Dilatation und Fütterung von atherogenen Futter $0,17 \text{ mm}^2 \pm 0,053$. Unter täglicher Aufnahme von 75 µg c3Ado betrug sie $0,12 \text{ mm}^2 \pm 0,016$. Aufnahme von 150 µg pro Tag führte zu einer signifikanten Abnahme der Neointima-Fläche um 76,47 % auf $0,04 \text{ mm}^2 \pm 0,023$ gegenüber atherogenen Futter allein (*P < 0,05).

Dies spiegelt sich auch in der Größe des Gefäßlumens nach Dilatation wieder.

Die Fläche des Lumens betrug nach Dilatation und anschließender Fütterung mit atherogenem Futter $0,02 \text{ mm}^2 \pm 0,006$. Aufnahme von $75 \text{ } \mu\text{g c3Ado}$ pro Tag zeigte eine geringe Zunahme des Lumens auf $0,035 \text{ mm}^2 \pm 0,022$. Die Aufnahme von $150 \text{ } \mu\text{g/d}$ dagegen zeigte eine signifikante Zunahme des Gefäßlumens auf $0,05 \text{ mm}^2 \pm 0,021$ (*P < 0,05)(Abb. 24D).

Die Fläche der Media wurde durch die Aufnahme von c3Ado nicht beeinflusst (*P = n.s.). Dies spricht, den in vitro Ergebnissen entsprechend, gegen einen apoptotischen oder toxischen Effekt dieser Substanz. (Abb. 24C).

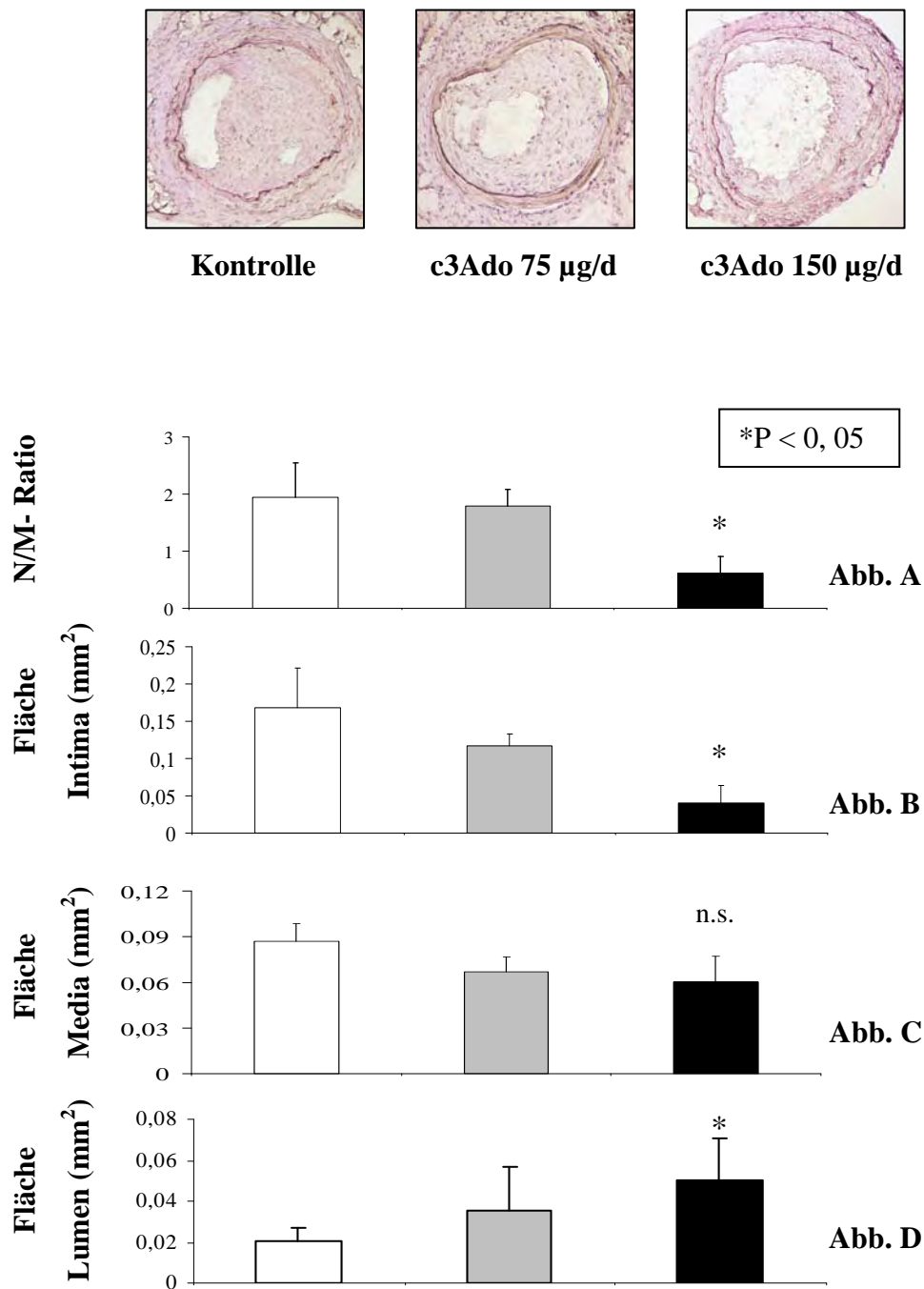


Abb. 24: In **Abb. A** ist die Neointima/ Media- Ratio dargestellt. **Abb. B- D** zeigen die verschiedenen Messgrößen der Gefäße in mm². Über den Diagrammen ist ein für jede Kondition repräsentatives Bild eines Gefäßes in H&E- Färbung dargestellt. Lichtmikroskopische Aufnahme, 10 fache Vergrößerung.

4.9. Effekt von c3Ado auf die Proliferation, Apoptose und Reendothelialisierung in vivo

Immunhistochemische Untersuchungen der Gefäßschnitte auf PCNA, einem Proliferationsmarker und Hilfsprotein der DNA- Polymerase δ , zeigen, dass die Reduktion der Neointimabildung nach c3Ado Gabe auch in vivo über eine Hemmung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen vermittelt wird.

Die tägliche Aufnahme von 150 μg c3Ado pro Tag resultierte in einer signifikanten Abnahme der Anzahl proliferierender glatter Gefäßmuskelzellen in Neointima und Media im Gegensatz zu atherogenem Futter allein (10,8 % \pm 0,8 vs. 6,7 % \pm 2; *P < 0,05).

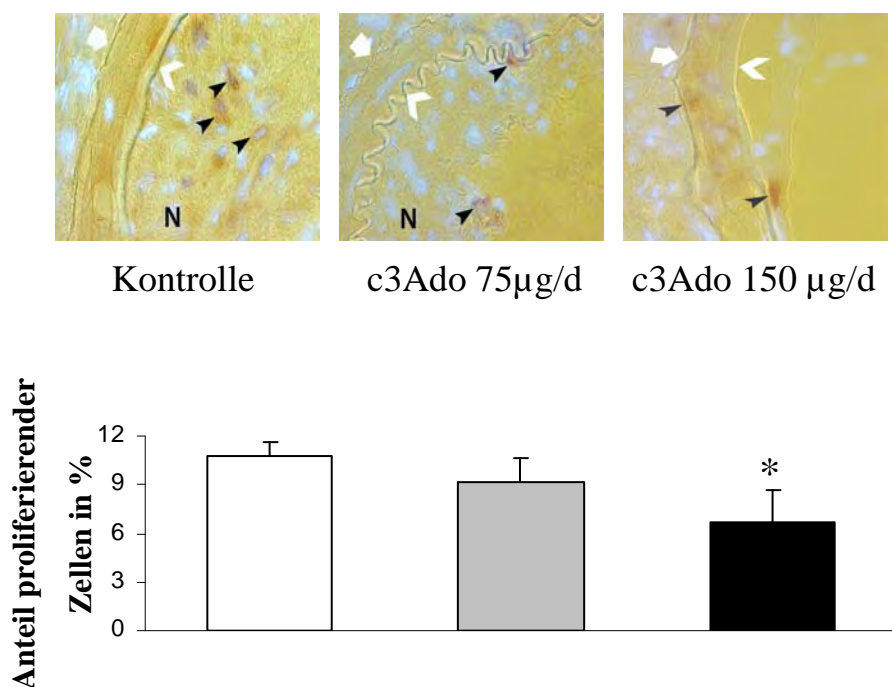


Abb. 25: Der Anteil proliferierender Zellen wurde ermittelt, indem die PCNA-exprimierenden Zellen (braun) durch die Gesamtzahl (Dapi-exprimierende Zellen, blau) der in einem Gefäßschnitt enthaltenen Zellen geteilt wurde. Durch die tägliche Aufnahme von 150 μg c3Ado wurde der Anteil PCNA- positiver Zellen signifikant reduziert (n = 6; *P < 0,05).

Über dem Diagramm ist ein für jede Kondition repräsentativer Gefäßschnitt nach immunhistochemischer Färbung für PCNA dargestellt. Die beiden weißen Pfeile markieren die Laminae elastica interna et externa (dicker Pfeil), das N steht für Neointima.

lichtmikroskopische Aufnahme mit Fluoreszenzüberlagerung, 10 fache Vergrößerung

In vitro fand sich kein Anhalt für einen apoptotischen oder toxischen Effekt von c3Ado in den getesteten Konzentrationen. Zur besseren Beurteilung dieser Substanz wurde nun auch deren Einfluss auf die Apoptoserate in vivo untersucht. Der immunhistochemische Nachweis apoptotischer Zellen in den Gefäßschnitten erfolgte mit Hilfe des „In situ Cell Death Detection Kit“ (TUNEL-Assay).

Das folgende Diagramm zeigt, dass c3Ado auch in vivo keine Apoptose induziert ($1,8 \pm 0,6$ % gegenüber $1,6 \pm 0,4$ % TUNEL positive Zellen in den Arterien von Mäusen, die täglich $150 \mu\text{g}$ c3Ado aufnahmen *P = n.s.; n = 6).

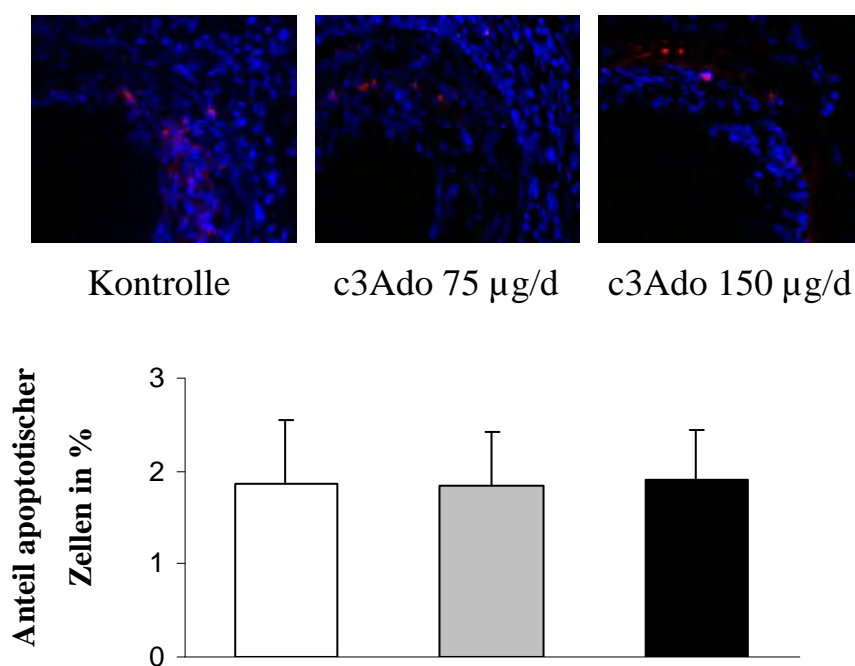


Abb. 26: Der Anteil apoptotischer Zellen wurde ermittelt, indem die TUNEL positiven Zellen (rot) durch die Gesamtzellzahl (Dapi positiv, blau) dividiert wurde.

Beim Einsatz einer antiproliferativen und antimigratorischen Substanz zur Hemmung der Restenose muss aber auch ein eventuell hemmender Effekt auf die Reendothelialisierung und Gefäßheilung mit ggf. erhöhter Thromboseneigung in Betracht gezogen werden.

Der immunhistochemische Nachweis auf Intaktheit des Endothels 3 Wochen nach Dilatation erfolgte mit der von Willebrand-Färbung.

Die Reendothelialisierung wurde definiert als prozentualer Anteil des Gefäßlumens, das wieder von einem Endothel ausgekleidet ist.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer semiquantitativen Klassifikation: (0 = keine Reendothelialisierung, 4 = Gefäß komplett von Endothel ausgekleidet, 1-3 = um jeweils ein Viertel des Gefäßlumens zunehmende Reendothelialisierung).

Die folgenden Abbildungen zeigen, dass die Behandlung mit c3Ado, selbst in der höchsten in vivo getesteten Konzentration, keinen hemmenden Effekt auf die Reendothelialisierung der Gefäße nach Dilatation besitzt (*P = n.s.; n = 6).

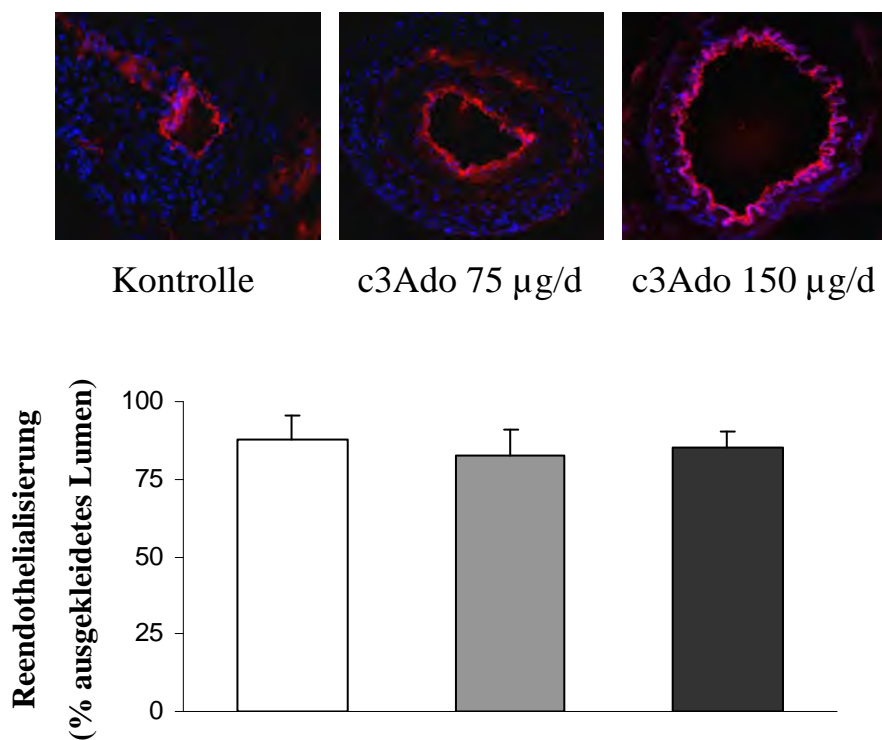


Abb. 27: Die Reendothelialisierung 21 Tage nach Dilatation wurde ermittelt durch den immunhistochemischen Nachweis der von Willebrand-Faktor exprimierender Zellen an der luminalen Seite der Neointima.

Über dem Diagramm ist ein für jede Kondition repräsentatives Bild eines Gefäßes in immunhistochemischer Färbung des von Willebrand-Faktors (rot) dargestellt. Außerdem wurden die Gefäßschnitte zur Darstellung der Zellkerne mit Dapi (blau) gegengefärbt.

5. Diskussion

Die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen spielen neben der Inflammation eine Hauptrolle in der Pathogenese vaskuloproliferativer Erkrankungen. Normalerweise sind VSMCs in der Tunica media des Gefäßes lokalisiert und liegen dort in einem nicht proliferativen Stadium vor. Verletzung oder mechanischer Stress bewirken eine Migration der VSMCs in die Intima des Gefäßes, wo sie proliferieren und somit eine Verdickung der Intima bewirken. Diese neointimale Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen bildet die Grundlage für die Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen.^{23,97,98} Die Identifizierung von Regulationsmechanismen, die die Antwort der glatten Gefäßmuskelzellen auf eine Verletzung der Gefäßwand regulieren, ist daher von hohem Interesse. Die Identifizierung und Charakterisierung der an diesen Signaltransduktionsmechanismen beteiligten Moleküle ist daher eine wichtige Voraussetzung um sichere und effiziente Strategien für die Prävention und Behandlung vaskuloproliferativer Erkrankungen zu entwickeln.

3-Deazaadenosin beeinflusst eine Vielzahl zellulärer Funktionen, die an der Entwicklung von Atherosklerose und Restenose beteiligt sind. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beispielsweise zeigen, dass c3Ado die endotheliale ICAM-1 und VCAM-1 Expression in vivo reduzieren kann und dass es die Diät-induzierte Plaque-Bildung in apoE^{-/-}-Mäuse hemmt.^{90,92} Neben diesen antiinflammatorischen Wirkungen ist über den genauen molekularen Wirkmechanismus dieser Substanz noch wenig bekannt.

In der hier vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass die Hemmung der SAH-hydrolase durch c3Ado die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen hemmt und somit auch die Entwicklung einer Restenose nach Angioplastie verhindert.

Es wird der Nachweis erbracht, dass c3Ado die Methylierung der Ras-Proteine hemmt. Dadurch verhindert es die durch mitogene Stimulation hervorgerufene Aktivierung des PI3-Kinase/Akt- und des ERK-Signaltransduktionsweges. Beide sind essentiell für den Eintritt glatter Gefäßmuskelzellen in den Zellzyklus. Tatsächlich führt die Behandlung von VSMCs mit c3Ado zu einer Stabilisierung von p21^{cip/waf1} und p27^{Kip1}. Diese Zellzyklus-hemmenden Proteine verhindern die posttranskriptionale Aktivierung der G1-Phase Zykline. Somit verhindert c3Ado den Eintritt glatter Gefäßmuskelzellen in den Zellzyklus

und infolgedessen auch deren Fähigkeit zur Proliferation. Interessanterweise wird dieser antiproliferative Effekt nicht durch eine Apoptoseinduktion begleitet.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Hemmung der Aktivität von Methyltransferasen und die dadurch bedingte verminderte Methylierung und somit Aktivierung von Signalmolekülen, ein interessantes Ziel antiproliferativer Strategien darstellen könnte.

Außerdem kann mit Hilfe der hier vorgelegten Ergebnisse die Wirksamkeit von c3Ado in einem in vivo Modell bestätigt werden: Die orale Gabe dieser Substanz reduziert effektiv die Neointimabildung nach Angioplastie.

5.1. 3-Deazaadenosin hemmt die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen über eine Hemmung der Zellzyklusprogression

In der hier vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss von c3Ado auf das Proliferationsverhalten glatter Gefäßmuskelzellen untersucht, da dieser Vorgang einen Schlüsselschritt in der Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen und der Restenose nach Angioplastie darstellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass c3Ado dosisabhängig die Proliferation von VSMCs hemmt. Interessanterweise ist dies weder durch einen apoptotischen oder toxischen Effekt dieser Substanz bedingt.

3-Deazaadenosin ist bekannt als einer der stärksten Inhibitoren der SAH-hydrolase.⁸¹ In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der SAH-hydrolase effektiv die Proliferation vaskulärer Zellen verhindert.⁹⁹

Über die genauen molekularen Mechanismen der durch c3Ado vermittelten Hemmung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, gibt es allerdings noch keine weitergehenden Untersuchungen. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst die FACS-Analyse propidiumjodidgefärbter Zellen genutzt, um die Zellzyklusverteilung von VSMCs nach Behandlung mit c3Ado zu untersuchen. Die durch diese Untersuchung ermittelten Ergebnisse zeigen, dass c3Ado die Zellzyklusprogression bereits sehr früh in der G0/G1-Phase hemmt.

In den nachfolgenden Western Blot Analysen zeigte sich als Zeichen der tatsächlichen Hemmung der Zellzyklusprogression am Übergang von der G0/G1- in die S-Phase des Zellzyklus eine verminderte Phosphorylierung des Retinoblastom-Genproduktes, eine Stabilisierung der zellzyklushemmenden Proteine p21^{cip/waf1} und p27^{Kip1} sowie eine verminderte Expression der Zykline D, E, A1 und B.

Es ist deutlich zu erkennen, dass c3Ado nicht spezifisch die Expression eines einzelnen hier getesteten G0/G1-Phaseproteins reguliert. Dies weist auf ein Eingreifen dieser Substanz in übergeordnete, für die Regulation der frühen Phase des Zellzyklus verantwortliche, Signaltransduktionswege hin.

5.2. c3Ado verhindert die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt und des ERK-Signaltransduktionsweges über eine Hemmung der ICMT-abhängigen posttranslationalen Methylierung der Ras-Proteine

In vorausgegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sowohl der MAPK- als auch der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweg für den geordneten Ablauf von Zellzykluseintritt und –progression durch die G0/G1-Phase sowie die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen essentiell sind.⁹⁸ Wie oben bereits gezeigt, hemmt c3Ado die Zellzyklusprogression in der frühen G0/ G1 Phase und die Proliferation von VSMC. Aus diesem Grund wurde nun getestet, ob die Applikation dieser Substanz einen Einfluss auf diese Signaltransduktionswege hat.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass c3Ado dosisabhängig die Phosphorylierung und somit die Aktivierung beider Signaltransduktionswege hemmt. Inkubation mit c3Ado hemmte dosisabhängig die durch Wachstumsmedium stimulierte Aktivierung von p42/44 MAPK (ERK) und seiner übergeordneten Kinase pRaf. Hemmung von ERK resultierte in einer verminderten Phosphorylierung von Rb und somit einer Hemmung der Zellzyklusprogression sowie in einer Stabilisierung der Zellzyklusinhibitoren p21^{cip/waf1} und p27^{Kip1}.

Des Weiteren verhinderte die Inkubation mit c3Ado dosisabhängig die Phosphorylierung der Protein-abhängigen Kinase 1 (PDK1), der Proteinkinase B (Akt) sowie des Forkhead-Transkriptionsfaktors Fox01a, der bekannt ist für die Regulation der Expression von p27^{Kip1} und den D-Zyklinen. Fox01a bindet im nicht phosphorylierten Zustand an den p27^{Kip1}-Promotor und gewährleistet eine konstante Transkription der p27^{Kip1} mRNA und somit einen konstanten Proteinspiegel dieses Zellzyklusinhibitors.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass c3Ado in Signalwege eingreift, die sowohl der PI3-Kinase wie auch der MAPK übergeordnet sind.

Aktivierung der MAPK und der PI3-Kinase/Akt sind abhängig von Ras, einer GTPase, die eine Vielzahl zellulärer Funktionen reguliert, wie z.B.: Wachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose. Damit Ras aktiviert werden kann, muss es an der Zellmembran verankert werden.⁵³⁻⁵⁵ Ras- Proteine können jedoch erst nach einer Reihe von posttranslationalen Modifikationen an ihrem carboxyterminalen Ende mit der Zellmembran assoziieren. Diese beinhalten Farnesylierung, Proteolyse und Methylierung der CAAX-Sequenz. Für den

letzten Schritt, die Methylierung, benötigt die Zelle die ICMT, die eine Methylgruppe auf das farnesylierte Cystein überträgt.¹⁰⁰⁻¹⁰²

Die Methylierung von CAAX-Proteinen wird von einer Reihe inflammatorischer und mitogener Reize aktiviert, wie z.B.: TNF- α ¹⁰³, einem hohen Glucosespiegel¹⁰⁴ und N-formyl-Met-Leu-Phe.⁵⁹ Die Methylierung scheint somit ein viel genutzter Mechanismus zur Aktivierung von Signalproteinen zu sein.

Die Wichtigkeit ICMT-abhängiger Methylierungen wird durch die Arbeit von Bergo et al deutlich, in der gezeigt werden konnte, dass ICMT-defiziente Mäuse nicht lebensfähig sind.¹⁰⁵

Die ICMT benötigt für die Übertragung der Methylgruppe auf die Ras Proteine SAM als Methylgruppendonor (siehe Abb. 28, S. 79). Aus dem SAM entsteht nach Abgabe der Methylgruppe SAH. Dieses wird mit Hilfe der SAH-hydrolase sofort in Adenosin und Homocystein gespalten. Hemmung der SAH-hydrolase führt zu einer Akkumulation von SAH in der Zelle. Der erhöhte SAH-Spiegel wirkt nun als potenter Hemmstoff für die ICMT, wodurch eine Methylierung und nachfolgende Aktivierung der Ras-Proteine nicht mehr möglich ist.¹⁰⁶

3-Deazaadenosin ist ein potenter Hemmstoff der SAH-hydrolase.⁸¹

Dies lässt den Schluss zu, dass c3Ado über die Hemmung der SAH-hydrolase in aktivierten VSMCs eine gesteigerte Methylierung, durch Hemmung der Aktivität von Methyltransferasen, und somit auch Aktivierung von Signalmolekülen verhindert.

Tatsächlich zeigen die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse, dass c3Ado dosisabhängig die durch mitogene Reize stimulierte Membranbindung und Aktivierung der Ras-Proteine hemmt. Durch Überexpression einer aktiven Ras-Mutante konnte die antiproliferative Wirkung von c3Ado auf glatte Gefäßmuskelzellen nahezu vollständig verhindert werden. Die Hemmung der Signalweiterleitung über die Ras-Proteine scheint somit der Hauptmechanismus der antiproliferativen c3Ado Wirkung zu sein.

Wie oben aufgeführt zeigen vorangegangene Arbeiten, dass eine Hemmung der SAH-hydrolase über eine Produkthemmung auch zu einer Verminderung der Aktivität SAM-abhängiger Methyltransferasen führt.^{61,107} Aus diesem Grund wurde in der hier vorliegenden Arbeit untersucht, in wie weit die Behandlung glatter Gefäßmuskelzellen mit c3Ado einen Einfluss auf die Aktivität der ICMT hat. Zunächst zeigte sich, dass der ICMT-Hemmstoff AGGC ebenso wie c3Ado die Ras-Aktivierung und die Proliferation

glatter Gefäßmuskelzellen hemmt. Die Wirkung von c3Ado auf die Ras-Aktivierung konnte allerdings durch Überexpression der ICMT verhindert werden.

Es wird deutlich, dass c3Ado die Ras-Methylierung und Aktivierung über eine, durch Hemmung der SAH-hydrolase bedingte, verminderte Aktivität der ICMT reguliert.

Die hier aufgeführten Ergebnisse bestätigen Beobachtungen von Wang et al⁹⁹, die in ihrer Arbeit demonstrierten, dass eine Hemmung der SAH-hydrolase durch die Co-Inkubation von Endothelzellen mit Homocystein und einem Adenosindesaminasehemmstoff die Aktivität der ICMT hemmt. Dies führte zu einer Abnahme der Carboxylmethylierung und Plasmamembran-translokation von v-H Ras wie auch zu einer verminderten Proliferation der inkubierten Endothelzellen.

5.3. Einfluss von c3Ado auf die Neointimabildung nach Angioplastie

Erst kürzlich wurde auf die Rolle der Ras-GTPase im vaskulären Gleichgewicht und in der Entwicklung vaskulärer Erkrankungen hingewiesen. Die Abhängigkeit der p42/44 MAPK-Aktivierung von der Ras-GTPase in der frühen Phase nach Angioplastie konnte mit Hilfe eines Schweinmodells demonstriert werden.¹⁰⁸ Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die lokale Applikation eines Plasmids, codierend für einen dominant negativen H-Ras-Mutanten (N17 und L61, S186)¹⁰⁹, der durch einen Adenovirus vermittelte Transfer eines dominant negativen H-Ras¹¹⁰ oder die Verhinderung der posttranslationalen Modifizierung der Ras-Proteine durch lokale Applikation eines Farnesyltransferasehemmstoffs⁷³ die Aktivierung der p42/44 MAPK hemmt und signifikant die Neointimabildung nach Angioplastie reduziert. Insbesondere die Ergebnisse der erst kürzlich erschienenen Veröffentlichung von Winter-Vann et al zeigen, dass die Hemmung der auf die Farnesylierung folgenden posttranslationalen Modifikationen der Ras-Proteine, und hier im Besonderen die ICMT-abhängige Methylierung, wahrscheinlich der effektivste Ansatz zur Kontrolle der Zellproliferation darstellt.¹¹¹

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen können wir in der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass c3Ado über das Eingreifen in die ICMT-abhängige Ras-Methylierung und Signalweiterleitung die Neointimabildung nach Angioplastie reduzieren kann.

Interessanterweise konnten Winter- Vann et al in einer weiteren Arbeit zeigen, dass die Hemmung der SAH-hydrolase und daraus folgend der Signaltransduktion über Ras, auch die entscheidende Komponente des antiproliferativen Effekts von Methotrexat, einem der erfolgreichsten antiproliferativen Substanzen in der Krebstherapie, ist. Sie zeigten, dass

dieser Effekt von der ICMT abhängig ist. ICMT-defiziente Zellen waren gegenüber dem antiproliferativen Effekt des Methotrexats resistent.⁶²

In weiteren, hiervon unabhängigen Untersuchungen konnte in der Tat gezeigt werden, dass Methotrexat außerdem erfolgreich zur Verhinderung einer In-Stent-Restenose in einem Schweinekoronararterienmodell eingesetzt werden konnte, was die Effektivität dieses Therapieansatzes einer Methylierungshemmung unterstreicht.¹¹²

Neben dem in dieser Arbeit dargestellten antiproliferativen Effekt von c3Ado auf glatte Gefäßmuskelzellen, wurde in anderen Veröffentlichungen ein hemmender Effekt von c3Ado auf die ROS-Produktion⁸⁰, die Expression von Adhäsionsmolekülen^{91,92}, das Leukozytenrecruitment und die Monocyten- und T-Zell-Aktivierung¹¹³ beschrieben. Diese Faktoren könnten zusätzlich zur Reduktion der Neointimabildung beitragen.

Weiterhin zeigen die hier vorgelegten Ergebnisse einen Einfluss von c3Ado auf die Migration glatter Gefäßmuskelzellen. Es ist bekannt, dass auch die Migration von VSMCs einen Schlüsselmechanismus in der Pathogenese vaskuloproliferativer Erkrankungen darstellt.⁷ Die Hemmung der Zellmigration durch c3Ado könnte daher zusätzlich zur Reduktion der Neointimabildung in vivo beitragen. Mechanistisch konnten Harrington et al demonstrieren, dass eine Hemmung der SAH-hydrolase durch Adenosin und Homocystein den Zusammenbau des fokalen Adhäsionskomplexes stört.¹¹⁴ Dieser ist für die Migration essentiell. Des Weiteren bedarf es für die Migration den geordneten Ablauf der Ras-Signaltransduktion.¹¹⁵ Somit könnte c3Ado auch über diese Mechanismen die Migration beeinflussen. Der antimigratorische Effekt des c3Ado muss allerdings nicht ein spezifischer Effekt dieser Substanz sein. Eine weitere Möglichkeit wäre der hemmende Effekt des c3Ado auf die Zellzyklusprogression, da bekannt ist, dass diese nicht nur die Proliferation von VSMCs, sondern darüber hinaus eine Reihe weiterer zellulärer Funktionen wie Differenzierung, Entzündung und auch die Migration beeinflusst.⁹⁸ Die Frage, ob c3Ado also spezifisch oder eher indirekt über eine Zellzyklushemmung die zelluläre Migration reguliert, kann nur mit Hilfe weiterer Untersuchungen geklärt werden.

5.4. Kein apoptotischer oder toxischer Effekt von c3Ado

Vorangegangene Studien beschreiben, dass eine Hemmung der ICMT und nachfolgend der Signaltransduktion über Ras eine erhöhte Apoptoserate in Endothelzellen von Pulmonalarterien verursachen kann.⁶¹ Des Weiteren wurde ein antiapoptotischer Effekt der Ras-abhängigen Akt-Aktivierung für eine Reihe verschiedener Zelltypen beschrieben.^{61,107,116} In Anbetracht der Tatsache, dass c3Ado somit auch Einfluss auf die Proliferation und Apoptose endothelialer Zellen haben könnte, wurde in dieser Arbeit die Reendothelialisierung der Gefäße 3 Wochen nach Dilatation untersucht. Eine verminderte Reendothelialisierung nach Angioplastie würde eine thrombogene Oberfläche darstellen, die Ursprung erneuter kardiovaskulärer Ereignisse sein könnte. In der hier vorgelegten Arbeit zeigte sich aber kein Unterschied zwischen der Reendothelialisierung der Kontrollgefäße und der Gefäße unter Applikation von c3Ado. Die therapeutische Applikation dieser Substanz scheint daher nicht von einem erhöhten Thromboserisiko im dilatierten Gefäßabschnitt begleitet zu sein.

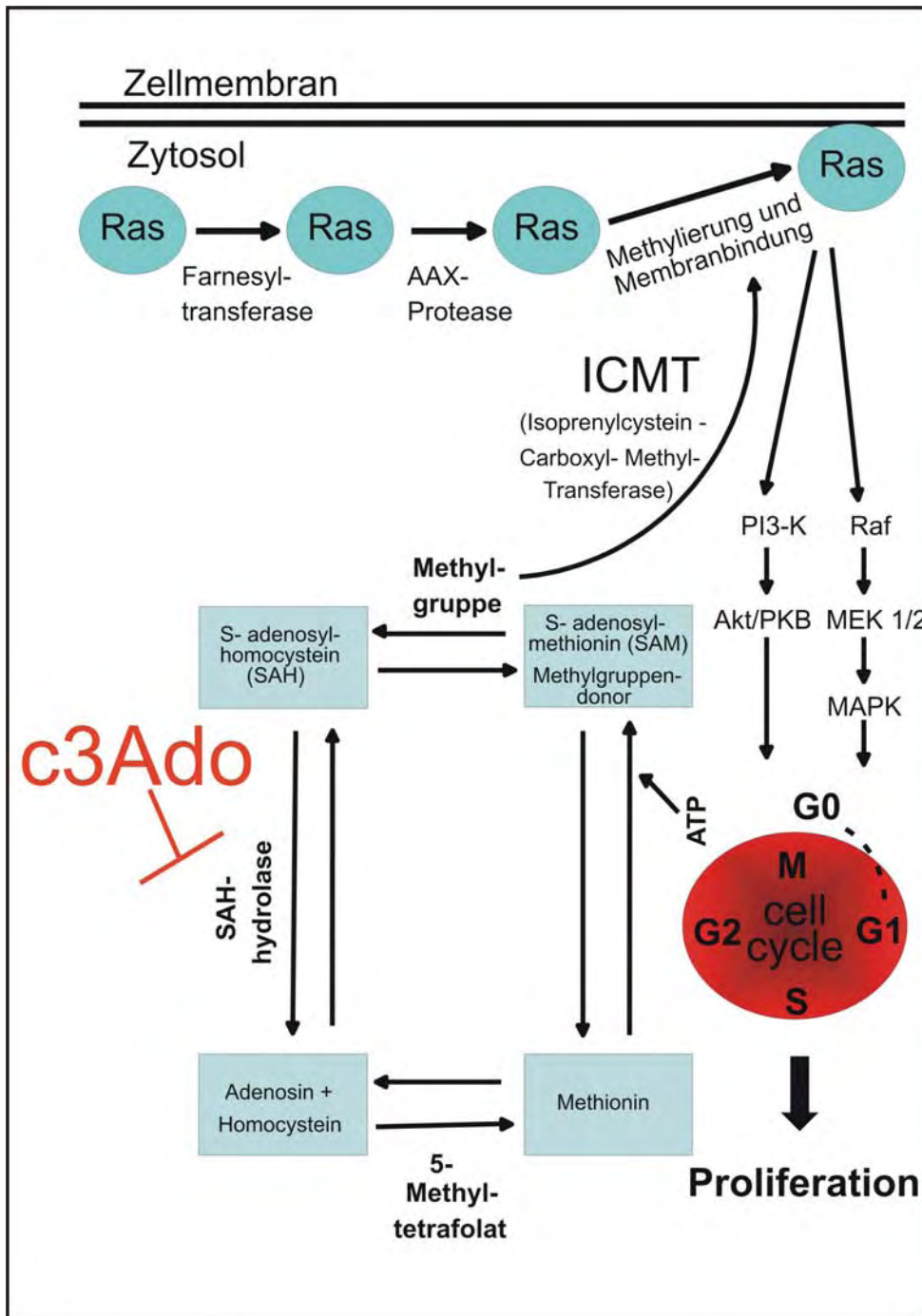
Darüber hinaus zeigen die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse, dass c3Ado auch in der höchsten hier getesteten Konzentration weder *in vitro* noch *in vivo* Apoptose induziert. Auch fand sich kein Anhalt für einen toxischen Effekt dieser Substanz (Nachgewiesen mit Hilfe der Trypanblaufärbung, der Reversibilität des antiproliferativen Effekts nach Absetzen von c3Ado und der Quantifizierung der Fläche der Media *in vivo*, die trotz der Applikation von c3Ado nach Dilatation im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht ausdünnte). Diese Ergebnisse lassen sich sehr gut mit denen von Wu et al vereinbaren, die in ihrer Arbeit zeigten, dass der spezifische, reversible Typ III SAH-hydrolase Hemmstoff DZ2002, neben seiner potenten inhibitorischen Wirkung keine toxischen Effekte aufweist.¹¹³ Auch wurde in einer vorangegangenen Arbeit beschrieben, dass c3Ado die Thrombin-abhängige Endothelzellaktivierung verhindert, ohne dabei zytotoxische Effekte aufzuweisen.⁹¹

Im Hinblick auf Toxizität und Sicherheit bei potenzieller therapeutischer Gabe, scheint die Hemmung der SAH-hydrolase durch c3Ado somit gleichermaßen effektiv und sicher zu sein.

Fasst man die hier beschriebenen Ergebnisse zusammen, so sieht man, dass c3Ado die VSMC Proliferation in akuten und frühen Läsionen sowie die daran beteiligten Entzündungsvorgänge hemmt, ohne Induktion von Apoptose in den stabilen Läsionen.

C3Ado scheint somit eine attraktive Substanz zur Verhinderung sowohl chronischer als auch akuter Gefäßerkrankungen zu sein.

Mechanistisch stellt die durch Applikation von c3Ado hervorgerufene Verhinderung der zellulären Proteinmethylierung durch Hemmung der SAH-hydrolase, der ICMT und somit der Signaltransduktion über die Ras-Proteine einen interessanten therapeutischen Angriffspunkt zur Behandlung vaskuloproliferativer Erkrankungen dar.



M. Tröbs

Abb. 28: Übersicht

6. Zusammenfassung

3- Deazaadenosin ist ein effektiver Hemmstoff der die Aktivität zellulärer Methyltransferasen regulierenden SAH-hydrolase. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass c3Ado über seine antiinflammatorischen Wirkungen die Bildung atherosklerotischer Läsionen verhindern kann. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von c3Ado auf die Funktion glatter Gefäßmuskelzellen und die Bildung einer Neointima in vivo untersucht, da diesen Vorgängen eine Schlüsselrolle in der Entstehung und bei Komplikationen vaskuloproliferativer Erkrankungen zukommt.

Die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen in vitro wurde durch die Applikation von c3Ado dosisabhängig reduziert. Dies war begleitet von einer gesteigerten Expression der Zyklin- Kinase- Inhibitoren p21^{waf/cip1} und p27^{Kip1}, einer verminderten Expression der G1/S-Phase Zykline und einer verminderten Phosphorylierung des Retinoblastom-Genproduktes. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich in der FACS-Analyse propidiumjodidgefärbter Zellen ein Zellzyklusarrest in der G0/ G1-Phase des Zellzyklus. Diese Effekte waren weder durch eine gesteigerte Apoptoserate noch durch eine erhöhte Toxizität dieser Substanz bedingt.

Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass die Applikation von c3Ado über die Hemmung der SAH-hydrolase zu einer verminderten Aktivität der ICMT führt. Dies hemmt den letzten Schritt der posttranslationalen Modifikationen der Ras-Proteine, die Carboxymethylierung. Die Translokalisierung von Ras an die Plasmamembran und dessen nachfolgende Aktivierung ist somit nicht mehr möglich. Folge ist eine Hemmung der Ras-abhängigen Signaltransduktionswege. Entsprechend dieser Ergebnisse zeigten weitere Western Blot Analysen eine dosisabhängige Abnahme der FCS-induzierten ERK und Akt-Phosphorylierung. Durch die Überexpression einer konstitutiv aktiven Ras-Mutante konnte der Effekt von c3Ado auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen aufgehoben werden.

Für die in vivo Versuche wurde die A. femoralis von C57BL/6 Mäusen dilatiert. Anschließend erhielten sie eine atherogene Diät ohne oder mit Zusatz von c3Ado. Die Fütterung mit 150 µg c3Ado verhinderte die durch Dilatation induzierte Ras-Aktivierung sowie die Phosphorylierung von Akt und ERK. Des Weiteren führte die orale Aufnahme von c3Ado über 21 Tage nach Dilatation zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl proliferierender Zellen in Neointima und Media sowie der Fläche der Neointima im

Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch in vivo führte die Applikation von c3Ado nicht zu einer Steigerung der Apoptoserate.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass c3Ado in die Ras-Methylierung und Aktivierung eingreift und somit die mitogene Aktivierung von ERK und Akt hemmt. Dies resultiert in einer Hemmung des Zellzykluseintritts, einer verminderten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und somit auch in einer reduzierten Neointimabildung nach Angioplastie.

Somit könnte die Hemmung der SAH-hydrolase durch c3Ado einen neuen Ansatz zur Verhinderung vaskuloproliferativer Erkrankungen darstellen.

7. Abstract

3-Deazaadenosine (c3Ado) is a potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine (SAH)-hydrolase which regulates cellular methyltransferase activity. In the present study we sought to determine c3Ado's effect on vascular smooth muscle cell (VSMC) function and neointima formation in vivo.

C3Ado dose-dependently prevented the proliferation and migration of human coronary VSMC in vitro. This was accompanied by an increased expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1}, a decreased expression of G1/S-phase cyclins and a lack of retinoblastoma protein hyperphosphorylation. In accordance with these findings, FACS analysis of propidium iodide stained cells indicated a cell cycle arrest in the G0/G1 phase. Importantly, c3Ado did not affect the number of viable (trypan blue exclusion) or apoptotic cells (TUNEL). Mechanistically, c3Ado prevented FCS-induced Ras carboxyl methylation, membrane translocation and activity by inhibiting isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase, and reduced FCS-induced ERK 1/2 and Akt phosphorylation in a dose-dependent manner. Conversely, rescuing signal transduction by overexpression of a constitutive active Ras mutant abrogated c3Ado's effect on proliferation.

For in vivo studies, the femoral artery of C57BL/6 mice was dilated and mice were fed with a diet containing 150 µg c3Ado/day. c3Ado prevented dilation-induced Ras-activation as well as ERK 1/2 and Akt phosphorylation in vivo. At day 21, VSMC proliferation ($7.9 \pm 0.7\%$ vs. $10.8 \pm 0.8\%$ PCNA pos. cells, $P < 0.05$) as well as the neointima/media ratio (0.7 ± 0.2 vs. 1.6 ± 0.4 ; $P < 0.05$) were significantly reduced, without any changes in the number of apoptotic cells.

Our data indicate that c3Ado interferes with Ras methylation and function and thereby with mitogenic activation of ERK 1/2 and Akt, preventing VSMC cell cycle entry and proliferation and neointima formation in vivo. Thus, therapeutic inhibition of SAH-hydrolase by c3Ado may represent a novel approach to prevent vascular proliferative disease.

8. Literaturverzeichnis

1. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. 1999;353:1547-57.
2. Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H, Ohishi H. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12:616-23.
3. Serruys PW, Luijten HE, Beatt KJ, Geuskens R, de Feyter PJ, van den Brand M, Reiber JH, ten Katen HJ, van Es GA, Hugenholtz PG. Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2, 3, and 4 months. *Circulation*. 1988;77:361-71.
4. Kuntz RE, Baim DS. Prevention of coronary restenosis: the evolving evidence base for radiation therapy. *Circulation*. 2000;101:2130-3.
5. Fajadet J, Morice MC, Bode C, Barragan P, Serruys PW, Wijns W, Constantini CR, Guermontprez JL, Eltchaninoff H, Blanchard D, Bartorelli A, Laarman GJ, Perin M, Sousa JE, Schuler G, Molnar F, Guagliumi G, Colombo A, Ban Hayashi E, Wulfert E. Maintenance of long-term clinical benefit with sirolimus-eluting coronary stents: three-year results of the RAVEL trial. *Circulation*. 2005;111:1040-4.
6. Mangi AA, Dzau VJ. Gene therapy for human bypass grafts. *Ann Med*. 2001;33:153-5.
7. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:791-804.
8. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-43.
9. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138:S419-20.
10. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973;180:1332-9.

11. Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2000;2:422-9.
12. Velican C, Velican D. Coronary arteries in children up to the age of ten years II. Intimal thickening and its role in atherosclerotic involvement. *Med Interne.* 1976;14:17-24.
13. Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH, Simonet L, Wilcox JN. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation.* 1996;93:2178-87.
14. DeRuiter MC, Poelmann RE, VanMunsteren JC, Mironov V, Markwald RR, Gittenberger-de Groot AC. Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circ Res.* 1997;80:444-51.
15. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med.* 2002;8:403-9.
16. Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107:1411-22.
17. Campbell JH, Han CL, Campbell GR. Neointimal formation by circulating bone marrow cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;947:18-24; discussion 24-5.
18. Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, Fukumoto Y, Rabkin E, Libby P, Mitchell RN. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth- muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med.* 2001;7:738-41.
19. Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation.* 2002;106:1199-204.
20. Faxon DP, Sanborn TA, Weber VJ, Haudenschild C, Gottsman SB, McGovern WA, Ryan TJ. Restenosis following transluminal angioplasty in experimental atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1984;4:189-95.
21. Faxon DP, Weber VJ, Haudenschild C, Gottsman SB, McGovern WA, Ryan TJ. Acute effects of transluminal angioplasty in three experimental models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1982;2:125-33.
22. Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1769-76.

23. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2002;8:1249-56.
24. Liistro F, Stankovic G, Di Mario C, Takagi T, Chieffo A, Moshiri S, Montorfano M, Carlino M, Briguori C, Pagnotta P, Albiero R, Corvaja N, Colombo A. First clinical experience with a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system implantation for in-stent restenosis: immediate and long-term clinical and angiographic outcome. *Circulation.* 2002;105:1883-6.
25. Ruef J, Meshel AS, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, Thompson LJ, Subbarao VD, Dumont JA, Patterson C. Flavopiridol inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation In vivo after carotid injury in the rat. *Circulation.* 1999;100:659-65.
26. Brooks EE, Gray NS, Joly A, Kerwar SS, Lum R, Mackman RL, Norman TC, Rosete J, Rowe M, Schow SR, Schultz PG, Wang X, Wick MM, Shiffman D. CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *J Biol Chem.* 1997;272:29207-11.
27. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mintz GS, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Morris NB, Leon MB, Tripuraneni P. Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med.* 1997;336:1697-703.
28. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, Cutlip DE, Ho KK, Giambartolomei A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO, Pocock SJ, Kuntz RE. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med.* 1998;339:1665-71.
29. Costa MA, Sabat M, van der Giessen WJ, Kay IP, Cervinka P, Ligthart JM, Serrano P, Coen VL, Levendag PC, Serruys PW. Late coronary occlusion after intracoronary brachytherapy. *Circulation.* 1999;100:789-92.
30. Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, Orav EJ, Ehsan A, Dell'Acqua G, Dzau VJ. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet.* 1999;354:1493-8.
31. Stillman B. Smart machines at the DNA replication fork. *Cell.* 1994;78:725-8.
32. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell.* 1993;73:1059-65.
33. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell.* 1994;79:551-5.

34. Sherr CJ. Growth factor-regulated G1 cyclins. *Stem Cells*. 1994;12 Suppl 1:47-55; discussion 55-7.
35. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999;13:1501-12.
36. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*. 1995;9:1149-63.
37. DeGregori J, Kowalik T, Nevins JR. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol*. 1995;15:4215-24.
38. Hsieh JK, Kletsas D, Clunn G, Hughes AD, Schachter M, Demoliou-Mason C. p53, p21(WAF1/CIP1), and MDM2 involvement in proliferation and apoptosis in an in vitro model of conditionally immortalized human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:636-44.
39. Hayashi S, Morishita R, Matsushita H, Nakagami H, Taniyama Y, Nakamura T, Aoki M, Yamamoto K, Higaki J, Ogihara T. Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21. *Hypertension*. 2000;35:237-43.
40. Smith RC, Wills KN, Antelman D, Perlman H, Truong LN, Krasinski K, Walsh K. Adenoviral constructs encoding phosphorylation-competent full-length and truncated forms of the human retinoblastoma protein inhibit myocyte proliferation and neointima formation. *Circulation*. 1997;96:1899-905.
41. Shelat HS, Liu TJ, Hickman-Bick DL, Barnhart MK, Vida T, Dillard PM, Willerson JT, Zoldhelyi P. Growth suppression of human coronary vascular smooth muscle cells by gene transfer of the transcription factor E2F-1. *Circulation*. 2001;103:407-14.
42. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88:323-31.
43. Perlman H, Suzuki E, Simonson M, Smith RC, Walsh K. GATA-6 induces p21(Cip1) expression and G1 cell cycle arrest. *J Biol Chem*. 1998;273:13713-8.
44. Smith RC, Branellec D, Gorski DH, Guo K, Perlman H, Dedieu JF, Pastore C, Mahfoudi A, Deneffe P, Isner JM, Walsh K. p21CIP1-mediated inhibition of cell proliferation by overexpression of the *gax* homeodomain gene. *Genes Dev*. 1997;11:1674-89.

45. Guo K, Andres V, Walsh K. Nitric oxide-induced downregulation of Cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 1998;97:2066-72.
46. King RW, Jackson PK, Kirschner MW. Mitosis in transition. *Cell*. 1994;79:563-71.
47. King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*. 1996;274:1652-9.
48. Olson MF, Marais R. Ras protein signalling. *Semin Immunol*. 2000;12:63-73.
49. Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:779-827.
50. Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol*. 2000;10:147-54.
51. Kolch W, Kotwaliwale A, Vass K, Janosch P. The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert Rev Mol Med*. 2002;2002:1-18.
52. Chien KR, Olson EN. Converging pathways and principles in heart development and disease: CV@CSH. *Cell*. 2002;110:153-62.
53. Gibbs JB. Ras C-terminal processing enzymes--new drug targets? *Cell*. 1991;65:1-4.
54. Lacal PM, Pennington CY, Lacal JC. Transforming activity of ras proteins translocated to the plasma membrane by a myristoylation sequence from the src gene product. *Oncogene*. 1988;2:533-7.
55. Willumsen BM, Christensen A, Hubbert NL, Papageorge AG, Lowy DR. The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature*. 1984;310:583-6.
56. Chiu VK, Silletti J, Dinsell V, Wiener H, Loukeris K, Ou G, Philips MR, Pillinger MH. Carboxyl methylation of Ras regulates membrane targeting and effector engagement. *J Biol Chem*. 2004;279:7346-52.
57. Haubruck H, McCormick F. Ras p21: effects and regulation. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1072:215-29.
58. Boyartchuk VL, Ashby MN, Rine J. Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis. *Science*. 1997;275:1796-800.
59. Philips MR, Pillinger MH, Staud R, Volker C, Rosenfeld MG, Weissmann G, Stock JB. Carboxyl methylation of Ras-related proteins during signal transduction in neutrophils. *Science*. 1993;259:977-80.
60. Medina M, Urdiales JL, Amores-Sanchez MI. Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions. *Eur J Biochem*. 2001;268:3871-82.

61. Kramer K, Harrington EO, Lu Q, Bellas R, Newton J, Sheahan KL, Rounds S. Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase activity modulates endothelial cell apoptosis. *Mol Biol Cell*. 2003;14:848-57.
62. Winter-Vann AM, Kamen BA, Bergo MO, Young SG, Melnyk S, James SJ, Casey PJ. Targeting Ras signaling through inhibition of carboxyl methylation: an unexpected property of methotrexate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:6529-34.
63. Libby P. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am J Cardiol*. 2003;91:3A-6A.
64. Nabel EG, Yang Z, Liptay S, San H, Gordon D, Haudenschild CC, Nabel GJ. Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induce intimal hyperplasia in vivo. *J Clin Invest*. 1993;91:1822-9.
65. Taylor DS, Cheng X, Pawlowski JE, Wallace AR, Ferrer P, Molloy CJ. Epiregulin is a potent vascular smooth muscle cell-derived mitogen induced by angiotensin II, endothelin-1, and thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1633-8.
66. Dobrowolski S, Harter M, Stacey DW. Cellular ras activity is required for passage through multiple points of the G0/G1 phase in BALB/c 3T3 cells. *Mol Cell Biol*. 1994;14:5441-9.
67. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 1995;80:179-85.
68. Crul M, de Klerk GJ, Beijnen JH, Schellens JH. Ras biochemistry and farnesyl transferase inhibitors: a literature survey. *Anticancer Drugs*. 2001;12:163-84.
69. Peeper DS, Upton TM, Ladha MH, Neuman E, Zalvide J, Bernards R, DeCaprio JA, Ewen ME. Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein. *Nature*. 1997;386:177-81.
70. Delmas C, Manenti S, Boudjelal A, Peyssonnaud C, Eychene A, Darbon JM. The p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation triggers p27Kip1 degradation independently of CDK2/cyclin E in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem*. 2001;276:34958-65.
71. Leone G, DeGregori J, Sears R, Jakoi L, Nevins JR. Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature*. 1997;387:422-6.
72. Aktas H, Cai H, Cooper GM. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol*. 1997;17:3850-7.

73. Work LM, McPhaden AR, Pyne NJ, Pyne S, Wadsworth RM, Wainwright CL. Short-term local delivery of an inhibitor of Ras farnesyltransferase prevents neointima formation in vivo after porcine coronary balloon angioplasty. *Circulation*. 2001;104:1538-43.
74. Kops GJ, Burgering BM. Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med*. 1999;77:656-65.
75. Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*. 2000;404:782-7.
76. Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature*. 1999;398:630-4.
77. Kwon TK, Nagel JE, Buchholz MA, Nordin AA. Characterization of the murine cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27Kip1. *Gene*. 1996;180:113-20.
78. Sedding DG, Seay U, Fink L, Heil M, Kummer W, Tillmanns H, Braun-Dullaeus RC. Mechanosensitive p27Kip1 regulation and cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2003;108:616-22.
79. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*. 2001;3:245-52.
80. Braun-Dullaeus RC, Dietrich S, Schoaff MJ, Sedding DG, Leithaeuser B, Walker G, Seay U, Matthias RF, Kummer W, Tillmanns H, Haberbosch W. Protective effect of 3-deazaadenosine in a rat model of lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction. *Shock*. 2003;19:245-51.
81. Djurhuus R, Svardal AM, Ueland PM. Differential effects on growth, homocysteine, and related compounds of two inhibitors of S-adenosylhomocysteine catabolism, 3-deazaadenosine, and 3-deazaaristeromycin, in C3H/10T1/2 cells. *Cancer Res*. 1989;49:324-30.
82. Jurgensen CH, Huber BE, Zimmerman TP, Wolberg G. 3-deazaadenosine inhibits leukocyte adhesion and ICAM-1 biosynthesis in tumor necrosis factor-stimulated human endothelial cells. *J Immunol*. 1990;144:653-61.
83. Aksamit RR, Falk W, Cantoni GL. Inhibition of chemotaxis by S-3-deazaadenosylhomocysteine in a mouse macrophage cell line. *J Biol Chem*. 1982;257:621-5.

84. Schmidt JA, Bomford R, Gao XM, Rhodes J. 3-Deazaadenosine--an inhibitor of interleukin 1 production by human peripheral blood monocytes. *Int J Immunopharmacol.* 1990;12:89-97.
85. Jeong SY, Lee JH, Kim HS, Hong SH, Cheong CH, Kim IK. 3-Deazaadenosine analogues inhibit the production of tumour necrosis factor-alpha in RAW264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide. *Immunology.* 1996;89:558-62.
86. Pike MC, Snyderman R. Transmethylation reactions regulate affinity and functional activity of chemotactic factor receptors on macrophages. *Cell.* 1982;28:107-14.
87. Yagawa K, Nakanishi M, Hayashi S, Kaku M, Ichinose Y, Itoh T, Tomoda A, Yoneyama Y, Shigematsu N. Abolishment of inhibitory effects of 3'-deazaadenosine on superoxide generation of guinea pig phagocytes by pre-exposure to phorbol myristate acetate. *FEBS Lett.* 1986;201:287-90.
88. Smith DM, Johnson JA, Turner RA. Biochemical perturbations of BW 91Y (3-deazaadenosine) on human neutrophil chemotactic potential and lipid metabolism. *Int J Tissue React.* 1991;13:1-18.
89. Flexner CW, Hildreth JE, Kuncl RW, Drachman DB. 3-Deaza-adenosine and inhibition of HIV. *Lancet.* 1992;339:438.
90. Walker G, Langheinrich AC, Dennhauser E, Bohle RM, Dreyer T, Kreuzer J, Tillmanns H, Braun-Dullaeus RC, Haberbosch W. 3-deazaadenosine prevents adhesion molecule expression and atherosclerotic lesion formation in the aortas of C57BL/6J mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2673-9.
91. Shankar R, de la Motte CA, DiCorleto PE. 3-Deazaadenosine inhibits thrombin-stimulated platelet-derived growth factor production and endothelial-leukocyte adhesion molecule-1-mediated monocytic cell adhesion in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992;267:9376-82.
92. Langheinrich AC, Braun-Dullaeus RC, Walker G, Jeide I, Schilling R, Tammoscheit K, Dreyer T, Fink L, Bohle RM, Haberbosch W. Effects of 3-deazaadenosine on homocysteine and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2003;171:181-92.
93. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 1998;338:1042-50.
94. Jeong SY, Ahn SG, Lee JH, Kim HS, Kim JW, Rhim H, Jeong SW, Kim IK. 3-deazaadenosine, a S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, has dual effects on

- NF-kappaB regulation. Inhibition of NF-kappaB transcriptional activity and promotion of IkappaBalpha degradation. *J Biol Chem.* 1999;274:18981-8.
95. Chiang CH, Wu CP, Perng WC, Yan HC, Yu CP. Use of anti-(tumour necrosis factor-alpha) antibody or 3-deaza-adenosine as additives to promote protection by University of Wisconsin solution in ischaemia/reperfusion injury. *Clin Sci (Lond).* 2000;99:215-22.
96. Fingerhuth H, Holschermann H, Grimm H, Tillmanns H, Haberbosch W, Braun-Dullaeus RC, Stadlbauer TH. 3-Deazaadenosine prevents leukocyte invasion by suppression of adhesion molecule expression during acute cardiac allograft rejection: involvement of apoptotic cell death. *J Heart Lung Transplant.* 2004;23:970-8.
97. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol.* 1991;17:758-69.
98. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Dzau VJ. Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation.* 1998;98:82-9.
99. Wang H, Yoshizumi M, Lai K, Tsai JC, Perrella MA, Haber E, Lee ME. Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem.* 1997;272:25380-5.
100. Clarke S, Vogel JP, Deschenes RJ, Stock J. Posttranslational modification of the Ha-ras oncogene protein: evidence for a third class of protein carboxyl methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:4643-7.
101. Hancock JF, Cadwallader K, Marshall CJ. Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B). *Embo J.* 1991;10:641-6.
102. Dai Q, Choy E, Chiu V, Romano J, Slivka SR, Steitz SA, Michaelis S, Philips MR. Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1998;273:15030-4.
103. Ahmad M, Zhang Y, Papharalambus C, Alexander RW. Role of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase in tumor necrosis factor-alpha stimulation of expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:759-64.
104. Kowluru A, Li G, Metz SA. Glucose activates the carboxyl methylation of gamma subunits of trimeric GTP-binding proteins in pancreatic beta cells. Modulation in vivo by calcium, GTP, and pertussis toxin. *J Clin Invest.* 1997;100:1596-610.

105. Bergo MO, Leung GK, Ambroziak P, Otto JC, Casey PJ, Gomes AQ, Seabra MC, Young SG. Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase deficiency in mice. *J Biol Chem.* 2001;276:5841-5.
106. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP. S-Adenosylmethionine and methylation. *Faseb J.* 1996;10:471-80.
107. Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG, Galletti P, Brunone M, Zappia V. Metabolic consequences of folate-induced reduction of hyperhomocysteinemia in uremia. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8:1899-905.
108. Pyles JM, March KL, Franklin M, Mehdi K, Wilensky RL, Adam LP. Activation of MAP kinase in vivo follows balloon overstretch injury of porcine coronary and carotid arteries. *Circ Res.* 1997;81:904-10.
109. Indolfi C, Avvedimento EV, Rapacciuolo A, Di Lorenzo E, Esposito G, Stabile E, Felicciello A, Mele E, Giuliano P, Condorelli G. Inhibition of cellular ras prevents smooth muscle cell proliferation after vascular injury in vivo. *Nat Med.* 1995;1:541-5.
110. Ueno H, Yamamoto H, Ito S, Li JJ, Takeshita A. Adenovirus-mediated transfer of a dominant-negative H-ras suppresses neointimal formation in balloon-injured arteries in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:898-904.
111. Winter-Vann AM, Casey PJ. Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:405-12.
112. Huang Y, Salu K, Liu X, Li S, Wang L, Verbeken E, Bosmans J, De Scheerder I. Methotrexate loaded SAE coated coronary stents reduce neointimal hyperplasia in a porcine coronary model. *Heart.* 2004;90:195-9.
113. Wu QL, Fu YF, Zhou WL, Wang JX, Feng YH, Liu J, Xu JY, He PL, Zhou R, Tang W, Wang GF, Zhou Y, Yang YF, Ding J, Li XY, Chen XR, Yuan C, Lawson BR, Zuo JP. Inhibition of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase induces immunosuppression. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313:705-11.
114. Harrington EO, Smeglin A, Newton J, Ballard G, Rounds S. Protein tyrosine phosphatase-dependent proteolysis of focal adhesion complexes in endothelial cell apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280:L342-53.
115. Mackay DJ, Hall A. Rho GTPases. *J Biol Chem.* 1998;273:20685-8.
116. Vantler M, Caglayan E, Zimmermann WH, Baumer AT, Rosenkranz S. Systematic evaluation of anti-apoptotic growth factor signaling in vascular smooth muscle

cells. Only phosphatidylinositol 3'-kinase is important. *J Biol Chem.*
2005;280:14168-76.

9. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
A.	Arterie
Abb.	Abbildung
Ado	Adenosin
Adox	Adenosin-2',3'-dialdehyd
AGC	N-acetyl-S-geranyl-L-cystein
AGGC	N-acetyl-S-geranylgeranyl-L-cystein
AmD	Aktinomycin D
apoE	Apoplipoprotein E
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriophosphat
bFGF	Basic fibroblast growth factor
c3Ado	3- Deazaadenosin
CD	Cluster of differentiation
Cdk	Cyclin dependent kinase
CDKI	Cyclin dependent kinase Inhibitor
CO ₂	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fötale Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriophosphat
h	Stunde
HIV	Human immunodeficiency virus
ICAM- 1	Interzellulär adhesions molecule
ICMT	Isoprenylcysteinylmethyltransferase
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
MACE	Major adverse cardiac events
MCH	Major Histocompatibility complex
MCP-1	Monocyten chemoattraktives Protein 1

Met	Methionin
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPF	Mitosis promoting factor
n	Anzahl
N.	Nervus
nF- kB	Nuclear factor kappa B
nm	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
P	Wahrscheinlichkeit
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelete derived growth factor
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PTCA	perkutane transluminale Koronarangiographie
ROS	reactive oxygen species, Sauerstoffradikale
SAH	S- adenosylhomocystein
SAM	S- adosylmethionin
TLR	Target lesion revaskularisation
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
VCAM- 1	Vascular cell adhesions molecule
VSMC	Vascular smooth muscle cells

10. Publikationen

10.1. Veröffentlichungen

3- Deazaadenosine Prevents Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointima Formation by Interfering With Ras Signaling

Sedding DG, Tröbs M, Reich F, Walker G, Fink L, Haberbosch W, Tillmanns H, Bohle RM, Langheinrich AC

In revision bei circulation research.

10.2. Abstracts

3- Deazaadenosine Prevents Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointima Formation by Interfering With Ras Signaling

Sedding DG, Tröbs M, Reich F, Walker G, Fink L, Haberbosch W, Tillmanns H, Bohle RM, Langheinrich AC

112. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden

22. bis 26. April 2006

Hemmung der Ras- Methylierung durch 3- Deazaadenosin verhindert die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und die Neointimabildung

D. Sedding, M. Tröbs, F. Reich, G. Walker, W. Haberbosch, R. M. Bohle, K. Preissner, H. Tillmanns, A. Langheinrich

72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim

20. – 22. April 2006

3- Deazaadenosine Prevents Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointima Formation by Interfering With Ras Signaling

Sedding DG, Tröbs M, Reich F, Walker G, Fink L, Haberbosch W, Tillmanns H, Rau WS , Bohle RM, Langheinrich AC

American Heart Association Scientific Session, Dallas, Texas; USA

13. – 16. November 2005

3- Deazaadenosine interferes with Ras- signaling and prevents neointima formation

Sedding DG, Tröbs M, Reich F, Walker G, Fink L, Haberbosch W, Tillmanns H, Rau WS ,
Bohle RM, Langheinrich AC

The Third European Meeting on Vascular Biology and Medicine, Hamburg

28. – 30. September 2005

**3- Deazaadenosin hemmt die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen
und reduziert die Neointimaentwicklung in vivo**

M. Tröbs, F. Reich, G. Walker, R. M. Bohle, L. Fink, W. Haberbosch, H. Tillmanns, W.
Rau, A.C. Langheinrich, D.G. Sedding

13. Atherosklerose- Symposium, Erfurt

17. – 18. Juni 2005

**3-Deazaadenosin Hemmt die Proliferation und Migration Glatter
Gefäßmuskelzellen und Reduziert die Neointimaentwicklung in Vivo**

D. Sedding, M. Tröbs, F. Reich, G. Walker, R. M. Bohle, L. Fink, W. Haberbosch, W.
Rau, A. Langheinrich

71. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim

31. März – 02. April 2005

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum 30. 11. 1980

Geburtsort: Erfurt

Familienstand: ledig

Beruflicher Werdegang:

seit 01/2007: Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik I,
Leopoldina Krankenhaus der Stadt Schweinfurt
Lehrkrankenhaus der Universität Würzburg

Schulbildung

09/1991 - 06/1999 „Johann- Wilhelm- Häßler Gymnasium“, Erfurt
abgeschlossen mit der allgemeinen Hochschulreife

08/1987 - 07/1991 POS „Juri- Gagarin“ , Erfurt

Hochschulausbildung

seit 04/2000 Studium der Humanmedizin
an der „Justus- Liebig- Universität“ in Giessen

10/2006 3. Staatsexamen

09/2005 2. Staatsexamen

03/2003 1. Staatsexamen

03/2002 Physikum

Praktisches Jahr

06/2006 - 09/2006	Chirurgie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg
02/2006 - 06/2006	Innere Medizin, Universitätsklinikum Giessen und Marburg
10/2005 - 02/2006	Anästhesiologie, Klinikum Wetzlar- Braunfels

Studienbegleitende Tätigkeiten

04 - 07/2005	Studentische Hilfskraft im Physiologischen Institut, Betreuung studentischer Praktika
08/2003 - 07/2004	Studentische Hilfskraft in der Diagnostischen Radiologie

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Tillmanns für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. D. Sedding für die Überlassung dieses interessanten Themas und die vielen fruchtbaren Diskussionen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Auch gilt ihm mein Dank für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Frau Stefanie Wolfram danke ich für die Anleitungen beim experimentellen Teil dieser Arbeit und für die vielen Gespräche abseits der Versuche.

Meinem Mitdoktoranten Jan Markus Daniel danke ich für die Durchsicht dieses Manuskriptes und die vielen Anregungen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Kardiologie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz herzlichen Dank auch an meine Familie und meinem Partner Andreas Ernst, die mich während meines Studiums immer unterstützt haben.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG ISBN 3-8359-5223-4
ST AU FEN BER GRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

