

3-Deazaadenosin hemmt die Entstehung atherosklerotischer Läsionen sowie die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 im Tiermodell der apoE<sup>-/-</sup> Maus

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Inga Maren Ufer  
aus Engelskirchen

Gießen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Radiologie  
Abteilung Diagnostische Radiologie

Leiter: Prof. Dr. med. W.S. Rau  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. A. C. Langheinrich

Gutachter: Prof. Dr. med. A. Günther

Tag der Disputation: 08.07.2008

## Erklärung

„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.“

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Alphabetisches Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>6</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>7</b>
2.1 Pathogenese der Atherosklerose	7
2.2 Adhäsionsmoleküle	9
2.3 3-Deazaadenosin	12
2.4 Homocystein	13
2.5 Tiermodell	17
2.6 Lymphozyten	18
2.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit	19
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
3.1 Tiere und Tierhaltung	20
3.2 Pharmakologische Diät	20
3.2.1. Standard-Diät	20
3.2.2. Atherogene-Diät	21
3.2.3. 3-Deazaadenosin	21
3.3. Einteilung der Gruppen	21
3.4. Bestimmung der Blutwerte	21
3.5. Präparation und Explantation des Herzens und der Aorta	23
3.6. Hämalaun- und Scharlachfärbung	23
3.7. Planimetrie der Gefäßwanddicke und der atherosklerotischen Läsionen	24
3.8. Planimetrie der Intima- und Mediafläche	25
3.9. Immunhistochemie	26
3.10. Immunhistochemische Färbungen	28
3.11. Statistische Auswertung	30
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>31</b>
4.1. Körpergewicht	31
4.2 Blutwerte	31

<b>4.3 Quantifizierung atherosklerotischer Läsionen</b>	<b>33</b>
<b>4.4 Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1</b>	<b>36</b>
<b>5. Diskussion</b>	<b>39</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>46</b>
<b>6.1 Deutsch</b>	<b>46</b>
<b>6.2 Englisch</b>	<b>47</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>48</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>60</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>61</b>
<b>10. Verwendete Reagenzien</b>	<b>62</b>

## 1. Alphabetisches Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
EC-SOD	Endothelial Cell SuperOxid Dismutase
ELAM-1	Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule-1
FGF	Fibroblast Growth Factor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molecule-1
IL	Interleukin
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA-1	Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-1
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte-Chemotactic-Protein-1
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MTHFR	Methyltetrahydrofolatreduktase
NF $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PECAM	Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule
Selektin-E	Endothelial-Selektin
Selektin-L	Leukozyten-Selektin
Selektin-P	Platelet-Selektin
sICAM	soluble Intercellular Cell Adhesion Molecule
sVCAM	soluble Vascular Cell Adhesion Molecule
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VLA-4	Very Late Antigen-4

## 2. Einleitung

### 2.1 Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen sind immer noch mit Abstand die häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt (ROSS ET AL. 1993).

Für die Entstehung der Atherosklerose wurde bereits von Rudolf Virchow eine Verletzung des Endothels postuliert (Virchow R. A more precise account of fatty metamorphosis. 1858; Lecture XVI, 383-408), welcher bis heute, nach Integration mehrerer Modelle, eine entscheidende Rolle zugesagt wird. Eine Kaskade humoraler und zellulärer Faktoren führt zu einem Entzündungsprozess der Gefäßwand (LANGHEINRICH UND BOHLE. 2005), der in drei Phasen unterteilt werden kann: 1. eine frühe Phase der Endothel- und Thrombozytenaktivierung sowie Monozytenrekrutierung, 2. eine intermediäre Phase der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und 3. eine chronische/späte Phase mit Deposition extrazellulärer Matrix in die Gefäßwand.

Ein Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren wie bFGF, PDGF, IGF-1, TGF- $\beta$ , chemotaktisch wirksamer Zytokine, regulären Gefäßwandzellen sowie Monozyten/Makrophagen vermittelt dabei die proliferative Antwort eines Gefäßes und unterhält den Entzündungsprozess. Der Verlust der endothelialen Integrität ( endotheliale Dysfunktion ) führt zu einer Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in die sich bildende Neointima mit begleitender Synthetisierung extrazellulärer Matrix.

Durch die endotheliale Dysfunktion werden Ereignisse, die das Entstehen und Fortschreiten der Atherosklerose fördern, initiiert - hierzu zählen die Permeabilitätszunahme des Endothels für Lipoproteine, die gesteigerte Thrombozytenaggregation, Rekrutierung von Leukozyten und die Bildung von Zytokinen wie TNF  $\alpha$ , IL-1 oder IFN- $\gamma$ .

Das dysfunktionelle Endothel produziert vasokonstriktorische Substanzen wie Endothelin und Angiotensin II (AT II) (DREXLER ET AL. 1998). AT II wirkt nicht nur als Vasokonstriktor, sondern stimuliert auch die Produktion von Endothelin und wirkt als Pro-Oxidant (SOWERS ET AL. 2002). Endothelin und AT II fördern die Proliferation von glatten Muskelzellen und führen über diesen Weg zur Migration glatter Gefäßmuskelzellen in den wachsenden Plaque (DREXLER ET AL. 1998).

Als eines der initialen Zeichen der endothelialen Dysfunktion nimmt die NO-Bildung und die NO-Aktivität ab (STAMLER ET AL. 1993). Das Fehlen von NO fördert die oxidative Modifikation von LDL-Cholesterin, einem Prozess, der als ein wesentlicher Mechanismus in der Pathogenese der Atherosklerose angesehen wird (STEINBERG ET AL. 1989).

Oxidiertes LDL (oxLDL) wird in der Literatur als bedeutender pro-atherogener Faktor angesehen (STEINBERG ET AL. 2002), der den Vorgang der Rekrutierung von Monozyten initiiert (MINE ET AL. 2002). OxLDL führt zur Aktivierung von Endothelzellen, vermehrter Expression von Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche (ALLEN ET AL. 1998; JANG ET AL. 1994; POSTON ET AL. 1992; CYBULSKY ET AL. 1991) und zur Produktion von chemoattraktiven Substanzen (z.B. MCP-1), die für die Migration der Leukozyten bedeutend sind (VALENTE ET AL. 1992).

Die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen führt zur Adhäsion von Monozyten und T-Lymphozyten mit konsekutiver Migration von Entzündungszellen in den subintimalen Raum (ROSS ET AL. 1993; CYBULSKY ET AL. 1991; RICHARDSON ET AL. 1994). Dabei vermitteln Selektine zunächst den temporären Kontakt bestimmter Blutzellen, wie Monozyten und T-Lymphozyten, mit dem Endothel. Durch eine weitere Gruppe von Adhäsionsmolekülen, den „Cellular Adhesion Molecules“ (CAMs), kommt es zur festen Anheftung dieser Zellen an die Gefäßwand und zur Diapedese.

Im Rahmen ihres Differenzierungsprozesses setzen die lipidbeladenen Makrophagen und die eingewanderten T-Lymphozyten vermehrt proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha), Interleukine (IL), Wachstumsfaktoren und andere Mediatoren frei. Diese inflammatorische Umgebung aktiviert glatte Muskelzellen in der Gefäßwand. Sie wandern aus der Media in die entstehende intimale Läsion ein und teilen sich dort weiter. Endothelzellen und glatte Muskelzellen reagieren nicht nur auf Botenstoffe, sie sind auch in der Lage, diese zu bilden (PDGF, FGF, TGF- $\beta$ ) und halten damit zusammen mit den Makrophagen und den aktivierten T-Lymphozyten den inflammatorischen Prozess der Plaquentstehung durch Expression chemoattraktiver Moleküle und Adhäsionsmolekülen in Gang (SPRINGER ET AL. 1994; JANG ET AL. 1994; POSTON ET AL. 1992; VAN DER WAL ET AL. 1992).

Trotz wachsender Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese der Atherosklerose konnten bis zum heutigen Zeitpunkt keine effektiven Strategien zur Prävention oder Behandlung dieser Erkrankung erarbeitet werden. Grund hierfür ist die multifaktorielle Genese der Atherosklerose wobei eine Vielzahl endothel-toxischer Substanzen, physiologische Ereignisse oder genetische Prädispositionen zur Initiierung des Plaquewachstums führen.

## 2.2 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle sind Proteine, die auf der Basis struktureller Homologien verschiedenen Molekül-Familien zugeordnet werden. Die an der Leukozyten-Migration beteiligten Moleküle gehören zu den a) Selektinen, den b) Integrinen und zu der c) Immunglobulin -Superfamilie.

a) Bisher sind drei Selektine bekannt: E-, P- und L- Selektin. E- und P-Selektin kommen auf dem Endothel von Blutgefäßen vor, P-Selektin zusätzlich auf Thrombozyten. L-Selektin wird von Leukozyten exprimiert. Die Selektine spielen eine große Rolle in der frühen Phase der Leukozyten-Emigration. Sie vermitteln den ersten Kontakt zwischen den Leukozyten und dem Gefäßendothel. Dies führt zu einem Phänomen, das als "Rolling" beschrieben wird, dem "Rollen" von Leukozyten entlang der inneren Wand der Blutgefäße.

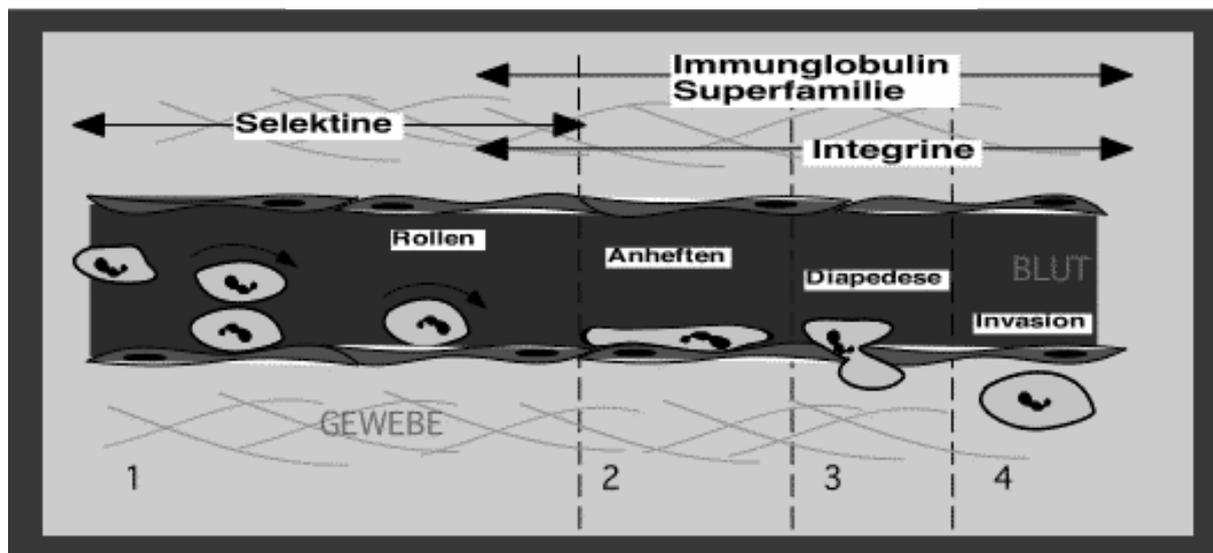
b) Integrine sind eine große Familie von Molekülen und werden in den verschiedensten Geweben exprimiert. Integrine bestehen aus zwei Untereinheiten (alpha und beta), die miteinander verbunden sind. Für die alpha und beta Untereinheiten gibt es wiederum verschiedene Subtypen (z.B. beta1, beta2 etc.). Auf Leukozyten kommen einige Integrine vor, die eine wichtige Rolle in dem Prozess der Leukozyten-Emigration spielen. Integrine vermitteln die feste Anheftung von Leukozyten an das Endothel der Gefäße. Diese wichtige Funktion der Integrine stellt die Voraussetzung für die Auswanderung der Leukozyten aus den Blutgefäßen dar.

c) Einige wichtige Adhäsionsmoleküle gehören zu der Immunglobulin-Superfamilie, die diesen Namen trägt, da die einzelnen Mitglieder strukturelle Ähnlichkeiten zu den Antikörper-Molekülen (Immunglobulinen) aufweisen. Zu dieser Familie gehören ICAM (Intercellular Cell Adhesion Molecule), VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule) und PECAM (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule). Alle drei Adhäsionsmoleküle werden vom Gefäßendothel exprimiert und binden an Integrine auf der Zelloberfläche von Leukozyten. PECAM findet sich auf dem Endothel der Gefäße ausschließlich dort, wo zwei benachbarte Endothelzellen aneinandergrenzen, den sog. interzellulären Verbindungen (engl. intercellular junctions). PECAM ist dabei vor allem am Vorgang der Diapedese (Hindurchtreten zwischen den Endothelzellen in den extravaskulären Raum) wesentlich beteiligt (JANG ET AL. 1994; DEJANA ET AL. 1994; CARLOS ET AL. 1994; STEWART ET AL. 1995). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Immunglobulin Superfamilie.

Haupt-Glycoprotein	Häufigstes Vorkommen	Bindungsrezeptor
ICAM-1	Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen, Hämatopoetische Zellen	LFA-1, MAC-1
ICAM-2	Wie ICAM-1	LFA-1
VCAM-1	Endothelzellen, glatte Muskelzellen	VLA-4
PECAM-1	Interzelluläre Junctionen der Endothelzellen, Thrombozyten	

**Tabelle 1.** Übersicht über die wichtigsten Vertreter der Immunglobulin Superfamilie, ihr jeweiliges Vorkommen und ihren korrespondierenden Bindungsrezeptor. (JANG ET AL. 1994).

In den 90-er Jahren wurde gezeigt, dass die Adhäsion von Monozyten an das Gefäßendothel durch eine Reihe von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Endothelzellen getriggert wird. Zu den involvierten Adhäsionsmolekülen zählen VCAM-1, ICAM-1, P-Selektin und E-Selektin (CYBULSKY ET AL. 1991). Die Expression von Adhäsionsmolekülen wird somit als Ursache für die Adhärenz von Monozyten und T-Lymphozyten an das Gefäßendothel angesehen, da die endothelial exprimierte Adhäsionsmoleküle den Kontakt zwischen Leukozyten und dem Gefäßendothel vermitteln. Die Migration von Leukozyten wird von löslichen Faktoren und von Adhäsionsmolekülen, die auf dem Endothel und auf der Zelloberfläche der Leukozyten exprimiert werden, bestimmt (DOSQUET ET AL. 1992; CYBULSKY ET AL. 1991; VAN DER WAL ET AL. 1992; POSTON ET AL. 1992; GERRITY ET AL. 1981) und hat für die inflammatorische Immunantwort eine essentielle Bedeutung (COLLINS ET AL. 2000).



**Zu 1:** Leukozyten werden von Selektinen, die sich auf dem aktivierten Endothel befinden, aus dem Blutstrom "gefangen" und rollen an der Blutgefäßwand entlang.

**Zu 2:** Sie binden dann über ihre Integrine an das Endothel und werden "flach", ein Zeichen der Aktivierung. Die Integrine haben die Immunglobulin Superfamilie Moleküle zum Bindungspartner (=Ligand).

**Zu 3:** Die Leukozyten reagieren auf chemotaktische Signale und wandern durch das Endothel hindurch. Sie benutzen hierfür Integrine und Moleküle der Immunglobulin Superfamilie.

**Zu 4:** Die Leukozyten wandern in das entzündete Gewebe ein.

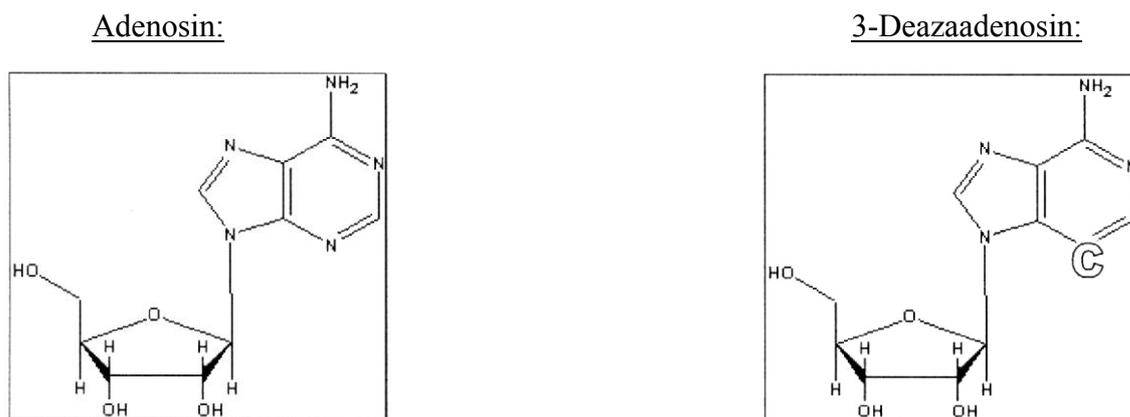
In einer Studie mit ICAM-1 defizienten Mäusen konnte eine kritische Rolle für Adhäsionsmoleküle in der Initiierung von atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden (COLLINS ET AL. 2000).

Adhäsionsmoleküle werden bei Entzündungsreaktionen und dem Vorliegen einer Immunantwort des Organismus durch die Freisetzung von Zytokinen wie Tumor Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$ , IL-1 oder Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) hoch reguliert. Faktoren wie Thrombin, TNF- $\alpha$ , IL-2, LPS und Lysophosphatidylcholin binden an den Scavenger-Rezeptor für LDL der Leukozyten und stimulieren auf diesem Wege die Expression von ICAM-1 und VCAM-1. Spezifische Aktivierungswege für ICAM-1 sind die Anwesenheit von Hypoxie, TNF- $\beta$ , sowie auch INF- $\gamma$ . Die Bildung von VCAM-1 wird hingegen durch z.B. IL-4 speziell stimuliert. Chronisch inflammatorische Erkrankungen wie auch die Atherosklerose, gehen mit Bildung der oben genannten Lymphokine und Mediatoren wie INF- $\gamma$  und IL-4 einher. Zudem wird während einer Hyperlipidämie vermehrt Lysophosphatidylcholin gebildet, das ebenso eine vermehrte Expression von Integrinen induziert.

Neben den an den Endothelzellen gebundenen Formen der Adhäsionsmoleküle liegen sie auch in freier Form im Serum als sVCAM-1 bzw. sICAM-1 vor und stellen in dieser Form wahrscheinlich erste Stadien der Atherosklerose dar (RIDKER ET AL. 1998). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass kardiovaskuläre Ereignisse in Zusammenhang mit den messbaren Konzentrationen der im Serum löslichen Adhäsionsmolekülen stehen, die als Marker für die Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle zu sehen sind (RIDKER ET AL. 1998; ROHDE ET AL. 1999.)

### 2.3 3-Deazaadenosin

3-Deazaadenosin ist ein Adenosinanalogen, das seinerseits aus der Base Adenin und dem Zucker  $\beta$ -D-Ribose besteht. Die Purin-Base Adenin ist n-glycosidisch an das C1 Atom der Pentose ( $\beta$ -D-Ribose) gebunden, das Stickstoffatom an Position 3 ist bei 3-Deazaadenosin im Vergleich zum Adenin durch ein Kohlenstoffatom ersetzt.



**Abbildung 2.** Im Unterschied zum Adenosin ist bei dem Adenosinanalogen 3-Deazaadenosin das Stickstoffatom der Base Adenin, das sich an Position 3 befindet, durch ein Kohlenstoffatom ersetzt.

3-Deazaadenosin ist ein Adenosinanalogen mit antiinflammatorischer und immunmodulatorischer Wirkung. Es hemmt die Chemotaxis von Makrophagen und Neutrophilen, sowie die über Lymphozyten vermittelte Zytolyse, die Phagozytose der Makrophagen und die Sekretion von Neutrophilen (AKSAMITT ET AL. 1982; 1983; NAGEH ET AL. 1997).

Desweiteren wurde ein hemmender Einfluss auf die Produktion von TNF- $\alpha$  in LPS stimulierten Zellen (JEONG ET AL. 1996) sowie auf die Produktion von PDGF und der Monozytenadhäsion in Endothelzellen beschrieben (SHANKAR ET AL. 1992).

In vitro Untersuchungen haben eine Reduktion der TNF- $\alpha$  induzierten Adhäsion neutrophiler Leukozyten an das Endothel bei gleichzeitiger Hemmung der ICAM-1 Expression gezeigt (JURGENSEN ET AL. 1990). Aufgrund dieser anti-inflammatorischen Wirkung wurde 3-Deazaadenosin in einer klinischen Studie bei Patienten mit rheumatoider Arthritis eingesetzt (SMITH ET AL. 1992) und zeigte hierbei eine kurzzeitige klinische Beschwerdebesserung.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass 3-Deazaadenosin den nukleären Faktor kappa B (NF $\kappa$ B) zu modulieren vermag (MU EN LEE ET AL. 1999), der für die Transkription einer Vielzahl von Proteinen zuständig ist, unter anderem für die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 (JEONG ET AL. 1999).

In vivo hemmt 3-Deazaadenosin über die S-Adenosyl-Homocystein Hydrolase (S-AdoHyc) die Bildung von Homocystein aus S-Adenosyl-Methionin. Die Hemmung der S-Adenosyl-Homocystein Hydrolase bewirkt einen intrazellulären Anstieg von S-Adenosyl-Homocystein und 3-Deazaadenosyl und damit verbunden eine kompetitive Hemmung des Adenosyl-Methionins in Transmethylierungsreaktionen (ZIMMERMANN ET AL. 1984; 1986). Diese Hemmung der zellulären Methylierung könnte ein zentraler Mechanismus sein, der für die antiinflammatorischen Eigenschaften des 3-Deazaadenosins verantwortlich ist (CANTONI ET AL. 1986; GARCIA-GASTRO ET AL. 1983).

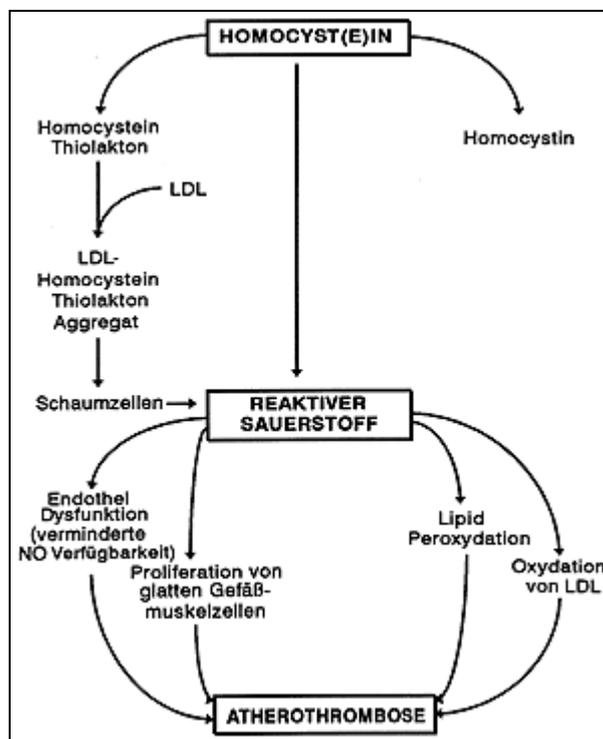
In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass 3-Deazaadenosin die Entstehung atherosklerotischer Frühläsionen sowie die endotheliale Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in der C57/BL- Maus hemmt (WALKER ET AL. 1999).

Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der anti-inflammatorischen und anti-atherogenen Wirkung von 3-Deazaadenosin sind jedoch bis heute nicht vollständig geklärt.

## **2.4 Homocystein**

Der Zusammenhang zwischen Homocystein und der Pathogenese der Atherosklerose wurde bereits vor 30 Jahren beschrieben. Die Hyperhomocysteinämie wird als unabhängiger Risikofaktor in der Pathogenese der Atherosklerose benannt (UELAND ET AL. 1989; WELCH ET AL. 1998), wobei die atherogenen Effekte mit der Konzentration von Homocystein im Plasma korrelieren (LENTZ ET AL. 1996). Eine durch Homocystein induzierte endotheliale Zellschädigung in vitro entsteht hauptsächlich durch die Bildung von Wasserstoffperoxid und anderen potenten reaktiven Sauerstoffverbindungen. Die dadurch vermittelte homocysteininduzierte Zellschädigung führt zu einer Exposition der Grundmatrix und glatten Muskelzellen, wodurch es wiederum zu einer Proliferation und Aktivitätssteigerung von Thrombozyten und Leukozyten kommt.

Auto-Oxidation von Homocystein induziert die Bildung von weiteren reaktiven zytotoxischen Sauerstoffverbindungen, einschließlich Superoxid-Anionradikale und Hydroxyl-Radikalen (LOSCALZO ET AL. 1996).



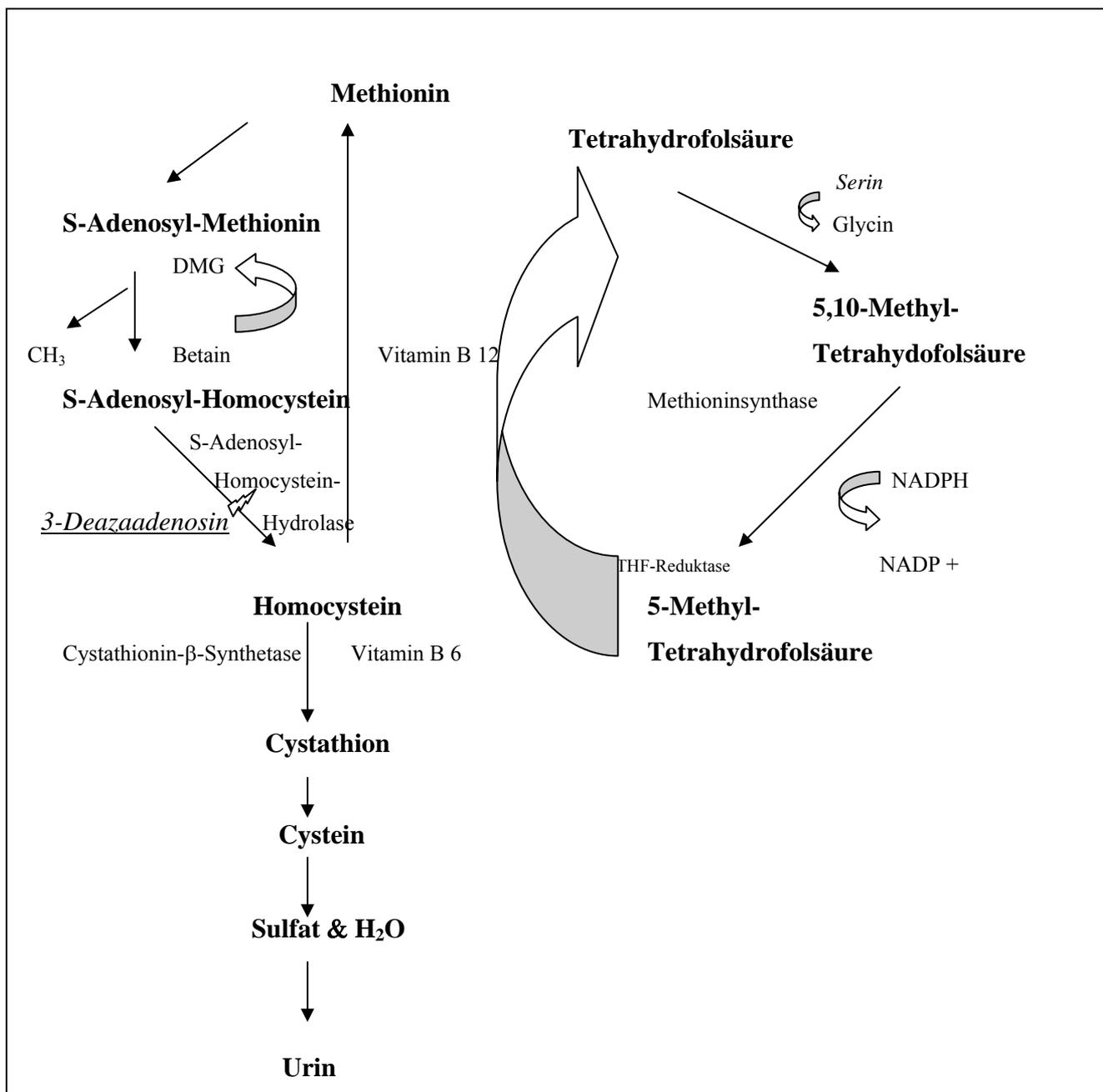
**Abbildung 3.** Die Hyperhomocysteinämie führt über eine oxidative Modifizierung von LDL unter Entstehung von LDL-Homocystein-Thiolakton zur Bildung von Schaumzellen. Dieser Vorgang führt zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale mit daraus resultierender endothelialer Dysfunktion. Neben diesen Effekten führt die Freisetzung von Sauerstoffradikalen zur Oxidation von LDL und fördert die Proliferation von glatten Muskelzellen, was zur Entstehung der Atherosklerose führt (WELCH ET AL. 1998).

Unter Homocystein kommt es zu endothelialen Funktionsstörungen (HAJJAR ET AL. 1993). Homocystein führt zu einer Veränderung des normalen antithrombotischen endothelialen Phänotyps durch Aktivitätssteigerung des Faktors XII und Faktors V (RODGERS ET AL. 1986) und Suppression der Protein-C-Aktivität (RODGERS ET AL. 1990; LENTZ ET AL. 1991). Darüber hinaus hemmt Homocystein die Expression von Thrombomodulin durch verminderte Gen-Transcription (LENTZ ET AL. 1991), induziert die Expression von Gewebefaktor und supprimiert die Expression von Heparansulfat durch das Endothelium (STAMLER ET AL. 1993). Die Produktion von endotheliale Stickoxid wird ebenfalls durch Homocystein negativ beeinflusst (WELCH ET AL. 1998). Homocystein erhöht dabei die Stickoxidproduktion in glatten Gefäßmuskelzellen durch Aktivierung des

Transkriptionsfaktors NF  $\kappa$ B (WELCH ET AL. 1998). Es wird vermutet, dass NF $\kappa$ B durch eine homocysteingenerierte reaktive Sauerstoffverbindung aktiviert wird. Die NF $\kappa$ B Aktivität ist dabei von essentieller Bedeutung für die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen. Frühere Studien konnten zeigen, dass normale Endothelzellen Homocystein durch Freisetzung von Stickoxid detoxifizieren, wobei Stickoxid in Anwesenheit von Sauerstoff eine Verbindung mit Homocystein eingeht und S-Nitroso-Homocystein bildet (STAMLER ET AL. 1993). Nitrosierung der Homocystein-Sulfhydrylgruppe führt zu einer Hemmung der sulfhydrylabhängigen Bildung von Wasserstoffperoxid.

Homocystein vermindert die Expression der zellulären Glutathionperoxidase in den Endothelzellen (UPCHURCH ET AL. 1995). Die Inhibierung der Glutathionperoxidase fördert die Lipid-Peroxidation durch reaktive Sauerstoffverbindungen, die während der Oxidation von Homocystein entstehen. Angereichert im Plasma wird Homocystein schnell auto-oxidiert und bildet verschiedene Disulfide und Homocystein-Thiolakton. Homocystein-Thiolakton reagiert mit Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL), indem es ihre drei freien Aminogruppen thioliert. Dieser Vorgang führt zu Aggregation und gesteigerter Aufnahme von oxidiertem LDL durch Makrophagen der Gefäßintima und unterstützt dadurch das Wachstum atheromatöser Plaques (Mc CULLY. 1993). Die Homocystein-induzierte Störung des Sauerstoffmetabolismus führt zu einer Überproduktion von Sauerstoffradikalen mit konsekutiver Schädigung der Intima, Aktivierung von Elastase und Erhöhung von Calcium-Ablagerungen.

Homocystein ist eine Aminosäure und entsteht bei der Transmethylierung von Methionin zu Cystein. Als Zwischenprodukt des Methionins wird S-Adenosyl-Methionin in der Leber durch die Betain-Homocystein-Methyltransferase remethyliert und es entsteht S-Adenosyl-Homocystein. Das entstandene S-Adenosyl-Homocystein wird durch die S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase in Homocystein umgewandelt. In vivo hemmt 3-Deazaadenosin die S-Adenosyl-Homocystein Hydrolase und somit die Bildung von Homocystein aus S-Adenosyl-Methionin. Abbildung 4 gibt einen Überblick über den Homocystein-Methionin und Folsäurezyklus und veranschaulicht den Wirkmechanismus von 3-Deazaadenosins.



**Abbildung 4.** Homocystein wird über die Remethylierung und Transsulfierung metabolisiert. Die Remethylierung kann auf zwei Wegen erfolgen: 1. In der Leber wird Homocystein durch die Betain-Homocystein-Methyltransferase remethyliert. Die Methylgruppe stammt von Betain, das durch die Abspaltung von Dimethylglycin bereitgestellt wird. 2. Die Remethylierung kann auch durch die Methioninsynthetase erfolgen. Hier stammt die Methylgruppe aus der 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure.

## 2.5 Tiermodell

Im etablierten experimentellen Atherosklerosemodell der apoE<sup>-/-</sup> Maus, sind neben intimalen Frühläsionen auch Übergänge in die Progressionsphase der Atherosklerose zu beobachten. Bereits nach wenigen Wochen zeigt dieses Tiermodell fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen. Diese fortgeschrittenen Läsionen sind der humanen Atherosklerose ähnlich.

Das Protein Apo E ist der wichtigste bekannte Ligand für die LDL-rezeptorgesteuerte Aufnahme von Chylomikronen, LDL, VLDL, IDL und anderen Serumlipiden aus dem Plasma in die Zelle (BROWN ET AL. 1986; GOLDSTEIN ET AL. 1987; MAHLEY ET AL. 1988; PLUMP ET AL. 1995) und spielt somit eine fundamentale Rolle in der Regulierung des Plasma-Cholesterin-Spiegels.

ApoE defiziente Mäuse entwickeln eine schwere Hypercholesterinämie v.a. durch Erhöhung der Partikel in der Größe der VLDL und LDL.

Die Entwicklung der Atherosklerose erfolgt geschlechtsunabhängig (PLUMP ET AL. 1995). ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln im Vergleich zu anderen Maus Modellen (z.B. C57/BL) in wesentlich kürzerer Zeit atherosklerotische Läsionen, die von Schaumzell-reichen „fatty streaks“ zu fibroproliferativen Plaques mit nekrotischen Anteilen fortschreiten und damit das typische Spektrum der Eigenschaften humaner Läsionen aufweisen (NAKASHIMA ET AL. 1994; REDDICK ET AL. 1994; QIAO ET AL. 1994).

Erstmals konnte so in einem Maus Modell die Bildung fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen mit proliferierenden glatten Muskelzellen, mit Anhäufung extrazellulärer Matrix (wie Kollagen und Elastin) und mit Bildung von fibrösen Kappen und Calcifizierungen nachgewiesen werden (NAKASHIMA ET AL. 1994; PLUMP ET AL. 1992; ZHANG ET AL. 1992).

ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln unabhängig von einer fettreichen Ernährung eine spontane schwere Hypercholesterinämie mit 5-fach erhöhten Cholesterinwerten im Vergleich zu Kontrollgruppen. Schon nach 5-6 Wochen sind Monozytenadhäsionen an den Endothelzellen und nach 6-10 Wochen „fatty streaks“ nachweisbar, die im weiteren Verlauf fibroproliferative Läsionen entwickeln, in denen oxidationsspezifische Epitope enthalten sind (PLUMP ET AL. 1999).

Die Anzahl und der Lipidgehalt der Läsionen lässt sich durch Ernährung der Mäuse mit cholesterinreicher Western-Diät noch erheblich steigern (PLUMP ET AL. 1992; ZHANG ET AL. 1992; PLUMP ET AL. 1995).

Für die Forschung stellt das apoE<sup>-/-</sup> Maus Modells einen wichtigen Meilenstein dar, da die entstehenden atherosklerotischen Läsionen sehr ähnliche morphologische Charakteristik wie die des humanen Organismus haben (DAVIES ET AL. 1988; NAKASHIMA ET AL. 1994; REDDICK ET AL. 1994; LICHTMAN ET AL. 1996).

## 2.6 Lymphozyten

In den letzten Jahren zeigte sich, dass Lymphozyten eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielen, da in humanen atherosklerotischen Läsionen sowohl T-Lymphozyten als auch Immunglobuline nachgewiesen werden konnten (HANSSON ET AL. 1991; ZHOU ET AL. 1996; PAULSSON ET AL. 2000; HANSSON 2001).

Einige Studien zeigen, dass T- Lymphozyten in atherosklerotischen Läsionen in aktiviertem Zustand vorliegen und die Gen-Expression benachbarter Zellen beeinflussen. So konnten CD4<sup>+</sup> Zellen gemeinsam mit CD25, einem Marker der T-Zell Aktivierung, in humanen atherosklerotischen Läsionen sowie in denen apoE<sup>-/-</sup> Mäuse nachgewiesen werden (ZHOU ET AL. 2001). Ebenso konnte in einer weiteren Studie Interferon  $\gamma$  in atherosklerotischen Läsionen bestimmt werden (HANSSON ET AL. 1989).

Deshalb wird angenommen, dass T- Lymphozyten eine aktive Rolle im Prozess der Pathogenese der Atherosklerose spielen, wobei die Bildung von Zytokinen eine Bedeutung haben könnte. Song und Mitarbeiter konnten eine 54%-ige Reduktion der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen bei LDL<sup>-/-</sup> und RAG-1<sup>-/-</sup> (recombinase- activating gene-1) Mäusen zeigen (SONG ET AL. 2001).

Im Gegensatz zu den bisher genannten Studien untersuchten Daugherty und Mitarbeiter die Abwesenheit von T-Lymphozyten auf das Ausmaß atherosklerotischer Läsionen im apoE<sup>-/-</sup> Maus Modell und konnten zeigen, dass die Abwesenheit keinen Einfluß auf das Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen hat (DAUGHERTY ET AL. 1997).

Die Beteiligung von B-Lymphozyten an der Pathogenese der Atherosklerose wurde aufgrund einer Studie vermutet, in der Immunglobuline und zirkulierende Antikörper gegen oxidiertes LDL in humanen und animalen atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden konnten (YLA-HERTTUALA ET AL. 1994).

In vivo konnte gezeigt werden, dass die Downregulation von T-Helfer Zellen zu einer Verminderung der atherosklerotischen Läsionen bei apoE<sup>-/-</sup> Mäusen führte (LAURAT ET AL. 2001) und Dimayuga und Mitarbeiter konnten eine B-Zell protektive Funktion in einem Rag-1 defizienten Maus Modell nachweisen (DIMAYUGA ET AL. 2002).

Im Gegensatz dazu wurde aus einer weiteren Studie mit apoE<sup>-/-</sup> und Rag-1 defizienten Mäusen geschlossen, dass T- und B-Lymphozyten eine untergeordnete Rolle in der Pathogenese athereosklerotischer Plaques spielen (DANSKY ET AL. 1997).

Obwohl die Beteiligung von T- und B-Lymphozyten an der Pathogenese atherosklerotischer Läsionen kontrovers diskutiert wird, impliziert die Mehrzahl der Studien jedoch eine protektive Wirkung der zellulären Immunität gegen Atherosklerose.

## **2.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Vor dem Hintergrund der immunmodulatorischen und anti-inflammatorischen Eigenschaften des 3-Deazaadenosins konnten im Tiermodell der C57BL/6 Mäusen ein anti-atherosklerotischer Effekt gezeigt werden. Hier gelang es, die Entstehung atherosklerotischer Frühläsionen sowie die Hypoplasie der Intima und Media an der ascendierenden Aorta vollständig zu unterdrücken (WALKER ET AL. 1999).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte von 3-Deazaadenosin in 2 unterschiedlichen Dosierungen von 3-Deazaadenosin im apoE<sup>-/-</sup> Maus Modell sowohl unter atherogenen als auch unter normalen Ernährung zu untersuchen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Tiere und Tierhaltung

6 Wochen alte Apo E Mäuse (Charles Rivers Wiga , Sulzfeld , Deutschland ) wurden über einen Zeitraum von 14 Wochen bei Raumtemperatur in natürlichem Tag–Nacht–Rhythmus gehalten.

#### 3.2 Pharmakologische Diät

##### 3.2.1. Standard-Diät

Die Standard-Diät ( Bezugsquelle: Firma Altromin, Lage, Deutschland ) beinhaltet laut EG-Richtlinien zur Haltung von Mäusen folgende Nährstoffe:

Rohprotein: 225 mg/kg

Rohfett: 5 g/kg

##### **Aminosäuren:**

Lysin: 12,6 g/kg

Methionin: 4,1 g/kg

Cystin: 2,2 g/kg

Threonin: 6 g/kg

Tryptophan: 1,5 g/kg

Arginin: 10 g/kg

Histidin: 4,2 g/kg

Isoleucin: 6,4 g/kg

Phenylalanin: 7,5 g/kg

Alanin: 3,9 g/kg

Asparaginsäure: 9,7 g/kg

Glutaminsäure: 24,4 g/kg

Glycin: 4,3 g/kg

Prolin: 12,6 g/kg

Serin: 5,9 g/kg

Tyrosin: 7 g/kg

Leucin: 12,8 g/kg

Valin: 4,7 g/kg

##### **Vitamine:**

Vitamin A: 2000 IE/kg

Vitamin D3: 500 IE/kg

Vitamin E: 20,6 mg/kg

Vitamin K3: 0,5 mg/kg

Vitamin B1: 20 mg/kg

Vitamin B2: 20,1 mg/kg

Vitamin B6: 15 mg/kg

Vitamin B12: 0,035 mg/kg

Vitamin C: 20 mg/kg

Nikotinsäure: 50 mg/kg

Folsäure: 2 mg/kg

Umsetzbare Energie: 3000 kcal/kg

### 3.2.2. Atherogene-Diät

Die atherogene Diät (Western Diät) hat hinsichtlich der Aminosäuren, Mineralstoffe und Vitamine die gleiche Zusammensetzung wie die Standard-Diät, lediglich die Rohnährstoffgehalte unterscheiden sich wie folgt:

Rohprotein:	15,4 g/kg
Rohfett:	10,8 g/kg
Cholesterin.	10 g/kg

Umsetzbare Energie: 3793,9 kcal/kg

### 3.2.3.3-Deazaadenosin

3-Deazaadenosin ( $C_{10}H_{13}O_4N_4$ , Molekulargewicht 266,25; Bezugsquelle: Southern Research Institut, USA ) wurde in einer Dosierung von 5mg bzw. 10mg pro Tag pro Maus über das Futter verabreicht. Jeden zweiten Tag wurde ein Futter- und Trinkwasserwechsel durchgeführt.

## 3.3. Einteilung der Gruppen

Weibliche und männliche Mäuse wurden zufällig in 3 Gruppen aufgeteilt.

Gruppe A (n=8):	Standard-Diät
Gruppe B (n=8):	Standard-Diät + 5mg 3-Deazaadenosin
Gruppe C (n=8):	Western-Diät + 10mg 3-Deazaadenosin

## 3.4. Bestimmung der Blutwerte

Zur Blutentnahme wurde die Schwanzvene jeder Maus mit einer Einmalkanüle punktiert und je 100µl venöses Blut entnommen.

Das durch Zentrifugation (bei 8000U/min) gewonnene Serum wurde zur Cholesterin-Bestimmung nach der CHOD-PAP-Methode verwendet.

Zur Bestimmung des Cholesterins erfolgt in einem ersten Reaktionsschritt die hydrolytische Spaltung der Cholesterinester zu freien Fettsäuren. Das Cholesterin wird in Anwesenheit von Sauerstoff durch die Cholesterinoxidase zu  $\Delta^4$ -Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgesetzt, welches mit 4-Aminophenazon und Phenol weiterreagiert. Im Rahmen dieser

Indikatorreaktion, die durch eine Peroxidase katalysiert wird, entstehen Wasser und ein roter Farbstoff, das 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon, dessen Konzentration photometrisch bestimmt wird. Alle an der Reaktion beteiligten Enzyme sind in der gebrauchsfertigen Lösung (Hitachi-Lösung, Fa Boehringer Mannheim, Deutschland) enthalten. 10 µl des Mäuseserums wurden mit 1000 µl Hitachi-Lösung bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von 546 nm die Extinktion der Probenlösung photometrisch gemessen. Die Cholesterinkonzentration in der Probe in der Einheit mg/dl wurde gemäß den Angaben der Herstellerfirma durch Multiplikation des Extinktionswertes mit dem Faktor 855 ermittelt.

Zur Bestimmung von LDL wurde wie folgt verfahren: LDL fällt nach Zugabe von Citratgepufferten Heparinlösungen am isoelektrischen Punkt (pH 5,12) aus. Durch Zentrifugieren erhält man einen Überstand mit VLDL und HDL. Aus diesen Lipoproteinen lässt sich wie zuvor beschrieben, der Cholesterinanteil photometrisch bestimmen. Die LDL-Konzentration erhält man, indem von dem Wert des Gesamtcholesterin den Wert für das Cholesterin im Überstand (aus VLDL und HDL) subtrahiert.

Der Nachweis der Triglyceride fand über die Glycerin-Konzentration statt, die sich aus der Spaltung der Triglyceride ergibt. Mittels verschiedener Enzyme wird aus Glycerin Pyruvat, welches mittels der Lactatdehydrogenase unter NADH-Verbrauch zu Lactat wird. Dieser Schritt wird bei 365 nm photometrisch gemessen.

Es wurde ebenfalls eine Bestimmung der zellulären Bestandteile des Blutes mit besonderem Augenmerk auf die Lymphozyten und ihrer Untergruppen durch ein Lymphozyten-FACS (Fluorescence associated cell sorting) durchgeführt.

Das Messprinzip beruht auf der Methode der hydrodynamischen Fokussierung, d.h. die mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff angefärbten Partikel werden kontinuierlich hintereinander an einer Lichtquelle vorbeigeführt. Durch Pressluft gelangen die in Suspension vereinzelt und gefärbt vorliegenden Partikel in eine Kapillare, aus der sie in die Probenkammer geschleust werden. Ein Hüllstrom aus entgastem Wasser erzeugt in dieser Kapillare mit dem Probenstrom eine laminare Strömung, mit der die Partikel zentriert und mit hoher Geschwindigkeit auf die Meßstelle zugeführt werden. Auf diese Weise wird jeder Partikel einzeln durch die optimale Fokussierungsebene des Objektivs geleitet.

Aufgrund der Fluoreszenzanregung des Farbstoffs emittiert jede Zelle ein Lichtsignal proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge, welches in einem Photomultiplier verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Die Empfindlichkeit des Photomultipliers ist abhängig von der angelegten Hochspannung.

Passiert ein Partikel die Meßpore, so steigt das Fluoreszenzlicht bis auf ein Maximum an und fällt anschließend auf das Gleichgewichtsniveau zurück, wobei das zugehörige Signal eine konstante Dauer hat. Die Durchflußrate (Partikel/Zeit) wird über die eingehenden Signale berechnet und digital angezeigt. Die so gewonnenen Daten werden in Form von Histogrammen visualisiert und abgespeichert.

### **3.5. Präparation und Explantation des Herzens und der Aorta**

Nach 14 Wochen Behandlungsphase und anschließender 12-stündiger Nahrungskarenz wurden die Mäuse durch die Inhalation von Trichlormethan getötet. Nach Eröffnung des Abdomens wurde zuerst die Leber explantiert, anschließend retroperitoneal die Aorta abdominalis bis hin zur Aorta ascendens freipräpariert. Als nächstes wurde das Herz aus dem Perikard gelöst und sofort in PBS-Lösung gründlich gespült. Der Apex cordis wurde abgetrennt und das Herz noch einmal mit PBS-Lösung gereinigt, wobei sämtliche Blutrückstände entfernt wurden.

Anschließend wurde das Präparat in tissue tek eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur histologischen Aufarbeitung wurden mit Hilfe eines Kryostaten  $6\mu\text{m}$  dicke Serienschnitte der Aorta ascendens bis zum Erreichen des kranialsten Anteils des Sinus aorticus angefertigt, auf beschichtete Objektträger gebracht und anschließend luftgetrocknet bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur immunhistochemischen Färbung gelagert. Nach Identifizierung des Sinus aorticus wurden die letzten kranialen 47 Schnitte zur immunhistochemischen Färbung ausgewählt, so dass  $280\mu\text{m}$  der ascendierenden Aorta in die Bewertung eingingen. Jeder 5. Schnitt wurde einer Hämalaun- und Scharlachfärbung zugeführt, ebenso jeder 5. einer immunhistochemischen Färbung mit ICAM-1 und VCAM-1. Die Schnitte wurden jeweils parallel unter Mitführung einer Negativkontrolle gefärbt.

### **3.6. Hämalaun- und Scharlachfärbung**

Für die Darstellung und die Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen in der Gefäßwand wurde eine Hämalaun- und Scharlachfärbung durchgeführt.

Nach dem Auftauen wurden die Schnitte nach einmaligem Eintauchen in aqua dest. für 2 min in 50% Ethylalkohol gespült. Es erfolgte die Färbung der Präparate für 20 min in Scharlachrotlösung. Anschließend wurden die Schnitte in 50%-igem Ethylalkohol und danach in destilliertem Wasser gespült. Es folgte die Gegenfärbung in Hämalaunlösung nach Mayer für 10 min, dann wurden die Präparate noch mal für 10 min in Leitungswasser gebläut.

Zum nachfolgenden Eindecken wurde auf 45°C erhitzte Glyceringelatine verwendet.

### **3.7. Planimetrie der Gefäßwanddicke und der atherosklerotischen Läsionen**

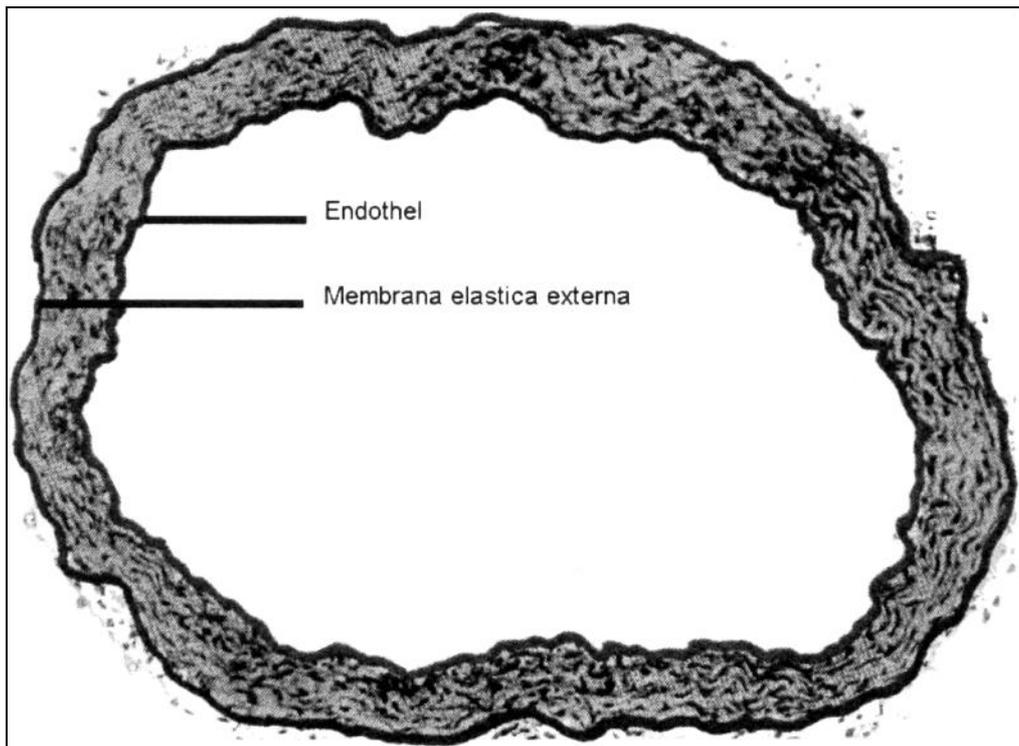
Zur Planimetrie wurde jeder fünfte Schnitt mit Hämalau- und Scharlach gefärbt. Atherosklerotische Läsionen wurden definiert als lokale Gefäßwandverdickungen mit lokaler Akkumulation von Fett, das durch Hämalau- und Scharlach Färbung rot gefärbten Bezirken im aortalen Endothel entspricht.

Die Anzahl der Läsionen wurde in jedem fünften Schnitt numerisch gezählt.

Die Dicke der Gefäßwand und das Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen innerhalb der Gefäßwand und des Lumens wurden anhand eines computergestützten Videosystems berechnet (Videokamera 3 CCD, Sony; 40x Originalvergrößerung; IBAS-2 mit IBAS Version 2.0 Standard, Kontron, München, Deutschland ).

Die durchschnittliche Gefäßwanddicke T wurde letztendlich in jedem Schnitt nach Messung der Länge des Endothels (P1) und der Länge der Membrana elastica externa (P2) anhand der Formel  $T = 1/(2 \pi) * (P2 - P1)$  berechnet.

Abbildung 5 zeigt einen typischen Querschnitt der ascendierenden Aorta mit planimetrisch markiertem Endothel und markierter Membrana elastica externa.



**Abbildung 5.** Querschnitt der ascendierenden Aorta mit planimetrisch markiertem Endothel und Membrana elastica externa. Originalvergrößerung 40x. (Dissertationsschrift A. C. Langheinrich, 1999)

### 3.8. Planimetrie der Intima- und Mediafläche

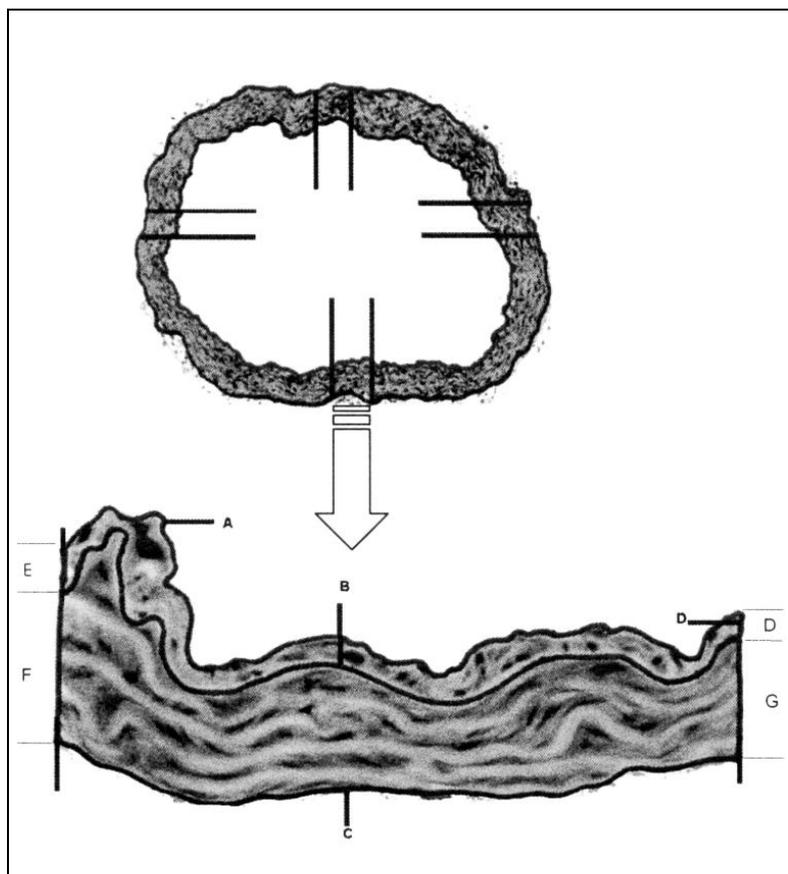
Zur Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen wurde die Fläche der Tunica intima (endotheliale Oberfläche) und der Tunica media bestimmt. Diese Bestimmung wurde in 400-facher Vergrößerung an fünf Serienschnitten kranial der Aortenklappe in jeweils definierten Quadranten (0°, 90°, 180°, 270°) in einem definierten Fenster von 63x63 µm vorgenommen. In jedem der Quadranten wurde zunächst die Länge des Endothels (A), der Membrana elastica interna (B) und der Membrana elastica externa (C) planimetrisch bestimmt. Die Neointimafläche wurde begrenzt vom Endothel und der Membrana elastica interna, die Mediafläche von der Membrana elastica interna und Membrana elastica externa. Zur Flächenbestimmung wurden zusätzlich die Senkrechten ( Strecken D-G ) der Tunica intima ( Neointima ) und der Tunica media gemessen. Diese Senkrechten wurden durch den definierten Gesichtsfeldausschnitt im Bild bestimmt.

Die anschließende Flächenbestimmung erfolgte für die Tunica intima ( Neointima ) anhand der Formel  $((A+B)/2)*((E+D)/2)$ , analog dazu die der Tunica media nach der Formel  $((B+C)/2)*((F+G)/2)$ .

Das Verhältnis von Neointima und Media wurde für jedes Tier berechnet.

Die Anzahl der atherosklerotischen Läsionen wurde in allen fünf Serienschritten bestimmt, ihre Anzahl addiert, sowie die durch sie bedeckte Endothelfläche planimetrisch bestimmt und ins Verhältnis zum Endothelumfang gesetzt und in Prozent ausgedrückt.

Abbildung 6 veranschaulicht den oben beschriebenen Vorgang der planimetrischen Bestimmung der atherosklerotischen Läsionen sowie der Intima- und Mediafläche.



**Abbildung 6.** Darstellung der definierten Quadranten zur Planimetrie. Linie A markiert das Endothel, Linie B zeigt die Membrana elastica interna, Linie C entspricht der Membrana elastica externa. Die Linien D und E stellen die Senkrechte zwischen dem Endothel und der Tunica Intima dar, korrespondierend dazu markieren die Linien F und G die Senkrechte zwischen Membrana elastica interna und externa. Originalvergrößerung 40x und 400x. (Langheinrich. 1999).

### 3.9. Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie lassen sich in Geweben und in Zellen eine Vielzahl von Zielstrukturen (sog. Antigene) spezifisch nachweisen. Dies geschieht mit spezifischen Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoff, Enzymen, partikulärem Material (z.B. Goldpartikel) oder mit radioaktiven Isotopen markiert sind.

Durch Kombination mehrerer Verfahren lassen sich auch durch Doppelmarkierungen mehrere Antigene auf / in der gleichen Zelle mit verschiedenen Farben realisieren.

Substanzen, die im Organismus eine Immunreaktion hervorrufen können, werden als Antigene bezeichnet ( Proteine, Oligopeptide, Polysaccharide, Lipide ), ihre Gegenspieler als Antikörper.

Immunglobuline, zu deren Gruppe auch die Antikörper gehören, werden im Rahmen der humoralen Immunantwort von aktivierten B-Lymphozyten ( Plasmazellen ) als spezifische Immunreaktion auf antigene Stimuli gebildet.

Sie werden hinsichtlich ihrer Größe, ihres Gewichts, ihrer Struktur und Funktion in 5 Klassen eingeteilt: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE ( geordnet nach abnehmender Quantität im Plasma ).

Antikörperlösungen, die bei immunhistochemischen Färbungen eingesetzt werden, enthalten vorwiegend Antikörper vom Typ IgG.

Polyklonale Antikörper sind natürliche Gemische der Antikörper, die im Zuge der Immunreaktion gegen die verschiedenen Determinanten der Antigene von den jeweiligen B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen gebildet werden. Zur Immunisierung sollte daher ein Antigen in möglichst reiner Form vorliegen. Das am häufigsten zur Produktion polyklonaler Antikörper genutzte Tier ist das Kaninchen. Geeignete Sera lassen sich aber auch von Ziege, Schaf, Pferd, Schwein oder Meerschweinchen gewinnen. Jedes Tier besitzt allerdings eine Reihe spontan entstandener Antikörper, die Störfaktoren bei den immunologischen Reaktionen darstellen können.

Der Nachteil der polyklonalen Antikörper besteht hauptsächlich in ihrem breiten Reaktionsspektrum, welches zu Kreuzreaktionen führen kann ( d.h. Bindung der Antikörper an verschiedene Antigene, die das gleiche oder ähnliche strukturelle Epitope haben ).

Aus diesem Grund werden für immunhistochemische Färbereaktionen bevorzugt monoklonale Antikörper verwendet, die als Vorteile die Möglichkeit eines praktisch unbegrenzten Nachschubs, eine hohe Standardisierung und eine hohe sowie strenge Spezifität aufweisen.

Der Sichtbarmachung von gewebsgebundenen Antigen-Antikörper-Komplexen dienen verschiedene Markersubstanzen. Als Enzym findet hier z.B. die alkalische Phosphatase Anwendung. Hierbei wird ein farbloses Chromogen in ein farbiges Enzymprodukt umgewandelt.

Enzyme können die 10.000 – 1000.000 fache Menge an Substanz pro Minute umsetzen, so dass die Methode eine hohe Empfindlichkeit erreicht.

Während des Färbeverfahrens bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Anschließend wird ein zweiter, enzymgekoppelter Antikörper, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörper ( hier jetzt als Antigen wirkend ) gerichtet ist, aufgetragen.

Es folgt die Substrat-Chromogenreaktion.

Das Verfahren ist flexibler als die direkte Methode ( enzymmarkierter Antikörper reagiert direkt mit dem gewebsantigen ), da eine Vielzahl von Primärantikörpern aus einer Spezies mit den gleich markierten Zweit-Antikörpern kombiniert werden können.

Die Methode ist ebenfalls um ein vielfaches empfindlicher, da mehrere Zweit-Antikörper (= mehr Enzymmoleküle) an einen Primärantikörper binden können, was in einer Signalverstärkung sichtbar wird.

Als unerwünschte Reaktion kann eine Kreuzreaktion der Zweit-Antikörper mit endogenen Immunglobulinen auftreten, die aber durch Vorinkubation mit vorabsorbierenden Antiseren ausgeschaltet werden kann.

Um die Empfindlichkeit der Methode weiter zu erhöhen, besteht die Möglichkeit, zusätzlich nach der Inkubation mit dem ersten enzymgebundenen Antikörper eine weitere Inkubation mit einem zweiten enzymgebundenen Antikörper durchzuführen, der seinerseits gegen den ersten gerichtet ist. Diese sog. Sekundär- und Tertiärantikörper sind jeweils mit den gleichen Enzymen gekoppelt.

Bei der von uns angewandten APAAP-Methode bestehen die Immunkomplexe aus alkalischer Phosphatase und anti-alkalischer Phosphatase. Je zwei Moleküle sind an einen Antikörper gebunden.

Enzym-Immunkomplex-Methoden gehören zu den empfindlichsten immunhistochemischen Techniken. Sie unterstützen die natürliche Affinität von Antikörpern gegenüber ihrem Antigen durch Einsatz stabiler Immunkomplexe anstelle der relativ unsanften chemischen Konjugation. Sie zeichnen sich durch bessere Sensitivität gegenüber den anderen Methoden hauptsächlich durch größere Anzahl an Enzymmolekülen, die pro Gewebsantigen zur Verfügung stehen, aus.

### **3.10. Immunhistochemische Färbungen**

Bei allen immunhistochemischen Färbungen wurde nach der gleichen Methode und in der gleichen Reihenfolge verfahren.

Färbeprotokoll:

1. Die Präparate wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend 10 min in 100% Aceton einer Fixation unterzogen.
2. Zum Nachweis der Spezifität wurde bei jeder Färbung eine Negativkontrolle durchgeführt.
3. Inkubation der Präparate mit Mäuseserum (Verdünnung 1:50 mit RPMI) für 20 min, anschließend einmalige Spülung mit Tris-Waschpuffer.
4. Inkubation der Präparate mit dem Primäantikörper (Verdünnung 1:100 mit RPMI) für 40 min, anschließend zweimalige Spülung mit Tris- Waschpuffer.  
(die Negativkontrolle wird mit RPMI mitgeführt).
5. Inkubation der Präparate mit dem Dualsystem-Verbindungsantikörper (Verdünnung 1:500 mit RPMI) für 20 min, anschließend zweimalige Spülung mit Tris-Waschpuffer.
6. Inkubation der Präparate mit dem Dualsystem-Brückenantikörper (Verdünnung 1:400 mit RPMI) für 20 min, anschließend zweimalige Spülung mit Tris-Waschpuffer.
7. Inkubation der Präparate mit dem Dualsystem-APAAP-Komplex (Verdünnung 1:50 mit RPMI) für 20 min, anschließend dreimalige Spülung mit Leitungswasser.
8. Färbereaktion des Dualsystem-APAAP-Komplexes in Neufuchsin-Entwicklerlösung über 25 min unter ständiger Bewegung der Flüssigkeit, anschließend einmalige Spülung mit Leitungswasser.
9. Gegenfärbung der Präparate in Hämalaun für 10 sek., anschließend dreimalige Spülung mit Leitungswasser über insgesamt 10 min.
10. Nach Trocknen der Präparate mit Zellstoff folgt deren Eindeckung auf 45°C erwärmter Glyceringelatine.

Die Quantifizierung der Färbintensitäten wurde anhand einer Skala von 1-4 ausgewertet:

Intensität 1: keine Färbung

Intensität 2: leichte Färbung

Intensität 3: mittlere Färbung

Intensität 4: starke Färbung

### **3.11. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der gesammelten Daten wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgenommen.

Alle Ergebnisse sind Angaben in Mittelwert und SD (Standardabweichung). Die Ergebnisse wurden analysiert durch 2-fache Varianzanalyse für unabhängige Stichproben mit wiederholten Messungen und 1-facher Varianzanalyse mit Anschlussstest nach Scheffé.

Unterschiede in der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 wurden analysiert durch 1-fache Varianzanalyse.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Körpergewicht

Das Körpergewicht der Tiere wurde zu Beginn der Versuche und nach Tötung der Tiere nach einer Versuchsdauer von 14 Wochen bestimmt.

Zu Versuchsbeginn bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Gewichts zwischen den drei Gruppen (Gruppe A:  $22,23 \pm 1,4$ ; B:  $20,78 \pm 1,6$ ; C:  $23,01 \pm 0,8$ ).

Im Verlauf des Versuchszeitraumes zeigten die Tiere der verschiedenen Gruppen eine unterschiedliche Gewichtsentwicklung, so dass zu Versuchsende das durchschnittliche Körpergewicht in Gruppe C um 18% höher lag als im Vergleich zum durchschnittlichen Gewicht in Gruppe A (Kontrollgruppe ohne 3-Deazaadenosin) [Tabelle 2].

Betrachtet man die Differenz des Körpergewichts von Versuchsbeginn bis zu Versuchsende in den jeweiligen Gruppen, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied mit  $p < 0,001$  zwischen den Gruppen A ( $5,35 \pm 1,96$ ) und C ( $9,49 \pm 2,27$ ).

	Gewicht (g) Tag 0	Gewicht (g) Tag 98
<b>Gruppe A</b> (Standard-Diät)	$22,23 \pm 1,4$	$27,58 \pm 1,8$
<b>Gruppe B</b> (Standard-Diät + 5mg)	$20,78 \pm 1,6$	$26,92 \pm 2,0$
<b>Gruppe C</b> (Western-Diät + 10mg)	$23,01 \pm 0,8$	$32,50 \pm 2,7$

**Tabelle 2.** Die Gewichtsentwicklung der apoE<sup>-/-</sup> Mäuse verläuft während des Versuchszeitraumes in allen drei Gruppen gleich und zeigt nach 14 Wochen keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Alle Angaben sind Mittelwerte und SD.

### 4.2 Blutwerte

Die Tiere der Gruppe C (Western-Diät + 10mg) zeigten bei Versuchsende im Vergleich zur Kontrollgruppe A (Standard-Diät) erhöhte Serumwerte an Cholesterin, Triglyceriden und LDL.

So war das Cholesterin bei Tieren der Gruppe C um das 2,6-fache, das LDL um das 2,1-fache und die Triglyceride ebenfalls um das 2,1-fache höher als in der Kontrollgruppe A. Ebenso

wiesen Tiere der Gruppe B (Standard-Diät + 5mg) 2,7-fach höhere Triglyceridwerte als Tiere der Gruppe A auf [Tabelle 3].

---

	<b>Cholesterin (mg/dl)</b>	<b>LDL (mg/dl)</b>	<b>Triglyceride(mg/dl)</b>
<b>Gruppe A</b> (Standard-Diät)	407,40 ± 99,66	260,80 ± 99,89	61,80 ± 33,73
<b>Gruppe B</b> (Standard-Diät + 5mg)	334,60 ± 32,32	238,00 ± 43,26	166,20 ± 29,41
<b>Gruppe C</b> (Western-Diät + 10mg)	1070,60 ± 106,64	560,40 ± 83,93	128,00 ± 28,66

---

**Tabelle 3.** Überblick über die Blutfettwerte in den verschiedenen Gruppen. Deutlich erkennbar sind signifikant erhöhte Werte in der Gruppe C ( $p < 0,01$ ). Alle Angaben sind Mittelwerte und SD.

---

Die Anzahl der Leukozyten/Lymphozyten zeigt in den verschiedenen Gruppen einen unterschiedlichen Verlauf. Gruppe C wies im Vergleich deutlich verminderte Werte auf.

	<b>Gruppe A</b> (Standard-Diät)	<b>Gruppe B</b> (Standard-D.+5mg)	<b>Gruppe C</b> (Western-D+10mg)
<b>Leukozyten</b>	5660.00 ± 1529.05	6280.00 ± 2413.92	3850.00 ± 1132.48
<b>Lymphozyten</b>	4260.00 ± 1158.88	4840.00 ± 2093.56	2825.00 ± 816.62
<b>B-Lymphozyten</b>	3145.40 ± 971.16	3512.20 ± 1598.88	1745.00 ± 451.03
<b>T-Lymphozyten</b>	1374.60 ± 306.80	1327.80 ± 499.02	1080.00 ± 456.29

**Tabelle 4.** Leuko-/Lymphozytenwerte in den Gruppen A-C. Eine signifikante Reduktion der Leukozyten/Lymphozyten finden sich in Gruppe C ( $p < 0,01$ ). Alle Angaben sind Mittelwerte und SD.

### 4.3 Quantifizierung atherosklerotischer Läsionen

Die Planimetrie wurde an Serienschritten der Aorta bis 280µm distal der Aortenklappe nach vorangegangener Hämalan- und Scharlachfärbung wie in 3.6 beschrieben durchgeführt.

Anhand dieser computergestützten Aufnahmen wurde die Plaqueentwicklung und das Plaqueausmaß nach 14 Wochen beurteilt, ebenso wurde mit dem gleichen Verfahren die Flächenzunahme von Intima und Media bestimmt.

Hinsichtlich der Anzahl der in 14 Wochen entstandenen Plaques zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zwischen den Tieren der Kontrollgruppe A und der Gruppen B und C. Die Anzahl der Plaques pro Serienschritt in Gruppe A betrug pro Tier  $4,50 \pm 1,05$ , unter 3-Deazaadenosin in der Gruppe B  $2,25 \pm 0,46^*$  und in der Gruppe C  $2,13 \pm 0,64^*$  (\*  $p < 0,0001$ ).

Die von Plaques bedeckte Oberfläche betrug in Gruppe A 36,4% des Endothels, das entspricht einer Fläche von  $467,17 \mu\text{m}^2 \pm 153,63$  in Gruppe A. Vergleichsweise geringer war die von Plaques bedeckte Fläche in den Gruppen, die mit 3-Deazaadenosin behandelt wurden. Hier betrug sie  $188,25 \mu\text{m}^2 \pm 56,31$  (Gruppe B) und  $192,5 \mu\text{m}^2 \pm 29,94$  (Gruppe C) bzw. 15,5% und 16,4% der Endothelfläche.

	<b>Gruppe A</b> (Standard-Diät)	<b>Gruppe B</b> (Standard-Diät+5mg)	<b>Gruppe C</b> (Western-Diät+10mg)
<b>Endotheliale Oberfläche (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	1242,33 $\pm$ 94,67	1216,50 $\pm$ 93,87	1216,25 $\pm$ 66,45
<b>Bedeckte Endothelfläche (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	467,17 $\pm$ 153,63	188,25 $\pm$ 56,31	198,25 $\pm$ 29,94
<b>%-Anteil der bedeckten Fläche</b>	36,43 $\pm$ 23,56	15,46 $\pm$ 4,39	16,35 $\pm$ 2,60

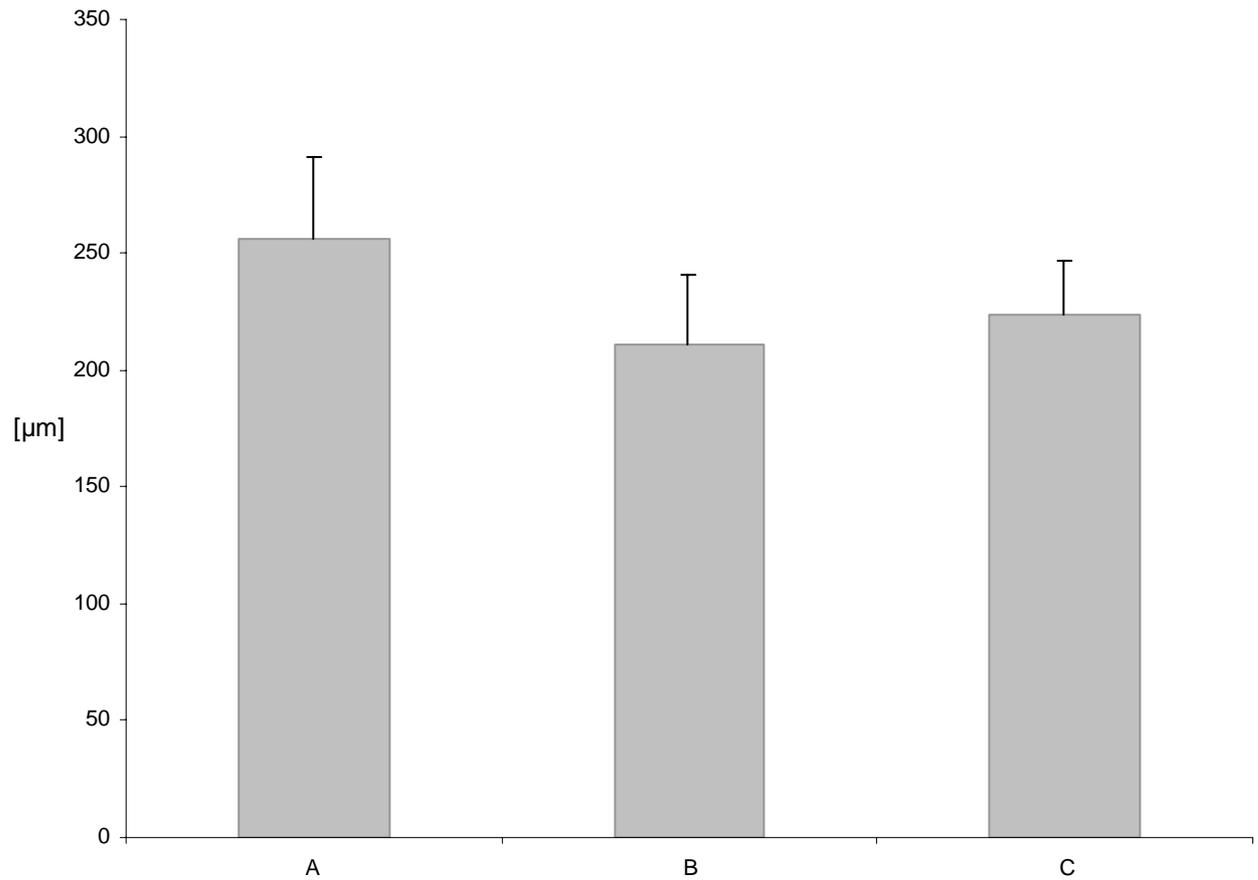
**Tabelle 5.** Unterschiede in den Gruppen der mit 3-Deazaadenosin behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe sind statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ). Die Angaben sind Mittelwerte und SD.

Unter der Behandlung mit 3-Deazaadenosin konnte eine deutliche Reduktion sowohl der Anzahl der Plaques als auch der durch die Plaques bedeckte Endothelfläche festgestellt werden.

Die Flächen der Tunica intima und die der Tunica media wurden wie in 3.7 planimetrisch bestimmt.

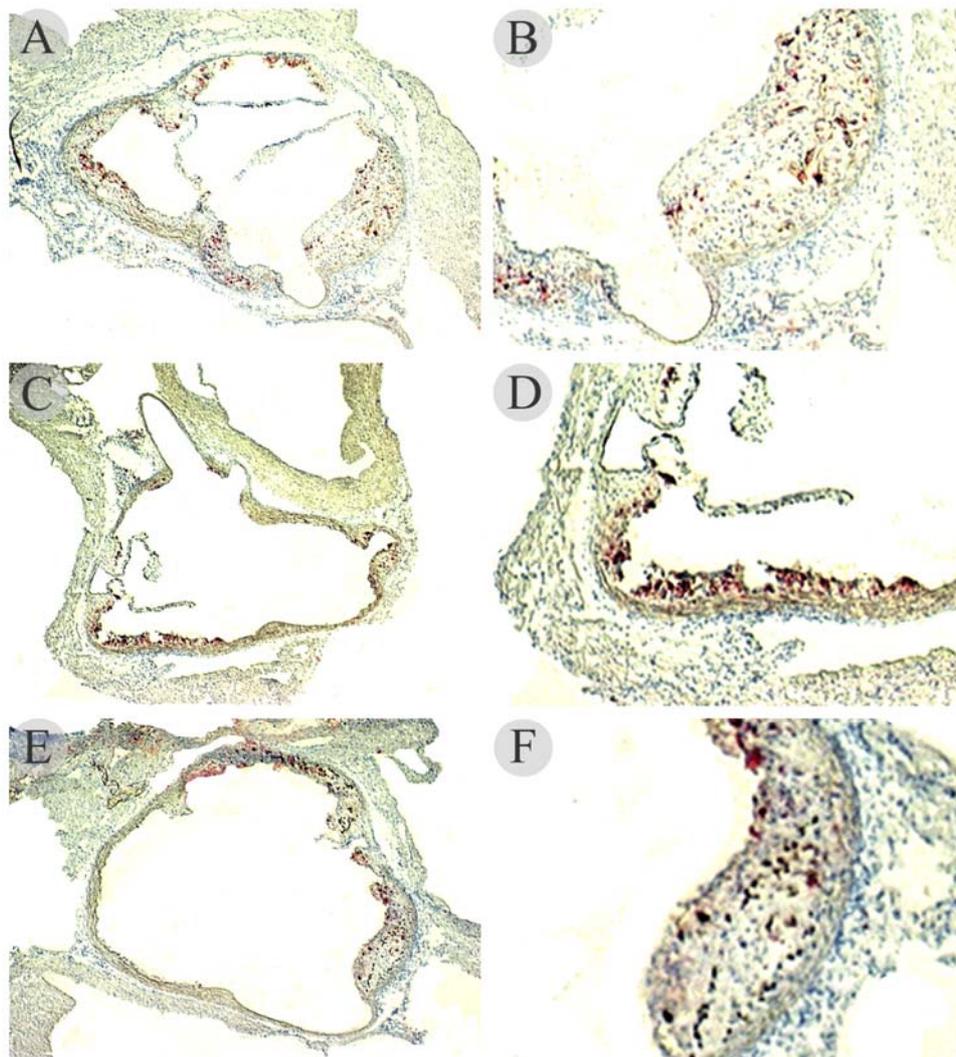
Es zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen hinsichtlich des Verhältnisses von Tunica intima zu Tunica media.

Dies zeigt, dass 3-Deazaadenosin die Zunahme der Gefäßwanddicke, die normalerweise als Folge des Wachstums der glatten Gefäßmuskelzellen in atherosklerotischen Läsionen beobachtet werden kann, in unserem Modell sowohl unter Standard-Diät als auch unter cholesterinreicher Western-Diät verhindern konnte.



**Abbildung 7.** Das durchschnittliche Tunica intima-media Verhältnis war in den mit 3-Deazaadenosin behandelten Gruppen deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe A ( $p < 0,01$ ). Alle Angaben sind Mittelwerte und SD.

---



**Abbildung 8.** Atherosklerotische Plaques der Gruppe A (A, B), Gruppe B (C,D) sowie der Gruppe C (E,F). Originalvergrößerung 40x (A,C,D) und 100x (B,D,F). Tiere ohne  $c^3Ado$  zeigten eine deutliche Zunahme atherosklerotischer Läsionen im Vergleich zu Tieren ohne  $c^3Ado$ .

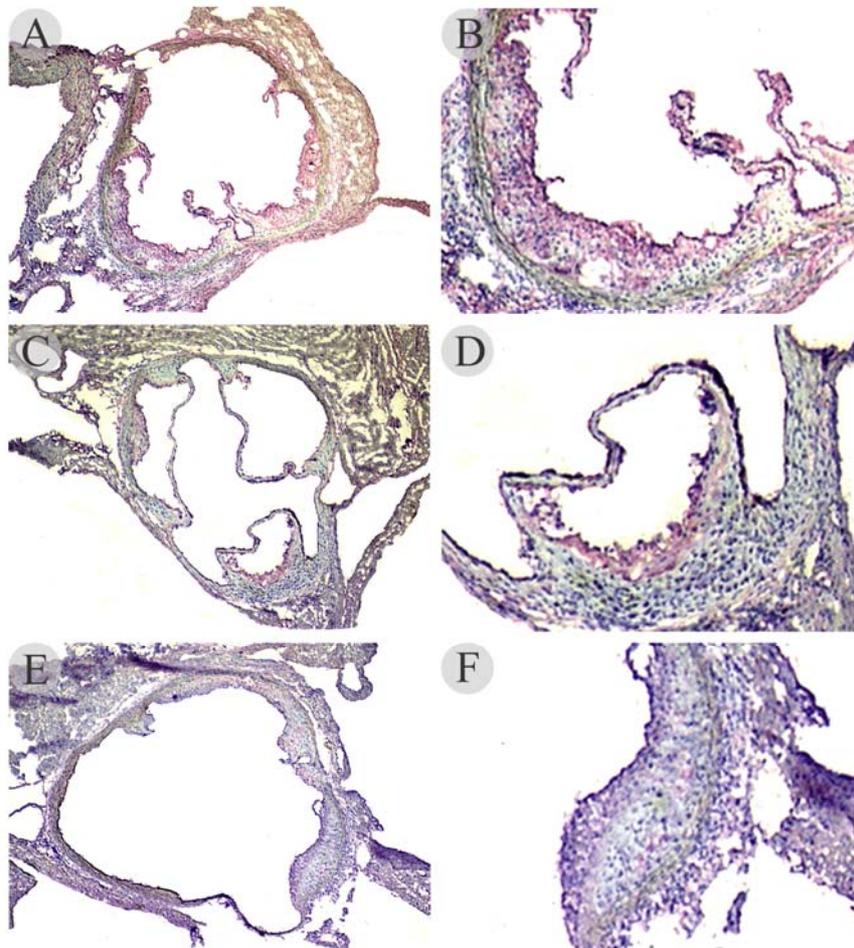
#### 4.4 Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1

In den mit 3- Deazaadenosin behandelten Gruppen B und C zeigte sich eine signifikant ( $p < 0,001$ ) verminderte Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 ( $2,69 \pm 0,23$  und  $3,00 \pm 0,45$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe A ( $3,52 \pm 0,51$ ).

Im Vergleich lagen in Gruppe B die Werte um 31% und in Gruppe C um 17% unter den Werten in Gruppe A.

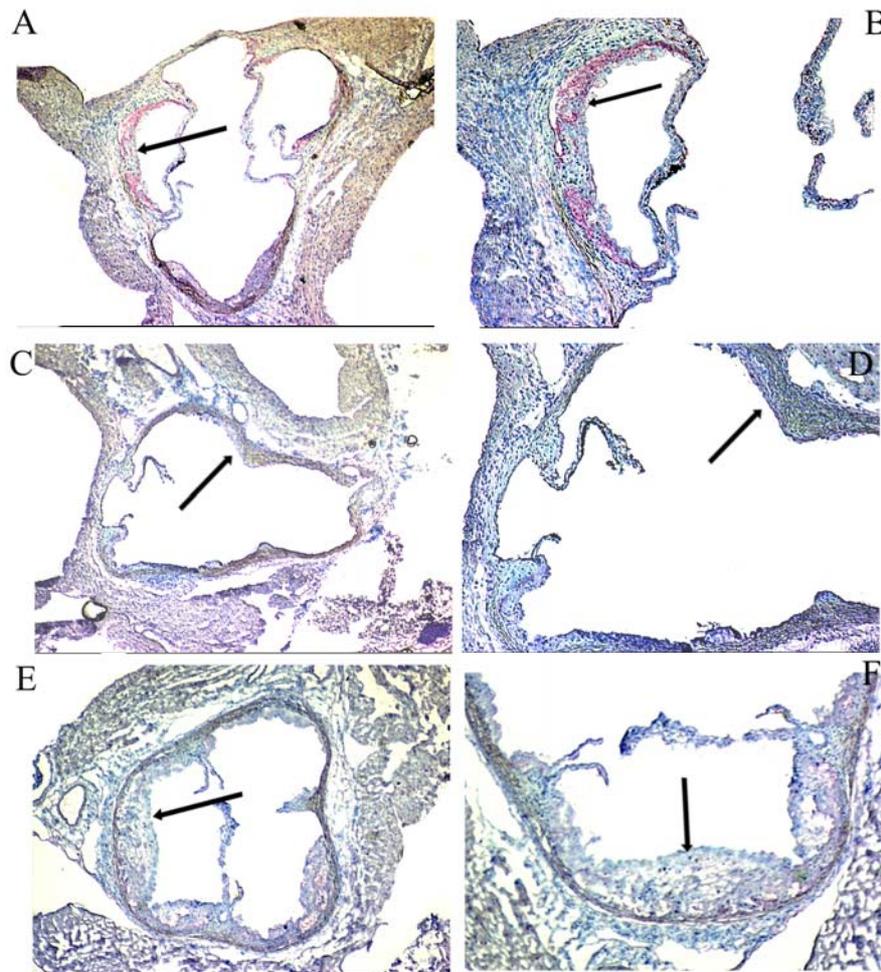
Ähnlich verhielt sich die nachweisbare Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1. In Gruppe A  $3,15 \pm 0,73$  im Vergleich zu  $2,65 \pm 0,23$  in Gruppe B und  $2,73 \pm 0,2$  in Gruppe C.

In Gruppe B und C zeigte sich somit eine signifikante Hemmung der endothelialen Expression von ICAM-1 von 19 %, bzw. 15% im Vergleich zur Kontrollgruppe A.



**Abbildung 9.** 3-Deazaadenosin vermindert die immunohistochemisch nachweisbare Expression von ICAM-1 am aortalen Endothel. Immunoreaktive Färbung bei Tieren unter Standard Diät (A und B), unter Standard Diät und 3-Deazaadenosin (C und D) und unter Western Diät und 3-Deazaadenosin (E und F). Originalvergrößerung 40x (A, C, E) und 100x (B, D, F).

---



**Abbildung 10.** 3-Deazaadenosin verhindert die immunhistochemische nachweisbare Expression von VCAM-1 am Endothel. Typische Färbung der Aorta bei Tieren unter Standard Diät (A und B), keine nachweisbare Färbung bei Tieren unter Standard Diät und 3-Deazaadenosin (C und D) und unter Western Diät und 3-Deazaadenosin (E und F). Originalvergrößerung 40x (A, C, E) und 100x (B, D, F).

## 5. Diskussion

Nach dem heutigen Verständnis der Pathogenese der Atherosklerose spielen akute und chronische Entzündungsprozesse der Gefäßwand eine entscheidende Rolle, die über eine Vielzahl bekannter und unbekannter Faktoren unterhalten wird. Eine Kaskade humoraler und zellulärer Faktoren führt zu einem Entzündungsprozess der Gefäßwand, die in drei Phasen unterteilt werden kann: 1. eine frühe Phase der Endothel- und Thrombozytenaktivierung sowie Monozytenrekrutierung, 2. eine intermediäre Phase der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und 3. eine chronische/späte Phase mit Deposition extrazellulärer Matrix in die Gefäßwand. Letztendlich münden alle Prozesse in den Verlust der endothelialen Integrität, die zu einer Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in die sich bildende Neointima mit begleitender Synthetisierung extrazellulärer Matrix führt.

Trotz intensiver Fortschritte in der Forschung und stetig wachsender Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese der Atherosklerose ist es bis jetzt noch nicht gelungen, wirksame und effektive Strategien zur Prävention und Behandlung dieser Erkrankung zu entwickeln.

3-Deazaadenosin ist ein Adenosinanalogen mit immunmodulatorischer und anti-inflammatorischer Wirkung, dessen Wirkung nicht über Adenosinrezeptoren vermittelt wird (NAGEH ET AL. 1997; AKSAMITT ET AL. 1982; GARCIA-GASTRO ET AL. 1983; MEDZIHRADESKY ET AL. 1984).

Es besitzt die Fähigkeit eine Vielzahl zellulärer Funktionen zu inhibieren, wozu die Neutrophilen- und Monozyten-Chemotaxis (CHIANG ET AL. 1979; AKSAMITT ET AL. 1982, 1983; ZIMMERMANN ET AL. 1979) und die Monozytenphagozytose (LEONARD ET AL. 1978) zählen.

Durch verschiedene Studien ist die Substanz als Inhibitor zahlreicher Transmethylierungsreaktionen bekannt, die existentiell für drei Chemokin vermittelte Funktionen der Monozyten/Makrophagen sind: hierzu zählen 1. die Chemotaxis, 2. die stimulierte Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden und 3. die Superoxid-Produktion.

Ebenfalls inhibitorisch wirkt diese Substanz auf die Thrombin stimulierte Produktion von PDGF und die ELAM-1 vermittelte Adhäsion von Monozyten an humanen aortalen Endothelzellen (SHANKAR ET AL. 1992).

Des Weiteren konnte eine Wirkung auf die Produktion von TNF- $\alpha$  und Interleukin 1 $\beta$  in RAW 264.7 Zellen festgestellt werden (JEONG ET AL. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass 3-Deazaadenosin den nukleären Faktor  $\kappa$  B (NF $\kappa$ B) zu modulieren vermag (JEONG ET

AL. 1999). NF $\kappa$ B ist für die Transkription einer Vielzahl von Proteinen zuständig, u.a. für die Expression von ICAM-1 und VCAM-1. In vitro Untersuchungen haben eine Reduktion der TNF- $\alpha$  induzierten Adhäsion neutrophiler Leukozyten an das Endothel bei gleichzeitiger Hemmung der ICAM-1 Expression gezeigt (JURGENSEN ET AL. 1990; MEDZIHRADESKY ET AL. 1984; DOSQUET ET AL. 1992).

In Übereinstimmung mit der Literatur (NAKASHIMA ET AL. 1994) waren wir in der Lage, reproduzierbar atherosklerotische Plaques im apoE<sup>-/-</sup> Maus Modell zu induzieren, die nach einem Versuchszeitraum von 14 Wochen 36% der Endotheloberfläche der Aorta einnahmen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass 3-Deazaadenosin die Entstehung atherosklerotischer Läsionen reduziert und die Inzidenz der Plaques an der endothelialen Oberfläche senkt. Unter 3-Deazaadenosin konnten wir eine signifikante (p<0.001) Reduktion der atherosklerotischen Läsionen auf 15% (Standard-Diät ) bzw. 16% (atherogene Diät) im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten, bei der die Plaques 36% der Endotheloberfläche bedeckten.

Diese Ergebnisse werden durch vorangegangene Studien unterstützt, die sowohl bei C57BL/6J Mäusen als auch bei apoE<sup>-/-</sup> Mäusen eine anti-atherosklerotische Wirkung des 3-Deazaadenosins nachweisen konnten (WALKER ET AL. 1999; LANGHEINRICH ET AL. 2003).

Mit der vorliegenden Studie konnte zudem erstmals gezeigt werden, dass 3-Deazaadenosin auch bei nicht atherogener Ernährung eine deutliche Hemmung auf die Entstehung atherosklerotischer Läsionen zeigt.

Ebenso konnten wir in der vorliegenden Arbeit die Einflussnahme des Adenosinanalogs 3-Deazaadenosin auf die endotheliale Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 nachweisen.

In immunhistochemischen Färbungen konnte eine deutlich verminderte, für VCAM-1 signifikante (p<0.001), Reduktion der Expression der Adhäsionsmoleküle auf der endothelialen Oberfläche nachgewiesen werden. Ihre Präsenz auf der Endotheloberfläche ließ sich um 19% (Standard-Diät) bzw. 31% (Western-Diät) im Vergleich zur Kontrollgruppe senken.

Ergänzende Untersuchungen konnten zeigen, dass 3-Deazaadenosin die ICAM-1 und VCAM-1 mRNA Bildung nach laser-gestütztem Zellopicking hemmt. Untersucht wurden sowohl endotheliale als auch intimale Cellcluster. Analog konnte in einer Studie von Langheinrich et al. im apoE<sup>-/-</sup> Maus Modell gezeigt werden, dass 3-Deazaadenosin auch die mRNA-

Expression der Antigene für ICAM-1 und VCAM-1 signifikant ( $p < 0.001$  bzw.  $p < 0.01$ ) reduzieren kann (LANGHEINRICH ET AL. 2003). Diese Ergebnisse werden von anderen publizierten Studien gestützt, in denen ein Eingreifen des 3-Deazaadenosins in den regulativen Ablauf der Transkription vermutet wird, da hier verminderte mRNA-Spiegel nachweisbar waren (JEONG ET AL. 1996). Denkbar wäre die Hemmung der Expression über eine verminderte Transcription des NF $\kappa$ B, der u.a. die Aktivität der Gene für ICAM-1 und VCAM-1 reguliert. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die NF $\kappa$ B Transcription durch 3-Deazaadenosin inhibiert werden kann (JEONG ET AL. 1999).

Wie andere Arbeitsgruppen auch, beobachteten wir in unserer Studie, dass im Tiermodell der apoE<sup>-/-</sup> Maus unter cholesterinreicher Ernährung vermehrt atherosklerotische Läsionen entstehen, die mit einer erhöhten Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 einhergehen (POSTON ET AL. 1992; DAVIES ET AL. 1993; LI ET AL. 1993; QIAO ET AL. 1994; TRUSKEY ET AL. 1999).

In einer 1998 veröffentlichten Studie wurde nachgewiesen, dass ICAM-1 und VCAM-1 in atherosklerotischen Frühläsionen vermehrt vom Endothel exprimiert werden (NAKASHIMA ET AL. 1998). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen unserer Studie. Die Adhäsion von Monozyten an das Gefäßendothel stellt einen der ersten Schritte in der Pathogenese der atherosklerotischer Läsionen dar (GERRITY ET AL. 1981; ROSS ET AL. 1984; ROSS ET AL. 1986), der durch eine anschließende Migration der Monozyten in die Subintima und den daraus resultierenden ersten morphologisch nachweisbaren Veränderungen, den sogenannten „fatty streaks“, gekennzeichnet ist (CYBULSKY ET AL. 1991; ROSS ET AL. 1993; ENTMAN ET AL. 1993; RICHARDSON ET AL. 1994).

Durch die endotheliale Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, (CYBULSKY ET AL. 1991; LI ET AL. 1993), wird die Diapedese der Monozyten eingeleitet (CYBULSKY ET AL. 1991; VAN DER WAAL ET AL. 1992; POSTON ET AL. 1992; DAVIES ET AL. 1993; LI ET AL. 1993; QIAO ET AL. 1994).

Takahashi und Mitarbeiter konnten in einer Studie zeigen, dass die Interaktion zwischen Monozyten und dem Endothel im normalem Zustand von LFA-1 und ICAM-1, in einem mit IL-1 $\beta$  stimulierten Zustand von LFA-1, ICAM-1 und VCAM-1 vermittelt wird (TAKAHASHI ET AL. 1994).

VCAM-1 ist ein induzierbares Molekül, das nachgewiesenermaßen die endotheliale Adhäsion von Monozyten und T-Lymphozyten vermittelt und somit im Anfangsstadium der Atherosklerose eine bedeutende Rolle spielt (CYBULSKY ET AL. 1991; VAN DER WAL ET AL. 1992; DOSQUET ET AL. 1992; DAVIES ET AL. 1993; O'BRIEN ET AL. 1993).

Auch für ICAM-1 konnte in Studien eine erhöhte Immunoreaktivität auf der Oberfläche von atherosklerotischen Läsionen in arteriellen Gefäßen nachgewiesen werden (POSTON ET AL. 1992).

Manka et al. berichteten, dass die Expression für ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen, Makrophagen und Gefäßmuskelzellen gerade nach einer einsetzenden endothelialen Dysfunktion eine erhebliche Steigerung erfährt (MANKA ET AL. 1999).

In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 im neovaskularisierten Teil des Plaques zweimal höher ist als im Bereich des luminalen arteriellen Gefäßendothels und dass die Expression mit zunehmender Dichte an im Plaque befindlichen T-Lymphozyten ansteigt.

Des Weiteren zeigte sich, dass VCAM-1 in die Rekrutierung der Blutmonozyten an atherosklerotische Läsionen involviert ist (HUO ET AL. 2001; CYBULSKY ET AL. 2001). So stabilisiert VCAM-1 den Vorgang des „Rollings“ der Leukozyten und führt somit zu einer verlängerten Transitzeit der Monozyten am Endothel bei apoE<sup>-/-</sup> Mäusen (RAMOS ET AL. 1999).

Diese Erkenntnisse liefern zwar keinen konsekutiven Beweis für einen kausalen Zusammenhang zwischen der Expression von Adhäsionsmolekülen und der Entwicklung früher atherosklerotischer Läsionen, werden aber durch die Tatsache, dass sich eine verminderte endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen in vielen Studien als protektiv erwiesen hat (VAN DER WAAL ET AL. 1992; O'BRIEN ET AL. 1993), weiter unterstützt.

So konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz atherosklerotischer Läsionen bei Mäusen, die zuvor mit Antikörpern, sowohl mit monoklonalen gegen ICAM-1 (PATEL ET AL. 1998) als auch mit polyklonalem Immunglobulin, behandelt wurden (NICOLETTI ET AL. 1998), geringer war.

Auch in Studien, die mit der genetischen Variante der ICAM-1 Knockout-Maus arbeiteten konnte eine Reduktion der Inzidenz der Atherosklerose nachgewiesen werden (NAGEH ET AL. 1997; BOURDILLON ET AL. 2000).

Ebenso wiesen Collins et al in einer Studie bei apoE<sup>-/-</sup> Mäusen und ICAM-1 defizienten Mäusen eine signifikant verminderte Anzahl an atherosklerotischen Läsionen im Vergleich zu apo E<sup>-/-</sup>/ICAM-1<sup>+/+</sup> Mäusen nach (COLLINS ET AL. 2000).

Die Ergebnisse unserer Studie stehen im Einklang mit der Literatur und stützen die Hypothese, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 und der Entstehung atherosklerotischer Frühläsionen besteht.

Für die Entstehung atherosklerotischer Frühläsionen ist die Makrophagenchemotaxis und – phagozytose, die für die chemotaktischen Eigenschaften der Monozyten und Makrophagen verantwortlich ist, unerlässlich (GARCIA-GASTRO ET AL. 1983; SUNG ET AL. 1985; ZIMMERMANN ET AL. 1984)- ein Vorgang, der nachweislich von 3-Deazaadenosin in Zellkulturen gehemmt werden konnte (AKSAMITT ET AL. 1982; NAGEH ET AL. 1997).

Auch andere pro-atherogene Vorgänge, die in der Pathogenese der Atherosklerose eine bedeutende Rolle spielen, werden von 3-Deazaadenosin günstig beeinflusst. So inhibiert das Adenosinanalogon in vitro die Thromboplastinbildung, die thrombininduzierte Bildung von PDGF und die Expression von Interleukin-2 (MEDZIHRADESKY ET AL. 1984).

Homocystein ist als unabhängiger Risikofaktor der Atherosklerose in zahlreichen Studien identifiziert worden (UELAND ET AL. 1989; WELCH ET AL. 1998).

Die Tatsache, dass 3-Deazaadenosin das Enzym S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase, das die Umwandlung von S-Adenosyl-Homocystein zu Homocystein katalysiert, hemmt und als Inhibitor zahlreicher Transmethylierungsreaktionen bekannt ist, stellt einen weiteren Zusammenhang zwischen der Pathogenese der Atherosklerose und  $dc^3Ado$  dar.

In vorangegangenen Studien konnte sowohl bei C57BL/6 Mäusen als auch bei apoE<sup>-/-</sup> Mäusen unter vergleichbaren Bedingungen wie bei der vorliegenden Studie eine Erhöhung der Homocystein-Spiegel im Plasma unter cholesterinreicher Ernährung nachgewiesen werden, die unter der Behandlung mit 3-Deazaadenosin signifikant gesenkt werden konnte (WALKER ET AL. 1999; LANGHEINRICH ET AL. 2003).

Auch die Beteiligung von T- und B- Lymphozyten an der Pathogenese der Atherosklerose wird zunehmend in der Literatur diskutiert.

In der vorliegenden Studie fanden sich in Gruppe B (Standard Diät + 3-Deazaadenosin) gleichbleibende Lymphozytenwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe, während in der Gruppe mit cholesterinreicher Western Diät + 3-Deazaadenosin (Gruppe C) eine deutlich verminderte Anzahl an T- und B-Lymphozyten festgestellt wurde.

In Bezug auf den Nachweis atherosklerotischer Läsionen stellten wir fest, dass in Gruppe B bei konstanter Lymphozytenzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der atherosklerotischen Läsionen ebenfalls im Vergleich zur Kontrollgruppe bestand.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in Gruppe C gleichermaßen eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Reduktion der Lymphozytenzahl sowie auch eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Reduktion der atherosklerotischen Läsionen.

Diese widersprüchlichen Ergebnisse finden sich auch in der Literatur, in der die Beteiligung der Lymphozyten an der Pathogenese der Atherosklerose kontrovers diskutiert wird.

So beschrieben Laurat et al., dass eine Downregulation von T-Helfer Zellen zu einer Verminderung der atherosklerotischen Läsionen bei apoE<sup>-/-</sup> Mäusen führte (LAURAT ET AL. 2001). Diese Ergebnisse stimmen mit denen unserer Studie überein.

Des Weiteren zeigten einige Studien, dass sich T-Lymphozyten in atherosklerotischen Läsionen in aktivierten Zustand befinden und die Gen Expression in benachbarten Zellen beeinflussen. So konnten CD 4<sup>+</sup> Zellen gemeinsamen mit CD 25, einem Marker der T-Zell Aktivierung, in humanen atherosklerotischen Läsionen sowie in denen von apoE defizienter Mäuse nachgewiesen werden (ZHOU ET AL. 1996). Hansson et al wiesen Interferon  $\gamma$  in atherosklerotischen Läsionen nach, was ebenfalls für ein Vorliegen von aktivierten T-Zellen spricht (HANSSON ET AL. 1989). Deshalb wird angenommen, dass T-Lymphozyten eine aktive Rolle im Prozess der Entstehung von atherosklerotischen Läsionen spielen.

Im Gegensatz zu den bisher genannten Studien zeigten Daugherty und Mitarbeiter, dass die Abwesenheit von T-Lymphozyten keinen Einfluss auf das Ausmaß von atherosklerotischen Läsionen hat (DAUGHERTY ET AL. 1997). Auch aus einer Studie mit apoE<sup>-/-</sup> und RAG-1<sup>-/-</sup> Mäusen wurde geschlossen, dass T- und B-Lymphozyten eine untergeordnete Rolle bei der Pathogenese von atherosklerotischen Plaques spielen (DANSKY ET AL. 1997).

Weitere Arbeiten zeigen jedoch auch eine protektive Funktion der Lymphozyten. Dass die Immunisierung von B-Lymphozyten mit oxidiertem LDL vor der Bildung von atherosklerotischen Läsionen schützt, zeigten Palinski et al. Die Autoren berichten von einem LDL Rezeptor defizienten Kaninchenmodell, in dem durch Immunisierung der Kaninchen mit homologem, Malondialdehyd- modifiziertem LDL, ein Anstieg des Antikörpertiters gegen oxidiertes LDL mit einer Reduktion der atherosklerotischen Läsionen um 30% einhergeht (PALINSKI ET AL. 1995).

Jüngste Ergebnisse zeigen, dass die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen in vitro durch die Applikation von c3Ado dosisabhängig reduziert wird (Sedding DG, Langheinrich AC. Circ Res. In revision). Die Hemmung der Proliferation und Migration humaner glatter Gefäßmuskelzellen war begleitet von einer gesteigerten Expression der Zyklin- Kinase- Inhibitoren p21<sup>WAF1/Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup>, einer verminderten Expression der G1/S-Phase Zykline und einer Hypophosphorylierung des Retinoblastom- Genproduktes. Des weiteren 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.

Die Applikation von c3Ado führte über die Hemmung der SAH-Hydrolase zu einer verminderten Aktivität der Isoprenylcystein- Carboxyl- Methyltransferase. Dies hemmt den letzten Schritt der posttranslationalen Modifikationen der Ras-Proteine, die Carboxylmethylierung. 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 eines konstitutiv aktiven Ras- Mutanten konnte dabei die Effekte von c3Ado auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen aufgehoben werden.

Diese weiterführenden Arbeiten zum Wirkmechanismus von 3-Deazaadenosin unterstützen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten der anti-atherosklerotischen Eigenschaften von 3-Deazaadenosin.

## 6. Zusammenfassung

### 6.1 Deutsch

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die anti-atherogenen Effekte von 3-Deazaadenosin im Tiermodell bei apoE<sup>-/-</sup> Mäusen im Hinblick auf die Ausbildung atherosklerotischer Plaques und die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 unter Berücksichtigung verschiedener Ernährungsformen zu untersuchen.

Wir waren in der Lage, die anti-atherogene Effekte des 3-Deazaadenosins sowohl unter Standard-Ernährung als auch unter cholesterinreicher Western-Diät nachzuweisen.

In der Kontrollgruppe entwickelten apoE<sup>-/-</sup> Mäuse atherosklerotische Plaques, die die Endotheloberfläche zu 36% bedeckten.

Unter oraler Applikation von 3-Deazaadenosin konnten wir eine Reduktion atherosklerotischer Läsionen um 15% (Standard-Ernährung) bzw. 16% (Western-Diät) erreichen. Dies entspricht einer signifikanten Reduktion ( $p < 0,001$ ) der von Plaques bedeckten Endothelfläche.

Die Reduktion atherosklerotischer Läsionen ging mit einer Hemmung der endothelialen Expression der zellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 einher, deren Präsenz auf der Endotheloberfläche um 17% (Standard-Ernährung) bzw. 31% (Western-Diät) im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert war. Dies entspricht einer deutlichen, für VCAM-1 signifikanten ( $p < 0,001$ ) Reduktion der Expression dieser Adhäsionsmoleküle auf der endothelialen Oberfläche ( $2,69 \pm 0,23$  versus  $3,52 \pm 0,51$ ).

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass 3-Deazaadenosin in vivo zu einer Hemmung der endothelialen Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 geführt hat.

Ob die Hemmung der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen auf die verminderte Expression der Adhäsionsmoleküle alleine, oder aber auf synergistische Effekte immunmodulatorischer und antiinflammatorischer Prozesse zurückzuführen ist, muss in weiteren Studien untersucht werden.

## 6.2 English

Aim of the presented study was to investigate the anti-atherogenic effects of 3-deazaadenosin in an apoE<sup>-/-</sup> mouse model with regard to the growth of atherosclerotic lesions and the expression of cellular adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1.

Considering different diets, we established the anti-atherogenic effects of 3-deazaadenosin in standard-diet as well as in cholesterol enriched western-diet.

In the control group (standard-diet without 3-deazaadenosin), apoE<sup>-/-</sup> mice developed atherosclerotic lesions covering the endothelial surface in part of 36%. With oral application of 3-deazaadenosin we found a significant reduction ( $p < 0,001$ ) of atherosclerotic lesions of 15% (standard-diet) respective 16% in western-diet.

The expression of the endothelial adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 was reduced as well. The decrease of their endothelial surface covering was significant for VCAM-1 ( $p < 0,001$ ). We found a 17% reduction for standard-diet and a 31% for western-diet in comparison to the control group.

In conclusion, 3-deazaadenosin was leading to an inhibition of the expression of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in vivo.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Aksamitt RR, Falk W, Cantoni GL.** Inhibition of Chemotaxis by S-3-Deazaadenosylhomocysteine in a Mouse Macrophage Cell Line. *J Biol Chem.* 1982;257:621-625.
2. **Aksamitt RR, Backlund PS, Cantoni GL.** Chemotaxis and the Synthesis of Specific Proteins are inhibited by 3-Deazaadenosine and other Adenosine Analogs in a Mouse Macrophage Cell Line. *J Biol Chem.* 1983;258:20-23.
3. **Allen S, Khan S, Al-Mohanna F, Batten P, Yacoub M.** Native Low Density Lipoprotein-induced Calcium Transients Trigger VCAM-1 and E-Selectin Expression in Cultured Human Vascular Endothelial Cells. *J Clin Invest.* 1998;101:1064-1075.
4. **Bourdillon MC, Poston RN, Covacho C, Chignier E, Bricca G, McGregor JL.** ICAM-1 Deficiency Reduces Atherosclerotic Lesions in Double-Knockout Mice (Apo E<sup>(-/-)</sup> / ICAM-1<sup>(-/-)</sup>) Fed a Fat or a Chow Diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2630.
5. **Brown MS, Goldstein JL.** A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986;232:34-47.
6. **Cantoni GL.** Biological methylation and drug design. *Humana Press, Clifton, NJ.* 1986:227-238.
7. **Carlos TM, Harlan JM.** Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules. *Blood.* 1994;84:2068-2101.
8. **Chiang PK, Cantoni GL.** Perturbation of biochemical transmethylations by 3-deazaadenosin in vivo. *Biochem Pharmacol.* 1979;28:1897-1902.
9. **Collins RC, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL.** P-Selectin or Intercellular Adhesion Molecule (ICAM-1)-Deficiency Substantially Protects against Atherosclerosis in Apolipoprotein E-deficient Mice. *J Exp Med.* 2000;191:189-194.

10. **Cybulsky MI, Gimbrone MA.** Endothelial expression of a mononuclear leucocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991;251:788-791.
11. **Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos J-C, Conelly PW, Milstone DS.** A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001;107:1255-1262.
12. **Dansky HM, Charlton SA, Harper MM.** T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 4642-4646.
13. **Daugherty A, Pure E, Delfel-Butteiger D, Chen S, Leferivich J, Roselaar SE, Rader DJ.** The Effects of Total Lymphocyte Deficiency on the Extent of Atherosclerosis in Apolipoprotein E<sup>(-/-)</sup> Mice. *J Clin Invest*. 1997;100:1575-1580.
14. **Daugherty A.** Mouse Models of Atherosclerosis. *Am J Med Sci*. 2002;1:3-10.
15. **Davies MJ, Woolf N, Rowles PM, Pepper J.** Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J*. 1988;60:459-464.
16. **Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJH.** The expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM and E-Selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. 1993;171:223-229.
17. **Dejana E, Breviario F, Caveda L.** Leukocyte-endothelial cell adhesive receptors. *Clin Exp Rheumatol*. 1994;12:25-28.
18. **Dimagyuga P, Cerek B, Oguchi S.** Inhibitory effect on arterial injury-induced neointimal formation by adoptive B-cell transfer in Rag-1 knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22:644-649.
19. **Dosquet C, Weill D, Wautier JL.** Molecular mechanism of blood monocyte adhesion to vascular endothelial cells. *Hematol*. 1992;34:55-59.

- 20. Drexler H.** Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol.* 1998;82:3S-4S.
- 21. Entman ML, Ballantyne CM.** Inflammation in acute coronary syndromes. *Circulation.* 1993;22:800-803.
- 22. Garcia-Gastro I, Mato JM, Vasanthakumar G, Wiesman WP, Schiffmann E, Chiang PK.** Paradoxial Effects of Adenosine on Neutrophil Chemotaxis. *J Biol Chem.* 1983;258:4344-4349.
- 23. Gerrity RG.** The role of monocytes in atherogenesis: Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1981;103:191-200.
- 24. Goldstein JL, Brown MS.** Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation.* 1987;76:504-507.
- 25. Hajjar KA.** Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest.* 1993;91:2873-2879.
- 26. Hansson GK, Holm J, Jonasson L.** Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol.* 1989;135:169-175.
- 27. Hansson GK, Seifert PS, Olsson G, Bondjers G.** Immunohistochemical detection of macrophages and T lymphocytes in atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb.* 1991;11(3):745-50.
- 28. Hansson GK.** Regulation of immune mechanisms in atherosclerosis. *Ann N Y Sci.* 2001 ;947 :157-65.
- 29. Huo Y, Hafezi-Moghadam A, Ley K.** Role of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Fibrinectin Connecting Segment-1 in Monocyte Rolling and Adhesion on Early Atherosclerotic Lesions. *Circ Res.* 2000;87:153-159.

- 30. Huo Y, Ley K.** Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand.* 2001;173:35-43.
- 31. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ.** Cell Adhesion Molecules in Coronary Artery Disease. *JACC.* 1994;24:1591-1601.
- 32. Jeong SY, Lee HS, Hong SH, Cheong CH, Kim IK.** 3-deazaadenosine analogues inhibit the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  in RAW264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide. *Immunology.* 1996;89:558-562.
- 33. Jeong SY, Ahn SG, Lee JH, Kim JW, Rhim H, Jeong SW, Kim IK.** 3-Deazaadenosine, a S-Adenosylhomocystein hydrolase inhibitor, has dual effects on NF- $\kappa$ B regulation. *J Biol Chem.* 1999;274:18981-18988.
- 34. Jurgensen CH, Huber BE, Zimmermann TP, Wolberg G.** 3-Deazaadenosine Inhibits Leucocyte Adhesion and ICAM-1 Biosynthesis in Tumor Necrosis Factor-Stimulated Human Endothelial Cells. *J Immunol.* 1990;144:653-661.
- 35. Langheinrich AC, Braun-Dullaeus RC, Walker G, Jeide I, Schilling R, Tammoscheit K, Dreyer T, Fink L, Bohle RM, Haberbosch W.** Effects of 3-Deazaadenosin on Homocystein and Atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient Mice. *Atherosclerosis.* 2003;171:181-192.
- 36. Langheinrich AC, Bohle, RM.** Atherosclerosis: humoral and cellular factors of inflammation. *Virchows archiv* 2005;446:101-111.
- 37. Laurat E, Poirier B, Tupin E.** In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 2001;104:197-202.
- 38. Lentz SR, Sadler JE.** Inhibition of Thrombomodulin Surface Expression and Protein C Activation by Thrombogenic Agent Homocysteine. *J Clin Invest.* 1991;88:1906-1914.

- 39. Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow MR, Heistad DD.** Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest.* 1996;98:24-29.
- 40. Leonard EJ, Skeel A, Chiang PK, Cantoni GL.** The action of the adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaadenosine, on phagocytic function of mouse macrophages and human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1978;84:102-109.
- 41. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Libby P.** An atherogenetic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leucocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Throm.* 1993;13:197-204.
- 42. Lichtman AH, Cybulsky MI, Lusinskas FW.** Immunology of Atherosclerosis: The Promise of Mouse Models. *Am J Pathol.* 1996;149:351-357.
- 43. Loscalzo J.** The Oxidant Stress of Hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest.* 1996;98:5-7.
- 44. Mahley RW.** Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 1988;240:622-630.
- 45. Manka DR, Wiegman P, Din S.** Arterial injury increases expression of inflammatory adhesion molecules in the carotid arteries of apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res.* 1999;36:372-378.
- 46. McCully, KS.** Chemical Pathology of Homocysteine. I. Atherogenesis. *Ann Clin Lab Sci.* 1993; 23:477-493.
- 47. Medzihradsky JL.** Regulatory role for the immune complex in modulation of phagocytosis by 3-deazaadenosine. *J Immunol.* 1984;133:946-949.

- 48. Mine S, Tabata T, Wada Y, Fujisaki T, Iida T, Noguchi N, Niki E, Kodama T, Tanaka Y.** Oxidized low density lipoprotein-induced LFA-1-dependent adhesion and transendothelial migration of monocytes via the protein kinase C pathway. *Atherosclerosis*. 2002;160:281-288.
- 49. Mu En Lee, Hong W.** Homocysteine and Hypomethylation. A novel link in vascular disease. *Cardiovasc Med*. 1999;9:49-55.
- 50. Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, Lin AH, Melchior EP, Bullard DC.** Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1517-1520.
- 51. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R.** Apo E-Deficient Mice Develop Lesions of All Phases of Atherosclerosis Throughout the Arterial Tree. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:133-140.
- 52. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R.** Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the Apo E-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:842-851.
- 53. Nicoletti A, Kaveri S, Caligiuri G, Bariety J, Hansson GK.** Immunglobulin Treatment Reduces Atherosclerosis in Apo E Knockout Mice. *J Clin Invest*. 1998;102:910-918.
- 54. O'Brien KD, Allen MD, Mc Donald PC, Chait A, Harlan JM, Fishbein D.** Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1993;92:945-951.
- 55. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Alpers CE.** Neovascular expression of E-Selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leucocyte content. *Circulation*. 1996;93:672-682.

- 56. Palinski W, Miller E, Witztum JL.** Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci.USA* 1995;92:821-825.
- 57. Patel SS, Thiagarajan R, Willerson JT, Yeh ETH.** Inhibition of  $\alpha$ 4 Integrin and ICAM-1 Markedly Attenuate Macrophage Homing to Atherosclerotic Plaques in Apo E-Deficient Mice. *Circulation*. 1998;97:75-81.
- 58. Paulsson G, Zhou X, Törnquist E, Hansson GK.** Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:10-7.
- 59. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL.** Severe Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice Created by Homologous Recombination in ES Cells. *Cell*. 1992;71:343-353.
- 60. Plump AS, Breslow JL.** Apolipoprotein E and the Apolipoprotein E-Deficient Mouse. *Annu Rev Nutr*. 1995;15:495-518.
- 61. Plump AS, Masucci-Magoulas L, Bruce C, Bisgaier CL, Breslow JL, Tall AR.** Increased atherosclerosis in Apo E and LDL receptor gene knock-out mice as a result of Human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1105-1110.
- 62. Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR.** Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*. 1992;140:665-673.
- 63. Qiao J, Xie P, Fishbein MC.** Pathology of atheromateus lesions in inbred and genetically engineered mice. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:1480-1497.

- 64. Ramos CL, Huo Y, Jung U, Ghosh S, Manka DR, Sarembock IJ, Ley K.** Direct Demonstration of P-Selectin- and VCAM-1-Dependant mononuclear Cell Rolling in Early Atherosclerotic lesions of Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circ Res.* 1999;84:1237-1244.
- 65. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N.** Atherosclerosis in Mice Lacking Apo E; Evaluation of Lesional Development and Progression. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:141-147.
- 66. Richardson M, Hadcock SJ, DeReske M, Cybulsky MI.** Increased expression in vivo of VCAM-1 and E-Selectin by the aortic endothelium of normolipemic and hyperlipemic diabetic rabbits. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:760-769.
- 67. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J.** Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risk of future myocardial infarction in apparently healthy men. *The Lancet.* 1998;351:88-92.
- 68. Rodgers GM, Kane WH.** Activation of Endogenous Factor V by a Homocysteine-induced Vascular Endothelial Cell Activator. *J Clin Invest.* 1986;77:1909-1916.
- 69. Rodgers GM, Conn MT.** Homocysteine, an atherogenetic stimulus, reduces protein C activation and venous endothelial cells. *Blood.* 1990;15:895-901.
- 70. Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM.** Cross-sectional study of soluble intercellular adhesion molecule-1 and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1595-9.
- 71. Ross R, Faggiotto A, Bowen-Pope D, Raines E.** The role of endothelial injury and platelet and macrophage interactions in atherosclerosis. *Circulation.* 1984;70:377-82.
- 72. Ross R.** The Pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Engl J Med.* 1986;314:488.
- 73. Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801-809.

- 74. Ross R, Fuster V.** Atherosclerosis and Coronary artery disease. Philadelphia, *Lippincott-Raven Publisher*. 1996;251:788-791.
- 75. Shankar R, Del la Motte CA, Di Corleto PE.** 3-Deazaadenosin inhibits thrombin stimulated platelet-derived growth factor production and endothelial leucocyte adhesion molecule-1 mediated monocytic adhesion in human aortic cells. *J Biol Chem*. 1992;267:9376-9382.
- 76. Smith DM, Johnson JA, Turner RA.** Biochemical perturbations of BW91Y (3-Deazaadenosin) on human neutrophil chemotactic potential and lipid metabolism. *Int J Tissue React*. 1992;13:1-18.
- 77. Song L, Leung C, Schindler C.** Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001;108:251-259.
- 78. Sowers JR.** Hypertension, angiotensin II and oxidative stress. *N Engl J Med*. 2002;346:1999-2001.
- 79. Springer TA.** Traffic signals or lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301-314.
- 80. Stamler JS.** Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest*. 1993;91:308-318.
- 81. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE.** Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989;320:915-924.
- 82. Steinberg D, Witztum JL.** Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation*. 2002;105:2107-2111.
- 83. Stewart M, Thiel M, Hogg N.** Leukocyte integrins. *Current Opinion in Cell Biology*. 1995;7:690-696.

- 84. Sung S-SJ, Silverstein SC.** Inhibition of macrophage phagocytosis by methylation inhibitors. *J Biol Chem.* 1985;260:546-554.
- 85. Takahashi M, Ikeda U, Masuyama JI, Kitagawa SI, Kasahara T, Saito M, Kano S, Shimada K.** Involvement of adhesion molecules in human monocyte adhesion to and transmigration through the endothelial cells in vitro. *Atherosclerosis.* 1994;108:73-81.
- 86. Truskey GA, Herrmann RA, Kait J, Barber KM.** Focal Increases in Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Intimal Macrophages at Atherosclerosis-Susceptible Sites in the Rabbit Aorta after short Term Cholesterol Feeding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:393-401.
- 87. Ueland PM, Refsum H.** Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med.* 1989;114:473-501.
- 88. Upchurch GR, Welch GN, Freedman JE, Loscalzo J.** Homocyst(e)ine attenuates endothelial glutathione peroxidase and thereby potentiates peroxide-mediated cell injury. *Circulation.* 1995;92:I-228.
- 89. Valente AJ, Rozek MM, Sprague EA, Schwartz CJ.** Mechanisms in Intimal Monocyte-Macrophage Recruitment. A Special Role for Monocyte Chemotactic Protein-1. *Circulation.* 1992;86:20-25.
- 90. Van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE.** Adhesion molecules on endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1992;141:1427-1443.
- 91. Walker G, Langheinrich AC, Dennhauser E, Bohle RM, Dreyer T, Kreuzer J, Tillmanns H, Braun-Dullaeus RC, Haberbosch W.** 3-Deazaadenosin prevents adhesion molecule expression and atherosclerotic lesion formation in the aortas of C57BL/6J mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:128.1999;2673-2679.

- 92. Wang H, Yoshizumi M, Lai K.** Inhibition of Growth and p21 ras Methylation in Vascular Endothelial cells by Homocystein but not Cystein. *J Biol Chem.* 1997;272:25380-25385.
- 93. Wang G, Woo CWH, Sung FL, Siow YL, Karmin O.** Increased Monocyte Adhesion to Aortic Endothelium in Rats with Hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1777.
- 94. Welch GN, Loscalzo J.** Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 1998;338:1042-1050.
- 95. Welch GN, Upchurch GR, Farivar RS, Pigazzi A, Vu K, Brecher P, Keaney JF, Loscalzo J.** Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependant transcriptional activation of Nos2. *Proc Assoc Am Physicians.* 1998;110:22-31.
- 96. Yla-Herttuala S, Palinski W, Butler SW.** Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:32-40.
- 97. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N.** Spontaneous Hypercholesterolemia and Arterial Lesions in Mice Lacking Apolipoprotein E. *Science.* 1992;258:468-471.
- 98. Zhou X, Stemme S, Hansson GK.** Evidence for a local immune response in arteriosclerosis. CD4+ T cells infiltrate lesions of apolipoprotein-E-deficient mice. *Am J Pathol.* 1996;149(2):351-7.
- 99. Zhou X, Caligiuri G, Hamsten A.** LDL immunization induces T-cell-dependant antibody formation and protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:108-114.
- 100. Zimmermann TP, Wolberg G, Stopford CR, Duncan GS.** *Transmethylation.* 1979;187-196.

- 101. Zimmermann TP, Iannone M, Wolberg G.** 3-Deazaadenosine. *J Biol Chem.* 1984;259:1122-1126.
- 102. Zimmermann TP, Wolberg G, Stopford CR, Prus KL.** Biological Methylation and Drug Design. *Humana Press NJ.* 1986;417-426.

## 8. Lebenslauf

22. Juni 1978 geboren in Engelskirchen als Tochter von Gerlinde Ufer,  
geb. Gröwe und Diethard Ufer

### Schulbildung

1984 – 1988 Gemeinschaftsschule Marienhagen  
1988 – 1997 Gymnasium Moltkestr. Gummersbach  
1997 Allgemeine Hochschulreife

### Studium

Oktober 1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Justus-Liebig-Universität in Gießen  
August 1999 Ärztliche Vorprüfung  
August 2000 1. Ärztliche Prüfung  
März 2003 2. Ärztliche Prüfung  
Mai 2004 3. Ärztliche Prüfung

### Praktisches Jahr

April 2003 – Dez 2003 an den Lahn-Dill-Kliniken Wetzlar, Lehrkrankenhaus der  
Universität Gießen, Anästhesiologie und Chirurgie  
Dez 2003 – März 2004 am Groote Schuur Hospital, Kapstadt, Südafrika  
Innere Medizin

### Bisheriger beruflicher Werdegang

1. Oktober 2004 Erteilung der Approbation  
seit 1. November 2004 Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
der Universitätsklinik Würzburg, Leiter: Prof. Dr. N. Roewer

## **9. Danksagung**

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. med. A. C. Langheinrich für die großzügige Überlassung dieses interessanten Themas. Für die hilfsbereite Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit und der Anleitung im kardiologischen Labor danke ich Herrn Prof. Dr. med. A. C. Langheinrich, ebenso für die zahlreichen thematischen Anregungen und die Durchsicht der Arbeit nach ihrer Fertigstellung.

Herrn Prof. Dr. med. R.M. Bohle aus dem Zentrum für Pathologie sei herzlich für die hilfsbereite Unterstützung und die von ihm gebotene Möglichkeit der Nutzung der technischen Einrichtungen und Räumlichkeiten des Instituts gedankt.

Herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. W. Pabst aus dem Institut für Medizinische Informatik für die Hilfe bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

## 10. Verwendete Reagenzien

- Dualsystem-APAAP-Komplex: Dianova GmbH, Hamburg; Katalog-Nr.: M 800
- Dualsystem-Brückenantikörper: Dianova GmbH, Hamburg; Lot-Nr.: 48581, Katalog-Nr.: 315-005-003
- Dualsystem-Verbindungantikörper: Dianova GmbH, Hamburg; Lot-Nr.: 48081, Katalog-Nr.: 212-005-082
- Glyceringelatine: gebrauchsfertig; Firma Sigma, Lot-Nr.: 105H6052, Katalog-Nr.: GG1
- Hämalaulösung nach Mayer: gebrauchsfertig; Firma Merck, Lot-Nr.: 10054, Katalog-Nr.: 9249
- Mäuseserum: Dianova GmbH, Hamburg; Lot-Nr.: 47274, Katalog-Nr.: 015-000-001
- Neufuchsin-Entwicklerlösung: eigens hergestellt;

Die Entwicklerlösung wird in drei verschiedenen Gläsern A, B, C angesetzt.

### Ansatz Glas A:

- 66 ml Tris-Entwicklungspuffer werden vermischt mit
- 23,25 ml AMPD-Levamisol-Lösung

### Ansatz Glas B:

- 46,5 mg Naphthol-As-Bi-Phosphat werden gelöst in
- 562,5 µl N,N-Dimethylformamid

### Ansatz Glas C:

- 19,2 mg Na-Nitrit werden gelöst in
  - 480 µl aqua dest
- die entstandene 4%-ige Na-Nitritlösung wird versetzt mit
- 187,5 µl 5%-iger Neufuchsinlösung

Nach Fertigstellung der einzelnen Lösungen wird zunächst der Ansatz aus Glas A in den Ansatz aus Glas B gegeben und vermischt. Anschließend wird zu Lösung A+B der Ansatz aus Glas C gemischt. Der pH-Wert der entstandenen Entwicklerlösung wird mit 2 M HCL auf pH 8,7 titriert. Nach einer Reaktionszeit von 2 min wird die Lösung filtriert und ist anschließend fertig zum Gebrauch.

Verwendete Reagenzien für die Entwicklerlösung:

- Tris-Entwicklungspuffer: 4,9 g Tris-Base ( Firma USB; Lot-Nr.: 100909, Katalog-Nr.: US75825 )
- 1,5 g Tris-HCL ( Firma USB; Lot-Nr.: 100804, Katalog-Nr.: 22676 )
- 8,7 g NaCl ( Firma Roth; Art.-Nr.: 3957.1 )
- 1 l aqua dest
- AMPD-Levamisol-Lösung: 25 mg Levamisol ( Firma Sigma )
- 15,5 ml 0,2 M 2-Amino-2-methyl-1,3- propandiol ( Firma Merck )
- Naphthol-As-Bi-Phosphat ( Firma Sigma; Lot-Nr.: 65H5049, Kat.-Nr.: 2250
- N, N-Dimethylformamid ( Firma Sigma; Lot-Nr.: 104H0096, Kat.-Nr.: 4254
- Na-Nitrit ( Firma Sigma; Lot-Nr.: 85H0936, Kat.-Nr.: S2252 )
- 5%-ige Neufuchsinlösung ( Firma Fluka, Lot.-Nr.: 335351/1995, Kat.-Nr.: 72200 )

Primärantikörper:

ICAM-1: Dianova GmbH, Hamburg; Lot.-Nr.: 13168HC05L, Kat.-Nr.: CBL 1316

VCAM-1: Firma Serotec Ltd, Lot.-Nr.: 130031H, Kat.-Nr.: MCA 1229

- RMPI: gebrauchsfertig; Firma GIBCO BRL; Lot-Nr.: 13A0456, Kat.-Nr.: 21875-034
- Scharlachrotlösung ( Ansatz ): 0,25 g Scharlachrot ( Firma Riedel-de Haen; Lot-Nr.: 52280, Kat.-Nr.: 32698 ) werden in 70%-igem Ethylalkohol, der auf 60°C erhitzt wird, gelöst und anschließend über 24 Std. bei 70°C im Brutschrank inkubiert. Für die Benutzung muss die Lösung auf Zimmertemperatur abgekühlt sein.
- tissue tek: Miles Inc. Elkhart, In USA
- Tris-Waschpuffer ( Ansatz für 10 l ): 9,0 g Tris-Base werden mit 68,5 g Tris-HCL und 87,5 g NaCl vermischt und mit 10 l aqua dest zu einer Stammlösung verdünnt. Der pH-Wert der Stammlösung wird mit 2 M HCL auf den pH 7,5 titriert.