

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III  
des Universitätsklinikums Halle (Saale)  
(Direktor Prof. Dr. med. Karl Werdan)

**Dolastatin und seine Wirkung in der Proliferationsinhibition von  
humanen Gefäßmuskelzellen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Hagen Behr  
geboren am 10.07.1982 in Halle (Saale)

Betreuer: Prof. Dr. Harald Loppnow, Prof. Dr. Michael Buerke

Gutachter:  
Prof. Dr. Michael Buerke  
Prof. Dr. Rolf-Edgar Silber  
Prof. Dr. Ulrich Hake (Mainz)

Eröffnung: 17.05.2011  
Verteidigung: 30.04.2012

## Referat

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkweise des antimitotischen, natürlichen Peptids Dolastatin 15 auf proliferationsrelevante Gene humaner Gefäßmuskelzellen zu untersuchen. Gefäßmuskelzellen spielen eine herausragende Rolle bei der Entstehung der Restenose nach Ballondilatation in stenosierten Gefäßen. Zur Untersuchung der Beeinflussung der proliferationsrelevanten Gene P21, P53, Cyclin A2 und Cortactin wurden humane Gefäßmuskelzellen in Zellkulturen gezüchtet. Als Proliferationsstimuli wurden 10 % FKS (mitogen) und 5 ng/ml IL-1 (inflammatorisch) verwendet. Im colorimetrischen Proliferations Zell-ELISA mit BrdU, Zellzählungen und S-Phase Analysen im FACS inhibierte 10 µM Dolastatin 15 die Proliferation vollständig. Bei unstimulierten Zellen und FKS stimulierten Zellen zeigten sich unter Dolastatingabe teilweise eine signifikante Heraufregulationen von P21. Dies wurde in der RT-PCR, in der Real-Time PCR und im Western Blot nachgewiesen. Unter IL-1 Stimulation zeigte Dolastatin keinen Einfluss auf die P21 Regulation, jedoch zeigte sich ein statistisch signifikantes Absinken der Cyclin A2 mRNA. P53, und Cortactin wurden durch Dolastatin nicht beeinflusst. In der Zellzyklusanalyse im FACS zeigten sich unter FKS Stimulation und Dolastatin tendenziell erhöhte Apoptoseraten. Es ist daher davon auszugehen, dass Dolastatin 15 seine Wirkung in der Proliferationsinhibition über eine Zellzyklusarretierung und Apoptose erreicht. Dabei ist die Zellzyklusarretierung über einen Anstieg von P21 und alternativ ein Absinken von Cyclin A2 erklärbar. Wenn Dolastatin während der Ballondilatation oder von einem Stent lokal freigesetzt wird, kann so eine gefäßmuskelzellinduzierte Restenose verhindert werden.

Behr, Hagen: Dolastatin und seine Wirkung in der Proliferationsinhibition von humanen Gefäßmuskelzellen. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 59 Seiten, 2011

## Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	v
1	Einleitung	1
1.1	Atherosklerose	1
1.2	Pathogenese der Restenose	2
1.3	Dolastatin	4
1.4	Zellzyklus	5
1.5	Untersuchte Gene	6
2	Zielstellung	7
3	Material und Methodik	8
3.1	Zellkultur und Zellzählung	8
3.2	Messung der Zellproliferation mit Bromodesoxy-Uridin (BrdU)	9
3.3	RNA-Isolierung	10
3.4	RT-PCR	11
3.5	Proteinnachweis mit Western Blot und Coomassiefärbung	15
3.6	P21 Real-Time PCR	17
3.7	FACS-Analyse	18
4	Ergebnisse	19
4.1	Methodische Ergebnisse	19
4.1.1	Optimierung der RNA-Gewinnung	19
4.1.2	Optimierung der PCR-Primerkonzentration	22
4.2	Experimentelle Ergebnisse	23
4.2.1	Die Zellzahl und der BrdU-Einbau in die Gefäßmuskelzellen werden durch Dolastatin reduziert	23
4.2.2	Dolastatin reduziert die Zahl der Zellen, die sich in der S-Phase befinden	28
4.2.3	Dolastatin reguliert die P53- und Cortactin-mRNA-Exprimierung nicht	29
4.2.4	Dolastatin reduziert die Cyclin A2-mRNA in IL-1 stimulierten Kulturen	31
4.2.5	P21 mRNA wird unter Dolastatin vermehrt exprimiert	32
4.2.6	P21 Protein wird unter Dolastatin bei 0 %, 0,1 % und 10 % FKS vermehrt exprimiert	37
4.2.7	Dolastatin-behandelte Zellkulturen weisen vermehrt Apoptosefragmente auf	41

5	Diskussion	42
5.1	Dolastatin hemmt die Proliferation von humanen Gefäßmuskelzellen	42
5.2	Die Rolle der untersuchten Gene	42
5.2.1	Bei unstimulierten und mit FKS-stimulierten Zellen kann die Proliferationsinhibition durch P21-Heraufregulation erklärt werden	43
5.2.2	Bei IL-1-stimulierten Zellen wird die Proliferationsinhibition nicht über eine erhöhte P21-Expression, sondern über eine verminderte Cyclin A2-Expression bewirkt	44
5.3	Die Rolle einer möglichen dolastatininduzierten Apoptose	45
5.4	Eine Expressionsveränderung von P53 spielt im Rahmen der Dolastatinexposition auf die GMZ keine Rolle	46
5.5	Dolastatin bewirkt keine Expressionsveränderung von Cortactin	47
5.6	Charakterisierung von Dolastatin	47
5.7	Klinischer Ausblick	48
6	Zusammenfassung	50
7	Literaturverzeichnis	52
8	Thesen	59
9	Tabellarischer Lebenslauf	
10	Selbstständigkeitserklärung	
11	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
12	Danksagung	

## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
Arp	Actin related protein
BCA	Bicinchonic Acid
BMS	Bare metal stent
BrdU	Bromodesoxy-Uridin
BSA	Bovines Serum Albumin
CDK	Cyclin Dependent Kinase
cDNA	Complementary DNA
CPP 32	Caspase 3
DES	Drug eluting stent
Dola	Dolastatin 15
delta CT	Schwellenwert Zyklus (threshold cycle)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribunukleidacid
DNAse	DNA Spaltenzym
dNTP	2`-Desoxy-Nukleosid-5`-Triphosphat
E2F	Transkriptionsfaktor E2F
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FKS	Fötales Kälberserum
G1-Phase	Gap-1-Phase
G2-Phase	Gap-2-Phase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GMZ	Gefäßmuskelzellen
IL-1	Interleukin 1
M-Phase	Mitose-Phase
OD	Optische Dichte
Oligo dT	Oligo-desoxy-Thymidin
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidium Iodid
PTA	Perkutane Transluminale Angioplastie
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RNA	Ribonukleidacid

RNase	Ribonukleidacid Spaltenzym
rpm	rotation per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Phase	Synthese-Phase
TBS-T	Trisgepufferte Salzlösung mit Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

## 1 Einleitung

Die Restenose ist ein reaktiv-proliferativ-entzündlicher Prozess, der postinterventionell im dilatierten arteriellen Gefäß beobachtet wird. Eine Dilatation ist notwendig, wenn es aufgrund von Atherosklerose zu klinisch relevanten Stenosen gekommen ist.

### 1.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Systemerkrankung der arteriellen Gefäße, bei der es zur Einlagerung von Lipiden, Kohlenhydraten, Blutbestandteilen, Kalzium und Bindegewebe in die Intima der Arterienwand kommt. Als eine Ursache formulierten 1973 Ross und Glomset die „response to injury hypothesis of atherosclerosis“ (Ross und Glomset, 1973). Nach ihr kommt es initial zu einer Endothelschädigung. In einer modifizierten Hypothese spricht man von endothelialer Dysfunktion, verursacht durch Endothelverletzung oder endothelialer Dysbalance (Rubanyi, 1993). Als Ursachen der Schädigung werden Defekte durch Verletzungen, bakterielle Toxine und Membrankomponenten (LPS), Viren und Antigen-Antikörperreaktionen genannt. Joseph Leonard Goldstein sieht in seiner „Lipoprotein-induced-atherosclerosis“-Hypothese oxigeniertes LDL als Ursache für die Atherosklerose (Brown und Goldstein, 1983). Oxigeniertes LDL führt hiernach zur toxischen Schädigung des Endothels und somit zur Initiierung der Atherosklerose. Als weitere Ursachen werden infektiöse Agentien diskutiert (Libby et al., 2002). So konnten in atherosklerotisch veränderten Gefäßen, Chlamydien, Viren, bakterielle Peptidoglycane und T-Zellen gegen *Chlamydia pneumoniae* nachgewiesen werden (Kähler et al., 1999; Sakash et al., 2002). Auch endogene Immunmechanismen werden als Mitverursacher der Atherosklerose diskutiert. So zeigen Patienten mit Systemischem Lupus Erythematoses oder Rheumatoider Arthritis erhöhte Atheroskleroseraten (Watanabe et al., 1996; Hansson et al., 2002; Loppnow et al., 2008).

Allen Hypothesen ist gemein, dass es durch die Endothelschädigung zur vermehrten Sekretion von Zytokinen und zur Expression von Adhäsionsmolekülen kommt. Monozyten adhärieren an die Endothelzellen und wandern zwischen den Endothelzellen in die Intima (Auffray et al., 2007; Magnone et al., 2009). Dort kommt es zur Aktivierung und Differenzierung zu Makrophagen, welche das oxigenierte LDL aufnehmen und somit zu Schaumzellen degenerieren. Es bildet sich die streifige Intimaverfettung, der so genannte „fatty streak“ (Stary et al., 1994). Die aktivierten Makrophagen sezernieren Entzündungs- und Wachstumsfaktoren. Dies führt in der Media zur Aktivierung und Proliferation von Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten (Raines und Ross, 1993; Milette et al., 2005; Raj et al., 2006). Die aktivierten Gefäßmuskelzellen verändern ihren Phänotyp vom kontraktilen zum proliferativ-sekretorischen Typ. Es folgt die Migration in

die Intima und die Proliferation und Sekretion von extrazellulärer Matrix. Es kommt zur Bildung der atherosklerotischen Plaque, welche schließlich zahlreiche Zelltypen enthält und einen Lipidkern aufweist, der aus abgestorbenen Schaumzellen entstanden ist. Die akkumulierten Makrophagen setzen proteolytische Enzyme frei. Die Schicht, die die Plaque vom Blutstrom trennt, wird immer dünner, bis es zur Ruptur kommt. Die anschließend einsetzende Gerinnungsreaktion kann das Gefäß bis zum totalen Verschluss verengen.

Für die Revaskularisation der arteriosklerotisch stenosierten Koronargefäße stehen zwei wesentliche Verfahren zur Verfügung.

### **I. Die Bypass-Operation**

Die Bypassoperation ist auf folgende Indikationsstellungen begrenzt:

1. Signifikante Hauptstammstenose der linken Kranzarterie
2. Koronare 3-Gefäßerkrankung
3. Koronare 2-Gefäßerkrankung mit signifikanter Stenosierung des *Ramus interventricularis anterior*

### **II. Die Perkutane Transluminale Koronarangioplastie (PTCA)**

1. ohne Stent
2. mit unbeschichteten Stent (BMS)
3. mit beschichteten Stent (DES)

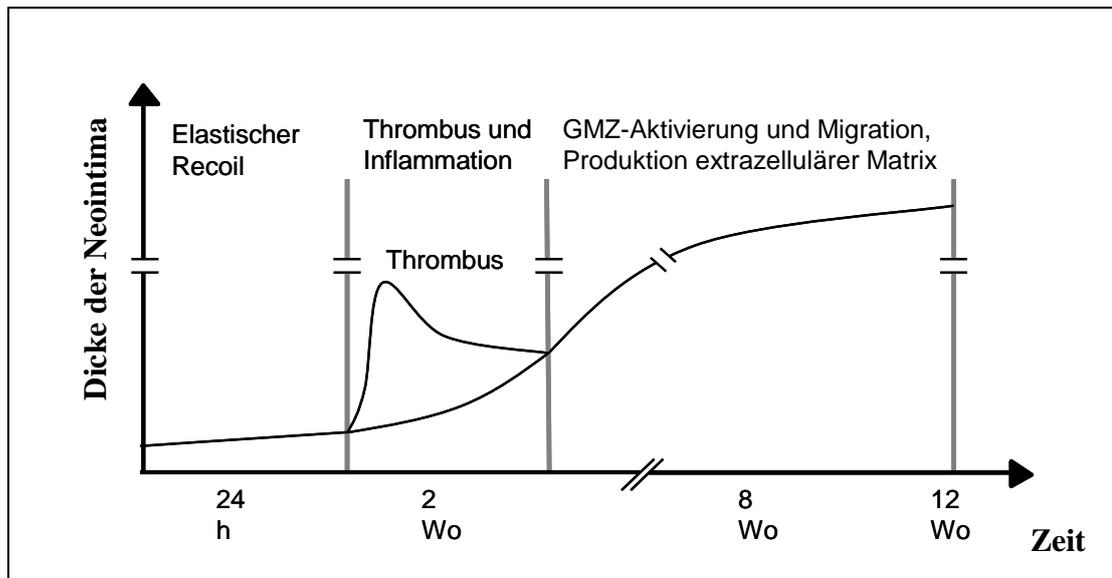
Das Problem der PTCA ist, dass es innerhalb von 3-6 Monaten in 25-40 % der Fälle im dilatierten Gefäß zu einer Restenose kommt (Guiteras-Val et al., 1999; Kosuga et al., 1999). Das Risiko einer Restenose ist dabei bei folgenden Faktoren erhöht: instabile Angina pectoris, akutes Koronar Syndrom, Diabetes mellitus, dialysepflichtige Niereninsuffizienz, Aufdehnung einer langstreckigen Stenose > 20 mm, Ostiumstenose, Bifurkationsstenose, Stenose bei Gefäßbiegung > 45°, hochgradige Stenose, geringer Durchmesser der stenosierten Koronararterie, Venengraft, rekanalisierter chronischer Verschluss, Residualstenose > 30% und verbleibender transstenotischer Druckgradient > 20 mmHg (Erdmann 2009). Die Restenose besitzt eine eigene Pathogenese und stellt eine ernsthafte Folge der PTCA dar.

#### **1.2 Pathogenese der Restenose**

In der ersten Phase der Restenose kommt es unmittelbar nach der PTCA zur neuerlichen Einengung der Gefäßwand. Diese Reaktion, welche als Reaktion auf die Überdehnung zu sehen ist und auf den elastischen Eigenschaften der Gefäßwand beruht, wird als „elastischer Recoil“ bezeichnet (Luo et al., 1996). Die zweite Phase, die Thrombusformation und Inflammation, wird

durch die Zerstörung der Gefäßinnenwand während der Ballondilatation initiiert. Das Endothel wird so stark zerstört, dass es am Ort der Intervention meist völlig fehlt. Es entstehen Dissektionen in der Intima, die bis in die Media und Adventitia reichen können (Wilensky et al., 1995). Durch den Verlust des Endothels kommt es zur Exposition subendothelialer und medialer Strukturen gegenüber dem Blutstrom. Es folgt die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten und die daraus resultierende Formation des Thrombus. Die aktivierten Thrombozyten entleeren ihre Sekretgranula, die eine Vielzahl von Faktoren wie Adenosin Diphosphat, Serotonin, Thromboxan-A<sub>2</sub> und Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ , IGF-1, PDGF) enthalten, und führen so zur Gefäßkonstriktion und Thrombusformation. Das Maximum dieser Reaktion wird nach 4 bis 12 Stunden erreicht (Steele et al., 1985). Entscheidend für die Weiterentwicklung der Restenose sind jedoch die aus den Thrombozytengranula stammenden PDGF und Thrombin. PDGF wirkt mitogen und migratorisch auf GMZ (Jalvy et al., 2007). Thrombin bewirkt zum einen die Freisetzung von PDGF aus Thrombozyten und ist zum anderen direkt proliferativ auf GMZ. Durch die Zerstörung des Endothels kommt es neben der Thrombusformation und Degranulation zur Infiltration der Gefäßwand mit leukozytären Zellen. Das Maximum der Infiltration wird nach 8 Stunden erreicht (Hay et al., 2001). Zu dieser massenhaften Infiltration kommt es zum einen durch die chemotaktische Wirkung des Thrombins und zum anderen durch die durch Dilatation verursachte Expression von „early response genes“ in den Makrophagen und GMZ der Gefäßwand (Libby et al., 1992; Marmur et al., 1992). Die „early response genes“ kodieren z. B. inflammatorische Zytokine, wie IL-1, IL-6, TGF- $\alpha$  und PDGF. So wird eine lokale Entzündungsreaktion autokrin und parakrin getriggert. Vor allem PDGF, aber auch IL-1 haben mitogene und migratorische Eigenschaften, die ihre Wirkung auf die Gefäßmuskelzellen ausüben (Schillinger und Minar, 2005). In der dritten Phase stehen die Aktivierung glatter Muskelzellen und die Synthese extrazellulärer Matrix im Mittelpunkt. Durch die initiale Dehnung der Gefäßwand erfahren die GMZ eine phänotypische Änderung. Der vorherrschende Phänotyp in der Media, der kontraktile Typ wandelt sich und wird zum sekretorischen Typ hervor. Der sekretorische Typ ist gegenüber mitogenen und migratorischen Stimuli empfänglich. Der kontraktile Typ hingegen nicht (Thyberg et al., 1990; Ross, 1993). Die durch Gerinnung und Inflammation freigesetzten Mediatoren aus der zweiten Phase können jetzt ihre Wirkung entfalten. Die GMZ migrieren aus der Media in die Intima und beginnen sich dort zu teilen. 7 Tage nach der Verletzung des Gefäßes beginnen die GMZ damit, Gene für die Synthese extrazellulärer Matrix zu exprimieren. Die hierbei produzierte Matrix besteht hauptsächlich aus Kollagen, Elastin, Fibronectin und Glykoproteinen (Doran et al., 2008). Die gebildete extrazelluläre Matrix nimmt 60-80 % der Neointima ein. Das nach Angioplastie neu formierte Endothel produziert Heparansulfat, welches inhibitorisch auf die Migration und Proliferation der GMZ wirkt und somit dem Prozess der Restenose entgegen wirkt (Snow et al., 1990). Neben den Gefäßmuskelzellen spielen für die Restenose nach Ballondilatation die Fibroblasten eine wichtige Rolle. Zwei bis drei Tage nach Gefäßdi-

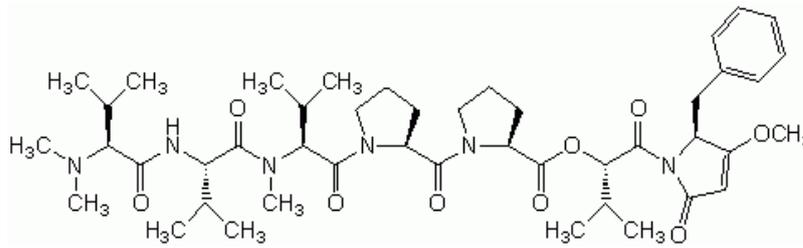
latation kommt es innerhalb der Tunica Adventitia zur Proliferation der Fibroblasten (Raines et al., 1988; Shi et al., 1996). Auch hier spielt der Wachstumsfaktor PDGF eine entscheidende Rolle. Nach der Fibroblasten Proliferation in der Adventitia kommt es zur Differenzierung dieser Zellen zu Myofibroblasten, welche in die Neointima einwandern (Shi et al., 1998). Dies geschieht in den ersten sieben Tagen nach Dilatation (Vergleich Abbildung 1). Auch wenn die Restenose erst nach mehreren Wochen manifest wird, initiiert wird sie unmittelbar nach der Dilatation.



**Abbildung 1. Schematische Darstellung der zeitlichen und morphologischen Entwicklung der Restenose nach Dilatation.** Die Verengung der Blutbahn erfolgt in drei Schritten. 1. dem elastischem Recoil, 2. der Thrombusbildung und Inflammation und 3. der Produktion von extrazellulärer Matrix durch aktivierte GMZ.

### 1.3 Dolastatin

Durch die lokale Applikation von Dolastatin 15 (nachfolgend als Dolastatin bezeichnet) während der Dilatation soll die Restenose verhindert werden. Dolastatin (Abbildung 2) ist ein potentes zytostatisches Medikament (Hu et al., 1993; Fennel et al., 2003). Bisher konnte gezeigt werden, dass Dolastatin an die „Vinca“ Domäne der Tubulindimere bindet (Cruz-Monserrate et al., 2003) und die GTP-Hydrolyse an den Mikrotubuli hemmt (Bai et al., 1992). Dadurch wird die Polymerisation der Mikrotubuli verhindert. Eine sich teilende Zelle arretiert so in der Mitose.



**Abbildung 2. Strukturformel von Dolastatin.**

Summenformel:  $C_{45}H_{68}N_6O_9$ , gewonnen aus *Dolabella auricularia*

Darüber hinaus wurden in Plasmozytom-Zellreihen unter Dolastatin erhöhte P53 Proteinwerte gemessen und eine erhöhte Apoptoserate beobachtet (Sato et al., 2007). Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass Dolastatin einen proliferationshemmenden Einfluss auf Kaninchen Gefäßmuskelzellen hat (Promotion A. Zobel). Die Dicke der Neointima der *A. iliaca* von Kaninchen war nach Ballondilatation mit Dolastatin (10  $\mu$ M) signifikant geringer als nach Ballondilatation ohne Dolastatin. In der Zellkultur in vitro wurde eine dosisabhängige Abnahme der Proliferation von Kaninchen GMZ unter Dolastatingabe gemessen. In Apoptose und Nekrose-messungen wurde kein Anstieg einer Apoptose- oder Nekroserate von Kaninchen GMZ unter Dolastatin gemessen.

#### 1.4 Zellzyklus

Die Gefäßmuskelzelle im sekretorischen Phänotyp beginnt zu proliferieren, wenn sie einen Proliferationsreiz erfährt (Abbildung 3). Bei den durchgeführten Experimenten wurden 10 % FKS und 5 ng/ $\mu$ l IL-1 als Proliferationsreiz gewählt. FKS enthält eine Mischung aus potenten Proliferationsinitiatoren (EGF, PDGF u. a.), IL-1 steht stellvertretend für den inflammatorischen Teil der Proliferationsinitialisierung. In der Zelle kommt es nach dem Proliferationsreiz zu einer Erhöhung der Cyclin D Expression (Sherr, 2000; Mullany et al., 2008). Cyclin D bildet mit CDK4 und CDK6 den Cyclin D/CDK4/6-Komplex, welcher das RB Protein phosphoryliert. In seiner unphosphorylierten Form ist das RB Protein dafür zuständig den Transkriptionsfaktor E2F zu inaktivieren (Dyson, 1998, Dimova und Dyson, 2005). Durch die Phosphorylierung durch den Cyclin D/CDK4/6-Komplex (Anfang G1-Phase) und Cyclin E/CDK2-Komplex (Ende G1-Phase) wird immer mehr RB Protein inaktiviert, vom E2F dissoziiert und dadurch immer mehr E2F aktiviert. Der Punkt, an dem der Wechsel von dem wachstumsfaktorabhängigen Cyclin D/CDK4/6-Komplex auf den wachstumsfaktor-unabhängigen Cyclin E/CDK2-Komplex erfolgt ist, ist der Restriktionspunkt. E2F aktiviert die ihm zugehörigen Gene, welche für Proteine codieren, die für die S-Phase benötigt werden (Morgan, 1997, Leone et al., 1998.). Hierunter

fallen das bereits genannte Cyclin E und Cyclin A. Cyclin A bildet mit der CDK2 den Cyclin A/CDK2-Komplex und ist für das Voranschreiten des Zellzyklus in der S-Phase verantwortlich. Über die Aktivierung von Cyclin B trägt es weiterhin zum Überschreiten des G2/M-Kontrollpunktes im Zellzyklus bei (Girard et al., 1991; Pagano et al., 1992; Joshi et al., 2008; Lee et al., 2008). Nach der Überwindung des G2/M-Kontrollpunktes beginnt die Zelle mit der Mitose (Horn et al 2003).

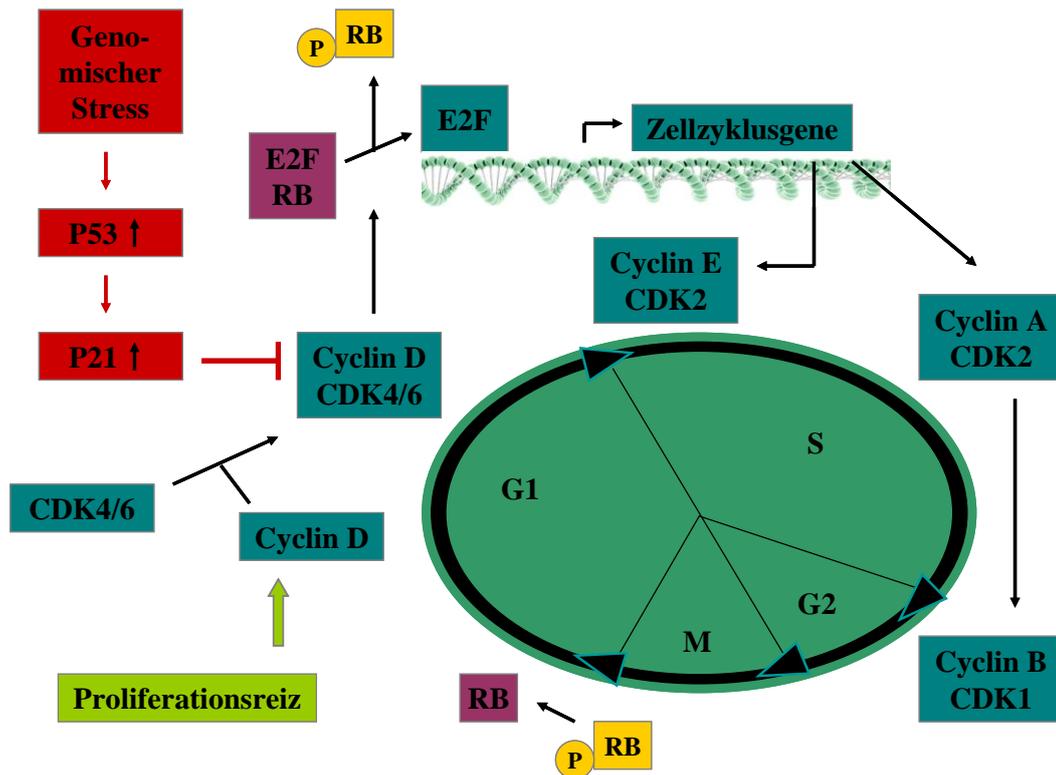
P21 kann den Zellzyklus und somit eine Vermehrung der Zell stoppen. P21 inhibiert den Cyclin D-CDK4/6-Komplex (Ciccarelli et al., 2005). Dadurch wird das RB Protein nicht weiter phosphoryliert (Harper et al., 1993) und inaktiviert somit weiterhin den Transkriptionsfaktor E2F. Durch den so verhinderten Anstieg von Cyclin E, kann die Zelle den Restriktionspunkt nicht überwinden und verharrt in der G1-Phase. Eine erhöhte P21 Expression wird durch erhöhte P53 Spiegel in der Zelle hervorgerufen (Zhao et al., 2006; Venkatakrishnan et al., 2007; Batta und Kundu, 2007). P53, welches ständig in Proteasomen abgebaut wird, steigt an, wenn die Zelle genomischen Stress (UV- und  $\gamma$ -Strahlung, genotoxische Stoffe, ungeplante Aktivierung von Onkogenen) erfährt (Yamaguchi et al., 2009).

## 1.5 Untersuchte Gene

Da P21 und P53 eine Schlüsselposition in der Arretierung des Zellzyklus spielen, wurde ihre mRNA-Expression gemessen und unter den experimentellen Bedingungen verglichen.

Um eine mögliche Wirkung von Dolastatin in anderen Bereichen des Zellzyklusses beobachten zu können, wurde die mRNA von Cyclin A2 gemessen. Cyclin A2 wird in allen Zellen exprimiert, während Cyclin A1 nur in Keimzellen exprimiert wird (Müller-Tidow et al., 2004). Cyclin A ist während der S-Phase und bei der Überwindung des G2/M-Kontrollpunktes von entscheidender Bedeutung.

Um eine mögliche Wirkung von Dolastatin auf die Zellvermehrung auch außerhalb des Zellzyklus zu beobachten, wurde die Cortactin-mRNA gemessen. Cortactin bindet an den Arp 2/3 Komplex (Zhu et al., 2005), welcher dadurch in seiner Aktivität stimuliert wird. Der Arp 2/3 Komplex katalysiert die Polymerisation des Aktins und stabilisiert das Aktinfilament. Aktin ist wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts und somit verantwortlich für Motilität, Kontraktilität, Signaltransduktion, Zellmembranpermeabilität und letztlich auch Teilung der Zelle (Patel et al., 1998; Timpson et al., 2007).



**Abbildung 3. Schematische Darstellung des Zellzyklus mit Fokus auf die untersuchten Gene.** Nach Proliferationsstimulation erfolgt die Cyclin D Expression. In Verbindung mit CDK4/6 wird der inaktivierte Transkriptionsfaktor E2F aktiviert. Es folgt die Transkription der Zellzyklusgene Cyclin E und Cyclin A sowie indirekt von Cyclin B. Die Zelle teilt sich in der Mitosephase. Genomischer Stress bewirkt einen Stopp der Zellteilung über einen P53 Anstieg und P21 Expression.

## 2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, den Wirkmechanismus von Dolastatin 15 auf humane Gefäßmuskelzellen genauer zu untersuchen. Greift Dolastatin 15 in die Regulation proliferationsrelevanter Gene ein?

Hierfür wurden humane Gefäßmuskelzellen aus der *V. saphena magna* kultiviert, unter experimentelle Bedingungen gesetzt, deren RNA isoliert und die Expression von P21, P53, Cyclin A und Cortactin mittels RT-PCR verglichen. Weiterhin wurde von P21 eine real time PCR durchgeführt und die Proteinexpression gemessen. Um die proliferationshemmende Wirkung von Dolastatin zu zeigen, wurden Zellzählungen und Proliferations Zell-ELISAs durchgeführt. In FACS-Analysen wurde der Anteil proliferierender Zellen und die Apoptoserate bestimmt.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Zellkultur und Zellzählung

Die für die Experimente in dieser Arbeit verwendeten humanen Gefäßmuskelzellen wurden aus Teilen der *V. saphena magna* isoliert, die in Bypassoperationen nicht genutzt werden konnten. Der Transport zur Zellkultivierung erfolgte in heparinisiertem Blut (1.000 Einheiten/ml) bei 4 °C. Endothel und Bindegewebe wurden entfernt, die Media wurde zerkleinert und in Petrischalen überführt. Nach 20 Minuten wurde Wachstumsmedium (DMEM mit 1,0 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 E/10.000 µg/ml), 1 % L-Glutamin (200 mM) und 10 % FKS (Fötale Kälberserum)) hinzugegeben und die Petrischalen im Zellinkubator (37 °C, 7,5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die verwendeten Medien und Medienbestandteile wurden von der Firma Biochrom besorgt. Konfluente Zellkulturen wurden trypsinisiert und in Zellkulturflaschen weiter passagiert. Zum Trypsinieren der Petrischalen wurde das Wachstumsmedium von dem Kulturgefäß abgesaugt. Auf den Zellrasen wurden 3 ml Trypsin/EDTA (Trypsin/EDTA-Lösung 0,05 %/0,02 % in PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, Firma: Biochrom AG) pipettiert und für 10 Minuten im Zellinkubator inkubiert. Für andere Kulturflaschen wurden entsprechende Mengen Trypsin verwendet (25 cm<sup>2</sup>-Flaschen - 4 ml Trypsin, 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen - 10 ml Trypsin, 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen - 15 ml Trypsin, Kulturflaschen von der Firma: Falcon BD Bioscience). Anschließend wurde die Lösung in ein 15 ml bzw. 40 ml Röhrchen gegeben. Das Trypsin wurde jeweils durch die Hinzugabe des gleichen Volumens Wachstumsmedium inaktiviert. Die Lösung wurde anschließend zentrifugiert (1.200 rpm, 10 Minuten). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in einem definierten Volumen resuspendiert. Für die Zellzählung mittels Zählkammer (Neubauer Zählkammer improved; Firma: Carl Roth) wurden von der Lösung 50 µl abgenommen und mit 50 µl Trypanblau gemischt. Die blau gefärbten Zellen wurden als abgestorben eingestuft und im Experiment nicht berücksichtigt. Die Zellzahl wurde anhand folgender Formel berechnet:

#### Zellzahlberechnung mit der Neubauer Zählkammer

$$\text{Zellzahl} = n \times \text{Kf} \times \text{Vf} \times V$$

n	=	gezählte Zellen
Kf	=	Kammerfaktor (2.500)
Vf	=	Verdünnungsfaktor (z. B. 2 bei: 50 µl Trypanblau + 50 µl Zelllösung)
V	=	Volumen der Gesamtzelllösung

Für die Experimente wurden die Zellen in einer Dichte von 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup> eingesät. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert, gezählt, mit Wachstumsmedium resuspendiert und in die Kulturgefäße übertragen. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Wachstumsmedium entfernt und die Kulturen mit Ruhemedium 0,1 (DMEM mit 1,0 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 E/10.000 µg/ml), 1 % L-Glutamin (200 mM) und 0,1 % FKS) gewaschen. Anschließend wurden die Kulturen 48 Stunden mit Ruhemedium 0,1 inkubiert (Serumverarmung). Hierdurch wurden den Zellen mitogene Substanzen entzogen. Vor den Experimenten erfolgte ein erneutes 2-maliges Waschen mit Ruhemedium 0,1. In experimentellen Ansätzen zur Untersuchung des Einflusses von IL-1 wurde stattdessen zweimal mit Ruhemedium 0 (DMEM mit 1,0 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 E/10.000 µg/ml), 1 % L-Glutamin (200 mM) ohne FKS) gewaschen.

### **3.2 Messung der Zellproliferation mit Bromodesoxy-Uridin (BrdU)**

In diesem Messsystem korreliert die Menge des eingebauten BrdU mit der Zellproliferation. Die Experimente wurden mit dem „Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)“-Kit der Firma Roche Diagnostics durchgeführt. Für jede experimentelle Bedingung wurden 6 Löcher einer 96 Loch Platte (Firma: Falcon BD Bioscience) mit Zellen versehen. Als Kontrolle zur Messung der unspezifischen Bindung des BrdU-Antikörpers wurden 6 Kulturen ohne BrdU vorgesehen. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des BrdU-Antikörpers an die Gefäßoberfläche wurden 6 Löcher ohne Zellen eingesetzt. Nach der Serumverarmung wurden die Zellen unter experimentelle Bedingungen gesetzt und 10 µl „BrdU labeling solution“ (BrdU 1:100 in Ruhemedium 0) hinzugefügt (Gesamtvolumen 100 µl). Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Medium abgesaugt und pro Loch 200 µl „fixdenat“ zur Denaturierung und Fixierung der Zellen auf dem Lochboden“ hinzu gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde das „fixdenat“ entfernt. Anschließend wurden 100 µl Peroxidase-markierte Anti-BrdU Antikörper (1:100 in „dilution solution“) in die Löcher pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimal mit 300 µl „Waschlösung“ (Waschlösung 1:10 in bidestilliertem Wasser) gewaschen und 100 µl „Substrat“ pro Loch hinzugegeben. Hierbei wurde das Substrat von der Peroxidase in einen sichtbaren Farbstoff umgewandelt. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 25 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Loch abgestoppt. Als Letztes erfolgte die fotometrische Messung der Absorption des Farbstoffes im „ELISA-Reader“ (Firma: Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm.

### **3.3 RNA-Isolierung**

Für die RNA-Isolierung wurden die Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen eingesät. Nachdem die Zellen Serum-verarmt waren, erfolgte der Ansatz der experimentellen Bedingungen und nach 4 Stunden Inkubation wurde die RNA isoliert. Nach dieser Zeit ist von einer genügenden Expression der Gene auszugehen (Hatomi et al., 1998, Wakino et al., 2001) Hierfür wurden von der Firma Qiagen die Kits „QIA-Shredder“ zum Reinigen der RNA und „RNeasy Mini“ zur RNA-Isolierung, und „RNase-Free DNase Set“ verwendet. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem im Kit enthaltenen RLT-Puffer entweder nach der Trypsinierung der Zellen oder durch unmittelbare Zelllyse mittels RLT. Der RLT-Puffer enthält Guanidin-Thiocyanat. Die beiden Techniken sind im folgendem beschrieben und werden im methodischen Ergebnisteil miteinander verglichen.

#### **RNA-Isolierung nach Trypsinierung**

Das Medium wurde aus den oben beschriebenen 25 cm<sup>2</sup> Flaschen abgesaugt, die Zellen wurden trypsiniert, in 15 ml Röhrchen überführt, zentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten) und der Überstand abgesaugt. Auf das Zellpellet wurden 350 µl „RLT-Lysepuffer“ gegeben und anschließend gevortext. Danach wurde das Lysat auf den „QIA-Shredder“ pipettiert und zentrifugiert (13.000 rpm, 2 Minuten). Der Durchfluss mit der RNA wurde in einem Sammelröhrchen aufgefangen, während genomische DNA und andere Zellbestandteile an die Membran der Säule verblieben. Der Durchfluss wurde im Anschluss mit 350 µl 70 %-igem Ethanol gemischt, zur RNA-Isolierung auf die „QIA-Säule“ gegeben und zentrifugiert (10.000 rpm, 15 Sekunden). Die RNA bindet bei diesem Schritt an die Membran der Säule.

Als Nächstes wurde die gebundene RNA mit 350 µl „RW1-Puffer“ gewaschen (10.000 rpm, 15 Sekunden) und anschließend eine DNase-Behandlung (Raumtemperatur, 15 Minuten,) durchgeführt. Hierzu wurden 80 µl DNase auf die QIA-Säule pipettiert. Danach wurde erneut mit 350 µl „RW1-Puffer“ gewaschen (10.000 rpm, 15 Sekunden). Anschließend wurde zweimal mit jeweils 500 µl „RPE-Puffer“ gewaschen (10.000 rpm, 15 Sekunden bzw. 2 Minuten) und die Membran getrocknet (13.000 rpm, 1 Minute). Zum Gewinnen des Eluates wurden 50 µl RNA-se-freies Wasser auf die Membran pipettiert und zentrifugiert (10.000 rpm, 1 Minute). Bei diesem Schritt löst sich die RNA von der Membran und wird in einem 1,5 ml Röhrchen aufgefangen.

## **RNA-Isolierung nach Lyse des Zellrasens mit RLT-Puffer**

Nach dem Absaugen des Mediums erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 6 ml PBS. Anschließend wurden 1.400 µl „RLT-Puffer“ über den Zellrasen gespült und die Zellen lysiert. Das Zelllysate wurde in 700 µl Aliquots auf den „QIA-Shredder“ pipettiert, homogenisiert und in einem 5 ml Röhrchen gesammelt. Danach wurden 1.400 µl Ethanol 70 % zu dem homogenisierten Zelllysate gegeben. Anschließend wurde das Lysat in 700 µl Aliquots auf die „QIA-Säule“ gegeben und die RNA an die „QIA-Membran“ gebunden. Anschließend wurden die Säulen wie oben beschrieben (RNA Isolierung nach Trypsinierung) mit RW1-Puffer gewaschen, DNase behandelt und die RNA eluiert.

### **3.4 RT-PCR**

#### **RNA-Quantifizierung**

Nach der RNA-Isolierung wurde die Konzentration der RNA fotometrisch im NanoDrop (Firma: Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Bei dieser Messmethode wird die Absorption bei 260 nm (RNA) und 280 nm (Proteine) gemessen. Die RNA Konzentration und die Reinheit des Eluates (Quotient 260/280 nm) wurden berechnet.

#### **Reverse Transkription**

Zur Herstellung von cDNA aus RNA wurde das „Omniscript reverse transcriptase“-Kit von Qiagen verwendet. Jeweils 500 ng RNA wurden eingesetzt. Die RNA wurden in 12 µl DEPC-behandeltem Wasser (Firma: Fermentas) gelöst und mit 8 µl Reverse-Transkriptase-Mastermix versehen und im Thermocycler (Thermocycler Gene Amp PCR System 2400, Firma: Perkin Elmer) inkubiert (37 °C, 60 Minuten). Anschließend wurde die Lösung 1:5 mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt (Endvolumen 100 µl).

##### Reverse-Transkriptase-Mastermix

2 µl Puffer RT (10x)

2 µl dNTP-Mix (jedes dNTP 5 mM)

2 µl Oligo dT-Primer (10 µM)

1 µl RNase-Inhibitor (5 U/µl)

1 µl „Omniscript-reverse-transcriptase“

## Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde mit den in Tabelle 1 beschriebenen Primerpaaren durchgeführt. Die Primer wurden aus Publikationen entnommen (P21: Khanna und Hosenpud 1999, Cortactin: Minta et al. 2006, P53 und Cyclin A2: Facchetti et al. 2004, 18S: Westphal 2003) und mit „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) unter [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) auf Richtigkeit der Basen, des Produkts und der Produktlänge überprüft. Für jeden experimentellen Ansatz wurden 47,5 µl Mastermix einschließlich der Primer und 2,5 µl cDNA verwendet. Der Mastermix wurde aus dem Kit: „Hot Star Taq Plus-Kit“ von Qiagen und den „dNTPs 10 µM each“ von Fermentas zusammengestellt. Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Synthesis bezogen.

### PCR-Mastermix

- 5,00 µl 10-fach Coral Load Puffer
- 1,00 µl dNTP-Mix (jedes dNTP 10 mM)
- 0,50 µl Primer sense 100 µM (Endkonzentration: 1 µM)
- 0,50 µl Primer antisense 100 µM (Endkonzentration: 1 µM)
- 0,25 µl Taq Plus DNA Polymerase
- 40,25 µl DEPC-behandeltes Wasser

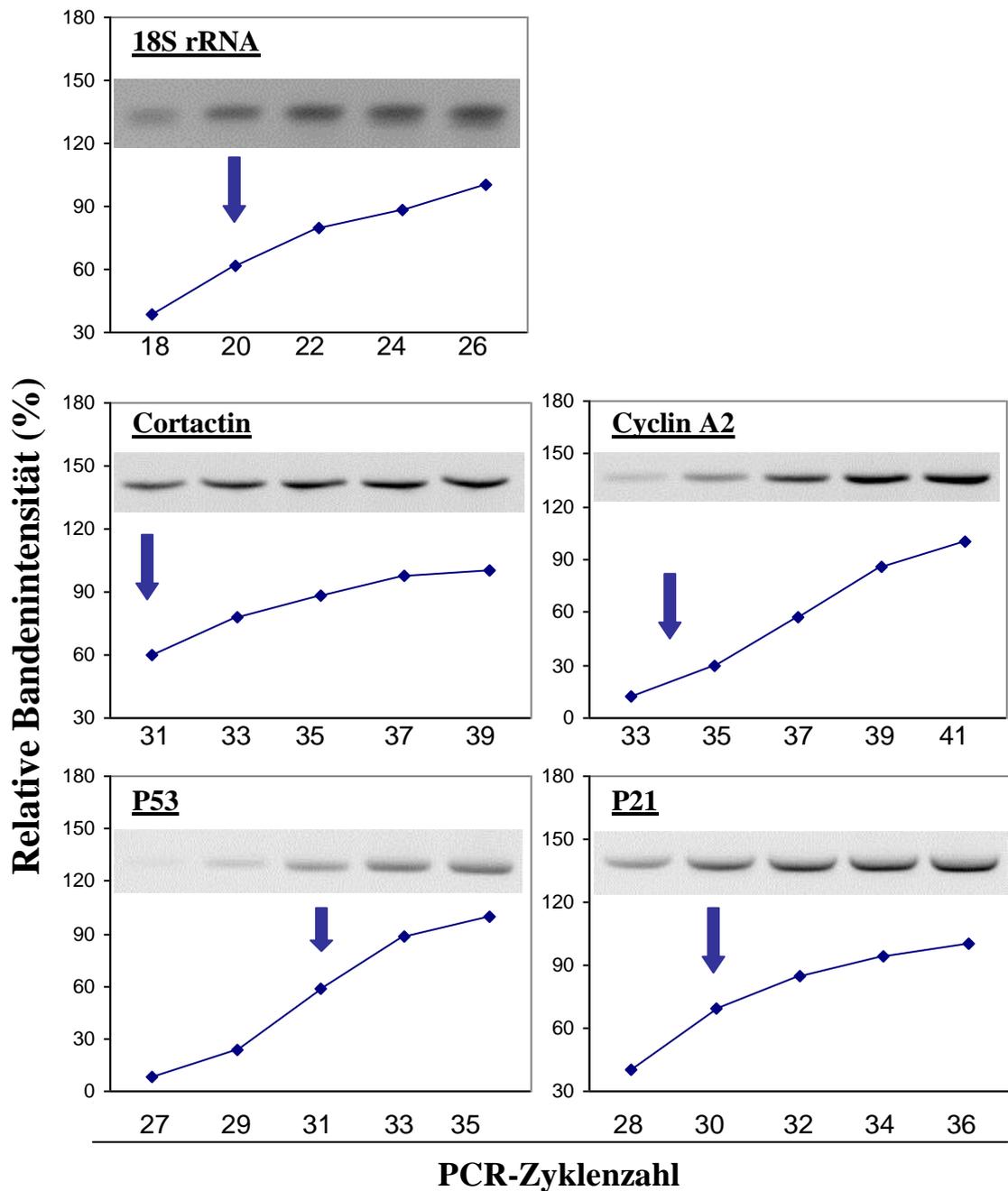
<b>Tabelle 1. Primersequenzen</b>			
Gen	Primer*	Sequenz	Produkt (bp)
18S rRNA	S	5'-GTT-GGT-GGA-GCG-ATT-TGT-CTG-3'	348
	AS	5'-AGG-GCA-GGG-ACT-TAA-TCA-ACG-C-3'	
Cyclin A2	S	5'-TCC-TTG-GAA-AGC-AAA-CAG-TAA-A-3'	332
	AS	5'-AAC-CCA-CTT-TAG-GTT-TAC-ATT-T-3'	
Cortactin	S	5'-GTA-GTT-TGA-TCA-GTT-GAA-GG-3'	366
	AS	5'-CCT-ATG-AGG-TGT-GCT-ACA-GGA-3'	
P21	S	5'-AGG-CGC-CAT-GTC-AGA-ACC-GGC-TGG-3'	521
	AS	5'-CAG-GCT-TCC-TGT-GGG-CGG-ATT-AGG-G-3'	
P53	S	5'-CTG-AGG-TTG-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'	371
	AS	5'-CTC-ATT-CAG-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'	

\* S: Sense, AS: Antisense

Die in Tabelle 2 dargestellten PCR-Protokolle wurden anhand der Zyklenzahlanalysen definiert, die in Abbildung 4 detailliert dargestellt sind. Die Zyklenzahlanalysen wurden durchgeführt, um das Erreichen der Plateauphase während der Amplifikation zu verhindern. In der Plateauphase erfolgt keine lineare Vermehrung der DNA durch die Primer mehr. Ein quantitativer Vergleich zweier PCR Produkte wäre so nicht möglich.

<b>Tabelle 2. PCR Protokolle</b>							
Gen	Denaturierung		Hybridisierung		Elongation		Zyklenzahl
	Temp. °C	Zeit sek	Temp. °C	Zeit sek	Temp. °C	Zeit sek	n
18S rRNA	94	30	60	30	72	30	20
Cyclin A2	94	60	50	30	72	240	34
Cortactin	94	60	42	120	72	30	31
P21	94	45	60	45	72	115	30
P 53	94	45	60	45	72	115	31

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden jeweils 10 µl der RT-PCR-Reaktionen mit 3 µl „6x loading dye“ (Firma: Fermentas) in einem Agarosegel (1,25 % Agarose, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetrennt. Zur Bestimmung der PCR-Produktgrößen wurde ein Molekulargewicht Standard verwendet („Gene Ruler DNA Ladder Mix“, Firma: Fermentas). Das Gel wurde mit einer Kamera (GeneSnap Firma: Syngene) unter UV-Transillumination fotografiert und die Bandengrauwerte mit der Software „Imagequant“ (Firma: GE Healthcare) densitometrisch bestimmt. Die Werte der 0,1 % FKS Banden wurden als 100 % definiert.



**Abbildung 4. Ermittlung der optimalen Zyklenzahl für die verwendeten Primerpaare.** Zur Zyklenzahlanalyse wurde die cDNA aus unstimulierten GMZ verwendet. Die Amplifikation erfolgte in 50 µl Ansätzen, welche nach o. g. Zyklenzahlen entnommen wurden und in 1,25 %-igem Agarosegel aufgetrennt, fotografiert (Bild) und mit „Imagequant“ densitometrisch quantifiziert (Grafik) wurden. Die relative Bandenintensität wurde aufgrund der „letzten“ Bande berechnet, indem diese Bande auf 100 % festgelegt wurde und die Grauwerte der anderen Banden in linearer Relation dazu berechnet wurden. Der Pfeil zeigt die später verwendete Zyklenzahl.

Für 18S rRNA stellte sich dabei der Plateaubereich ab einer Zyklenzahl von 22 dar. Die PCR wurden deshalb mit 20 Zyklen durchgeführt. Für die anderen Gene ergaben sich folgende Zyklenzahlen: Cortactin, Beginn der Plateauphase bei 33 Zyklen, verwendete Zyklenzahl 31; Cyclin A2, Beginn der Plateauphase bei 39 Zyklen, verwendete Zyklenzahl 34; P53, Beginn der Plateauphase bei 33 Zyklen, verwendete Zyklenzahl 31; P21, Beginn der Plateauphase bei 33 Zyklen, verwendete Zyklenzahl 31

### **3.5 Proteinnachweis mit Western Blot und Coomassiefärbung**

Für den Proteinnachweis wurden die Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen eingesät. Die Zellen wurden Serum-verarmt und anschließend in die experimentellen Bedingungen gebracht. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit 6 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zellyse mit 2 % SDS-Puffer (Firma: Carl Roth). Mit Hilfe eines Schabers wurde das Zelllysate vom Flaschenboden gelöst, anschließend in ein 1,5 ml Röhrchen überführt und 30 Minuten bei 45 °C inkubiert.

#### **Quantifizierung des Gesamtproteins mit BCA Protein Assay**

Dieser Tests wurde in einer 96-Loch Platte durchgeführt. Die Bestandteile wurden dem „BCA Protein Assay“-Kit von der Firma Pierce Thermo Fisher Scientific Co. entnommen. BSA (Bovines Serum Albumin) wurde als Standard in den Konzentrationen 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1.000, 1.500, und 2.000 µg/ml verwendet. Für jede experimentelle Bedingung wurden 4 µl Zelllysate zu 21 µl H<sub>2</sub>O pipettiert. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Zu jedem Loch wurden 200 µl „working reagent“ hinzu gegeben und anschließend inkubiert (37 °C, 30 Minuten). Danach wurde die Absorption bei 570 nm gemessen. Anhand des BSA-Standards wurde die Proteinkonzentration der Proben berechnet. Hierzu wurden die Werte grafisch dargestellt, die Regressionsgerade ermittelt und anhand dieser Geraden die Proben berechnet.

#### **Western Blot zur spezifischen Bestimmung des untersuchten Proteins**

Zur Auftrennung der Proteine in Vertikal Elektrophorese Kammern (Firma: Phase) wurde zunächst ein Gel, bestehend aus einem Sammelgel und einem Trenngel, angefertigt. Die hierzu verwendeten Puffer und Bestandteile sind in Tabelle 4 aufgelistet (Acrylamid, TEMED, SDS; Firma: Carl Roth; Tris, APS; Firma: Sigma Aldrich) Das Trenngel polymerisierte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurde über das Trenngel das Sammelgel geschichtet und ein

Kamm für die späteren Aussparungen eingesetzt. Nach 30 Minuten Polymerisation wurden die Proben und Standards in die Aussparungen pipettiert.

<b>Tabelle 3. Bestandteile des SDS-Polyacrylamidgels</b>		
	<u>Sammelgel 5 %</u>	<u>Trenngel 12 %</u>
Wasser	2,70 ml	3,30 ml
Acrylamid (30 %)	0,67 ml	4,00 ml
Tris (pH 6,8)	0,50 ml	----
Tris (pH 8,8)	----	2,50 ml
SDS (10 %)	0,04 ml	0,10 ml
APS (10 %)	0,04 ml	0,10 ml
TEMED	0,04 ml	0,04 ml

Für jede experimentelle Bedingung wurde in die entsprechende Aussparung des SDS-Polyacrylamidgels die gleiche Menge Gesamtprotein aufgetragen. Von der Bedingung mit der niedrigsten Konzentration wurden 30 µl pipettiert. Durch das Pipettieren entsprechend angepasster Volumina der anderen Proben wurde die gleiche Proteingesamtmenge pro Bahn aufgetragen. Als Positivkontrolle wurden 15 µg des „C32 nuclear extract sc-2136“ der Firma Santa Cruz verwendet. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde ein Molekulargewichtsstandard verwendet (Page ruler prestained protein ladder; Firma: Fermentas). Die Gelkammer wurde nach dem Auftragen der Proben und Standards mit 1 x SDS Lauffuffer gefüllt (3,25 g Plus one Tris, 14,4 g plus One Glycin, 1 g SDS in 11 MilliQ-Wasser). Anschließend wurden die Proben aufgetrennt. Zunächst erfolgte die Auftrennung bei 20 mA, bis die Proben den Übergang zum Trenngel erreicht hatten. Danach wurden die Proben bei 30 mA 60 Minuten aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Glasplatten von dem Gel entfernt. Das Gel wurde kurz in Blotpuffer (pH 8,3; 25 mM trisCl; 192 mM Glycin; 20 % Methanol) geschwenkt. Für den Blot wurde das Gel auf eine Nitrozellulosemembran gelegt (Nitrozellulosemembran Hybond ECL; Firma: Amersham pharmacia biotech.). Gel und Membran wurden zwischen Blotpuffer getränkte Filterpapiere gelegt (Gelblotting Papier; Firma: Schleicher und Schuell) und zwischen zwei Graphitplatten im „semi-dry Verfahren“ geblottet. Der Blot wurde mit 1 mA/cm<sup>2</sup>-Gelfläche 90 Minuten durchgeführt (Biometra Blot Powerpack p23; Firma: Biometra). Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Blot 1 Stunde blockiert. Zum Blockieren der Membran wurden alternativ zwei Blockierungslösungen verwendet: A) 5 % Milchpulverlösung (Firma: Sucofin) wurden verwendet, wenn bei der Chemilumineszenz mit ECL-Plus gearbeitet wurde. B) ECL-Advance Blockierungslösung wurde verwendet, wenn bei der Chemilumineszenz ECL-Advance eingesetzt wurde. ECL-Plus und ECL-Advanced wurden von der Firma GE-Healthcare erworben.

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Blockieren in TBS-T gewaschen (TBS: 500 mM Tris-Cl, 500 mM NaCl pH 7,5; T: Tween 20 Ultra 0,1 %; Firma: Sigma-Aldrich) und entlang der 26 kD Markierung auseinander geschnitten. Die obere Hälfte enthält die GAPDH-Banden, welche bei 35 kD liegen. Dieser Teil der Nitrozellulosemembran wurde in Frischhaltefolie eingeschweißt, bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag bearbeitet. Die untere Hälfte, die die P21-Banden enthält, wurde mit dem P21-Antikörper (1:100 in Blockierungslösung) über Nacht bei 4 °C inkubiert (P21 (187): sc-817; Firma: Santa Cruz). Am nächsten Tag wurde zum oberen Teil der Membran der GAPDH-Antikörper (1:15.000 in Blockierungslösung) hinzu gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (GAPDH: Mab Cat.nr. 4300; Firma: Ambion). Anschließend wurden beide Membranen parallel weiter bearbeitet. Zunächst wurden sie dreimal 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Danach wurde der Zweitantikörper hinzugegeben (1:2.000 in Blockierungslösung bei ECL-Plus, bzw. 1:20.000 in Blockierungslösung bei ECL-Advanced) und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (Zweitantikörper: Goat anti mouse IgG-HrP sc-2055; Firma: Santa Cruz). Anschließend erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit TBS-T für jeweils 5 Minuten. Zur Auswertung wurden die Membranen auf eine Platte gelegt und mit ECL-Plus bzw. ECL-Advanced benetzt. Anschließend erfolgte die Messung der Chemilumineszenz im „Image Reader LAS 3000“ (Firma: Fujifilm), sowie eine quantitative Auswertung mit „ImageQuant“.

### **Coomassiefärbung**

Für die Coomassiefärbung wurde parallel zum Western Blot ein SDS-Polyacrylamidgel gegossen und die Proteine aufgetrennt. Von der Probe mit der geringsten Proteinkonzentration wurden 10 µl pipettiert. Von den anderen Proben entsprechend angepasste Volumina. Nach der Proteinauftrennung wurde das Gel 24 Stunden mit Eisessig-Lösung fixiert. Das fixierte Gel wurde anschließend 1 Stunde in „0,2 % Coomassie-Brilliant-Blue G250“ geschwenkt. Danach erfolgte die Entfärbung mit Eisessig-Lösung und das Scannen des Bildes.

### **3.6 P21 Real-Time PCR**

Für die Real-Time PCR wurden mit dem iCycler von Bio-Rad Laboratories durchgeführt. Hierzu wurden die auch bei der RT-PCR verwendeten cDNAs aus 5 Experimenten und die P21 und 18S Primer verwendet. Der Real-Time PCR-Mastermix (Bestandteile von der Firma Invitrogen) setzte sich folgendermaßen zusammen:

### Real-Time PCR Mastermix

10,00 µl cDNA  
2,50 µl 10-fach PCR Puffer  
0,75 µl MgCl<sub>2</sub>  
0,50 µl dNTPs (jedes dNTP 10 µmol)  
1,00 µl Primer sense 5 nmol  
1,00 µl Primer antisense 5 nmol  
0,5 µl 10-fach SyberGreen  
0,25 µl 100-fach Fluorescein  
0,30 µl Taq-Polymerase  
9,20 µl Wasser

Der Expressionslevel wurde mit folgender Formel berechnet:

$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$

wobei sich  $\Delta\Delta C_t$  wie folgt berechnet:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{P21}} - \Delta C_{t_{18S}}$$

### **3.7 FACS-Analyse**

Hierzu wurden die Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen eingesät. Die Zellen wurden serumverarmt und anschließend unter die experimentellen Bedingungen gebracht. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und anschließend zentrifugiert (1.200 rpm, 5 Minuten). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Die Lösung wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert (1.700 rpm, 7 Minuten). Der Überstand wurde anschließend verworfen. Auf das Zellpellet wurden unter ständigem Vortexen tröpfchenweise 1 ml -20 ° C kaltes 70 % Ethanol pipettiert. Anschließend erfolgte die Lagerung bei 4° C. Für die Untersuchung wurden die gelagerten Proben zunächst zentrifugiert (1.700 rpm, 3 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 1xPBS gewaschen (1.700 rpm, 3 Minuten). Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden 150 µl RNase (1 mg/ml in 1xPBS) auf 65 °C vorgewärmt, auf das Pellet gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur und Lichtabdeckung inkubiert. Anschließend wurden 150 µl PI (100 µg/ml in 1xPBS) zur DNA-Anfärbung hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Messung im FACS (FACSVantage SE von Becton Dickinson).

## 4 Ergebnisse

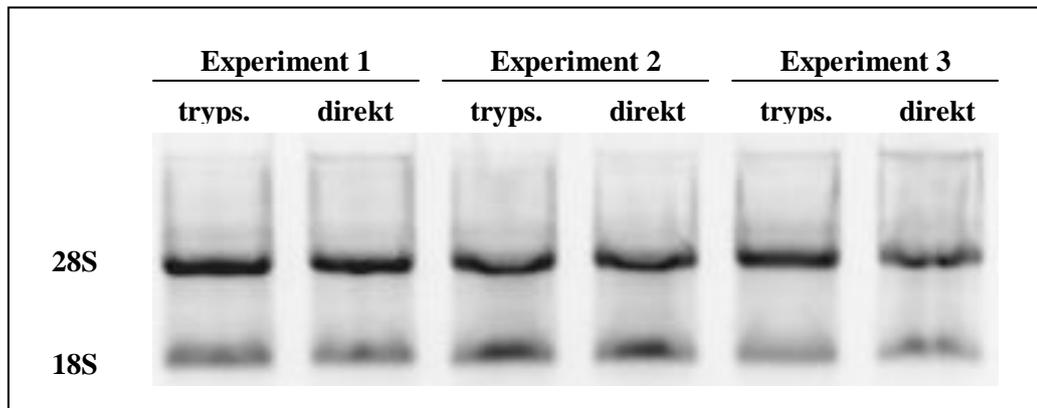
### 4.1 Methodische Ergebnisse

Bis zum Erreichen des Methodenstandards waren mehrere Veränderungen in den Protokollen notwendig. Die folgenden Ergebnisse zeigen die durchgeführten Optimierungsschritte.

#### 4.1.1 Optimierung der RNA-Gewinnung

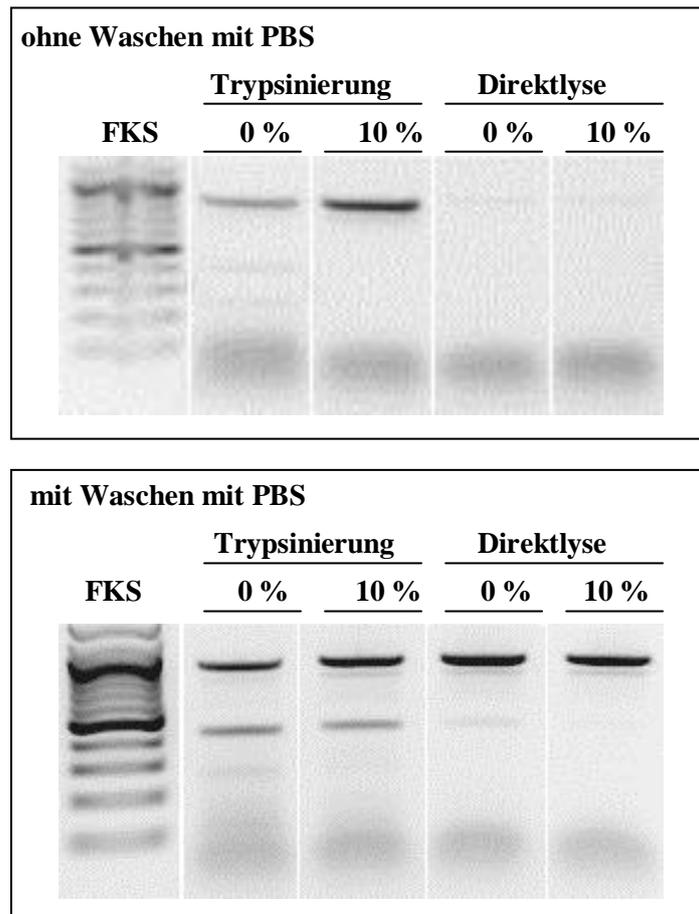
##### RNA-Isolierungsverfahren

Um eine mögliche Regulation von Genen während der Trypsinierung und Zentrifugation bei der RNA-Isolierung zu verhindern, wurde das Verfahren der RLT-Direktlyse angewandt. Diese Methode dauert 3 Minuten im Vergleich zur RNA-Isolierung über den Schritt des Trypsinierens mit 30 Minuten. Der Vergleich zeigt in Abbildung 5, dass man über die RLT-Direktlyse annähernd gleiche Mengen an RNA isolieren kann. Die Methode der RLT-Direktlyse wurde bei allen RNA-Isolierungen angewandt, bei denen die mRNA-Expemierung der Gene P21, P53, Cyclin A, Cortactin sowie 18S rRNA gemessen wurde.



**Abbildung 5.** Die RNA Isolierung nach Trypsinierung bzw. Direktlyse mit RLT Puffer ist vergleichbar effektiv. GMZ wurden in 6-Lochplatten inkubiert (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>). Nach 24 Stunden wurde 1 Loch mit Trypsin behandelt und die RNA der Zellen in Pellets isoliert. Die Zellen des zweiten Lochs wurden direkt mit RLT Puffer lysiert und die RNA isoliert. Die RNA (10 µl mit 1,7 – 1,1 µg RNA) wurden mit 3 µl „Loading dye“ auf ein 1,25 %-iges Agarosegel aufgetragen und getrennt. Die Banden wurden durch UV-Transillumination sichtbar gemacht und fotografiert.

Die PCR der über Trypsinierung und über RLT-Direktlyse gewonnenen RNA zeigte allerdings deutliche Unterschiede (Abbildung 6, ohne Waschen mit PBS). So waren die Banden der PCR nach RLT-Direktlyse nur sehr schwach ausgeprägt. Bei diesen Experimenten wurde der Primer CPP-32 verwendet. CPP-32 wurde gemäß den o. g. PCR Verfahren durchgeführt. Die Sequenz der Primer ist: Sense: ATA-AAG-GGA-TCC-ATG-GAG-AAC-ACT-GAA-AAC-TCA-G; Antisense: AAC-CTG-CAG-TTA-GTG-ATA-AAA-ATA-GAG-TTC-TTT-TGT-GAG-C, PCR-Protokoll: Denaturierung: 94 °C 30 s, Hybridisierung: 64 °C 90 s, Elongation: 72 °C 90 s + 2 s pro Zyklus, Zyklenzahl 34. Da ein Inhibitor der reversen Transkriptase oder der Taq-Polymerase (PCR) im Medium vermutet wurde, wurde um den Inhibitor zu entfernen vor dem Lysieren mit RLT-Puffer, der Zellrasen zweimal mit 6 ml PBS gewaschen. Nach diesem Schritt waren die Banden nach beiden Isolationsmethoden vergleichbar stark ausgeprägt (Abbildung 6, mit Waschen mit PBS).

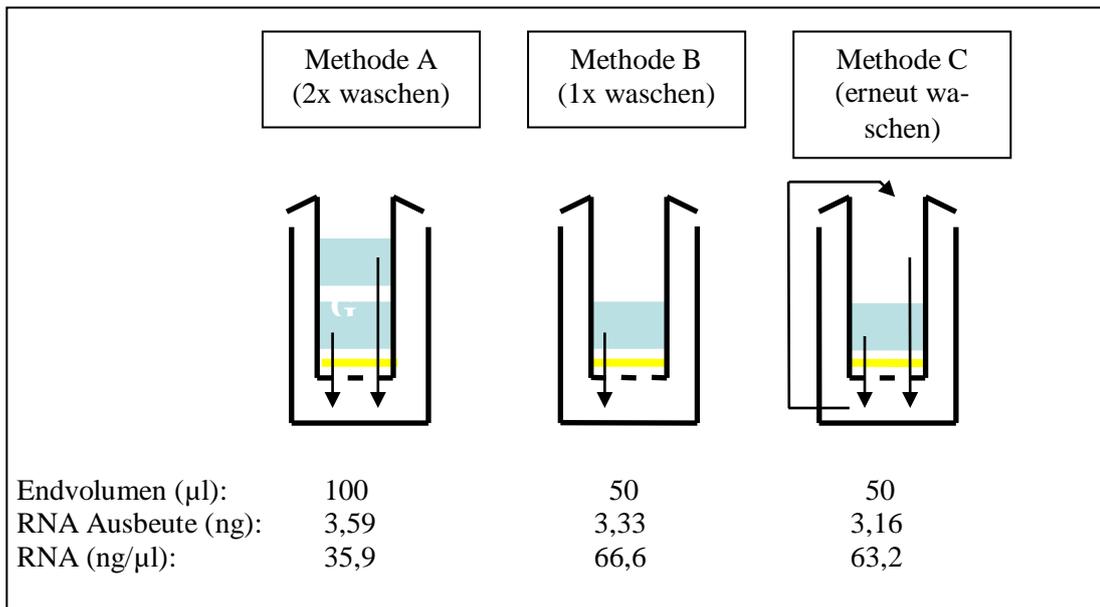


**Abbildung 6: Die Banden der mittels Direktlyse gewonnenen RNA sind deutlich schwächer als die Banden der über Trypsinierung gewonnenen RNA. Das Waschen mit PBS hebt diesen Effekt auf.** Die GMZ wurden in 75-cm<sup>2</sup>-Flaschen eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>). Die Zellen wurden 48 Stunden Serum-verarmt und anschließend unter die experimentellen Bedingungen gebracht (0 % FKS und 10 % FKS). Die RNA-Ernte erfolgte nach 4 Stunden. Für die durchgeführten methodischen Experimente wurde die CPP-32 mRNA verwendet. Jeweils 10 µl der CPP-32 PCR-Ansätze wurden auf einem 1,25 % Agarosegel aufgetrennt.

### RNA-Eluierung

Bei der cDNA-Synthese kann nur ein begrenztes RNA Volumen eingesetzt werden. Die hierbei verwendete RNA muss eine Mindestkonzentration von 42 ng/µl aufweisen. Daher wurde zunächst analysiert, ob durch zweimaliges Eluieren die RNA Ausbeute erhöht werden kann, ohne die RNA Konzentration zu niedrig werden zu lassen. Die Verwendung zusätzlicher Elu-

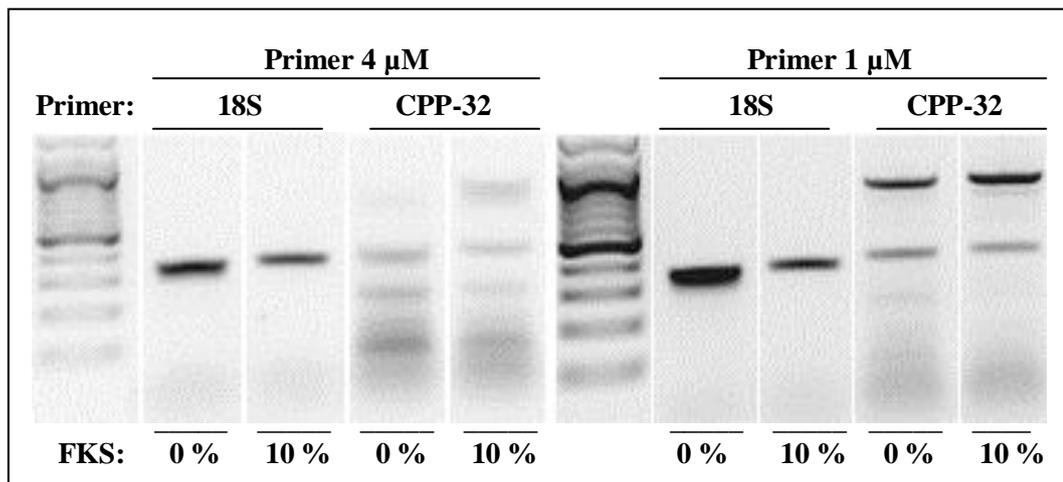
tionsschritte erhöhte die Ausbeute der RNA Isolierung nicht wesentlich. Erniedrigte die RNA Konzentration aber zu stark. Für alle folgenden Versuche wurde deshalb die RNA-Eluierung mit 50 µl H<sub>2</sub>O durchgeführt.



**Abbildung 7. Einmalige Eluierung mit 50 µl H<sub>2</sub>O ergibt die höchste RNA-Konzentration.** Die GMZ wurden in 3 Löcher einer 6 Loch-Platte eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>). Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte die RLT-Direktlyse. Die Lysate der drei Löcher wurden bis zum Eluieren gleich behandelt. Die RNA wurde auf 3 Säulen aufgetragen und nach 3 Methoden eluiert. Methode A: die RNA wurde zweimal mit 50 µl frischen H<sub>2</sub>O eluiert. Das Endvolumen war 100µl. Methode B: die RNA-Eluierung erfolgte mit 50µl H<sub>2</sub>O. Das Endvolumen betrug 50 µl. Methode C: die RNA Eluierung erfolgte zunächst mit 50 µl H<sub>2</sub>O. Diese 50 µl wurden erneut, für eine zweite Eluierung verwendet. Das Endvolumen betrug 50 µl.

#### 4.1.2 Optimierung der PCR-Primerkonzentration

Zur Optimierung der Primerkonzentration wurden verschiedene Primerkonzentrationen miteinander verglichen. Es wurde zunächst die vom Hersteller empfohlene Konzentration 4 µM verwendet. Hierbei zeigten sich jedoch deutlich schwächere Banden als mit einer Konzentration von 1 µM. Es wurde deshalb mit einer Primerkonzentration von 1 µM weitergearbeitet. Stellvertretend sind in Abbildung 8 CPP-32 und 18S rRNA-Banden dargestellt.



**Abbildung 8.** Die PCR-Banden sind bei der Primerkonzentration 1  $\mu\text{M}$  stärker exprimiert als bei der Primerkonzentration 4  $\mu\text{M}$ . Die GMZ wurden in 75-cm<sup>2</sup>-Flaschen eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>). Nach 24 Stunden wurden sie serumverarmt, 48 Stunden inkubiert und unter die experimentellen Bedingungen gebracht (0 % FKS und 10 % FKS). Die RNA-Ernte erfolgte nach 4 Stunden. Jeweils 10  $\mu\text{l}$  der CPP-32 bzw. 18S rRNA PCR-Ansätze (50  $\mu\text{l}$ ) wurden auf ein 1,25 % Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt und unter UV-Transillumination fotografiert.

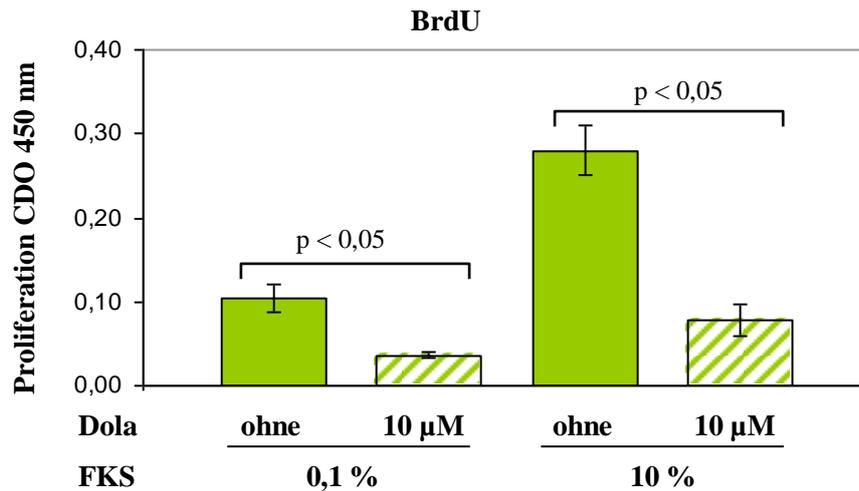
## 4.2 Experimentelle Ergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Wirkweise von Dolastatin auf humane Gefäßmuskelzellen dargestellt. Zunächst wird die Hemmung der Proliferation durch Dolastatin anhand verschiedener Parameter analysiert. Anschließend werden die Untersuchungen zur RNA und Protein Expressierung der GMZ nach Dolastatin vorgestellt und die Ergebnisse der FACS- Analyse gezeigt.

### 4.2.1 Die Zellzahl und der BrdU-Einbau in die Gefäßmuskelzellen werden durch Dolastatin reduziert

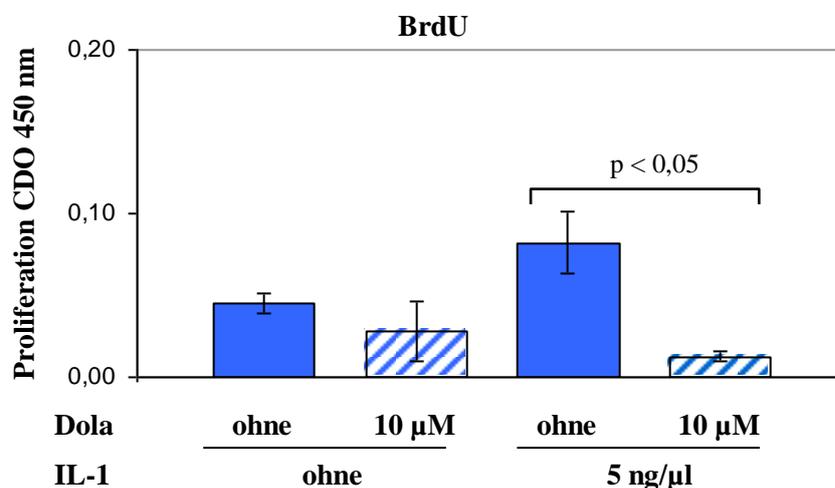
Um die Wirkung von Dolastatin auf proliferationsrelevante Gene zu zeigen, musste zunächst sichergestellt werden, dass 1. die Zellen unter Stimulation proliferieren und 2. dass die Zellen unter Dolastatin die Proliferation verringern. Hierzu wurde der BrdU Proliferations Zell-ELISA verwendet, da die Inkorporation von BrdU in die Zell-DNA mit der Zellproliferation korreliert. In Abbildung 9 ist dargestellt, dass die Zellen, die mit 10 % FKS stimuliert werden, 2,69-fach mehr BrdU in die Zell-DNA einbauen als unstimulierte Zellen (0,1 % FKS). Weiterhin ist dar-

gestellt dass der BrdU-Einbau in stimulierten als auch unstimulierten GMZ, nach Behandlung mit Dolastatin verringert ist. Unter 10 % FKS und Dolastatin wird die Proliferation von 0,280 auf 0,077 reduziert, was einer Reduktion auf 27,5 % entspricht. Zellen mit 0,1 % FKS und Dolastatin zeigen eine Reduktion des BrdU-Einbaus von 0,104 auf 0,036, was einer Reduktion auf 34,6 % entspricht. Die Werte wurden innerhalb eines Proliferationszeitraumes von 24 Stunden erhoben.



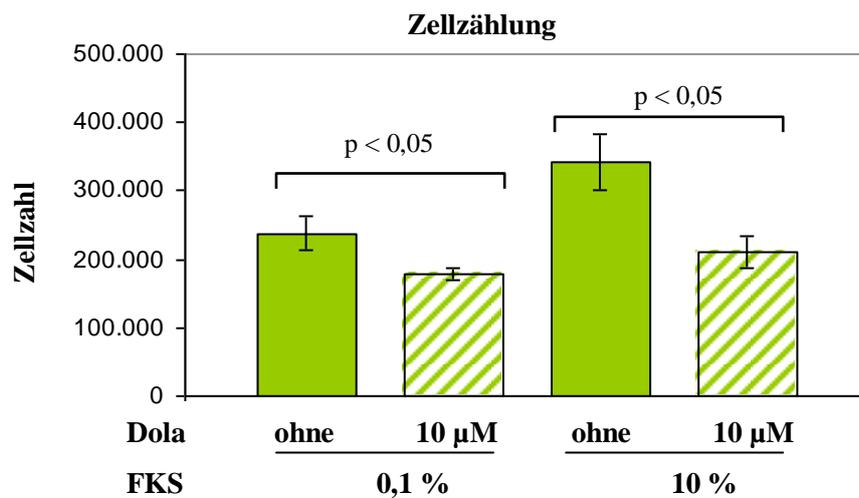
**Abbildung 9. Dolastatinbehandelte Zellen zeigen geringere Proliferation.** Die GMZ wurden in 96-Lochplatten eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>), nach 24 Stunden Serum-verarmt und weitere 48 Stunden inkubiert. Nachdem die Zellen unter die experimentellen Bedingungen gebracht (0,1 % FKS und 10 % FKS; jeweils ohne und mit 10 µM Dolastatin) und mit BrdU versehen wurden, erfolgte nach 24 Stunden die colorimetrische BrdU-Messung. Der BrdU-Einbau wurde mit Anti-BrdU Antikörpern gemessen, die mit einer Peroxidase gekoppelt waren. Die Substratumsetzung wurde bei 450 nm gemessen.

Parallel zu den beschriebenen BrdU Messungen mit FKS als Stimulus wurden Versuchsansätze durchgeführt, bei denen IL-1 als Proliferationsstimulus verwendet wurde. IL-1 gilt als Entzündungsmediator, aber auch als Proliferationsstimulus. Da es im Rahmen der Restenose sowohl zu mitogen-, als auch Entzündungs-initiiertes Proliferation kommt, wurde IL-1 in diesem Experiment untersucht. Die Stimulation erfolgte mit einer IL-1 Konzentration von 5 ng/μl. Um die Wirkung von IL-1 zu zeigen, wurden die Zellen vor dem experimentellen Ansatz mit 0 % FKS gewaschen und sämtliche weiter genutzten Medien ohne Zusatz von FKS verwendet. Somit wurde eine mögliche Stimulation oder Wechselwirkung durch FKS vermieden. In Abbildung 10 ist dargestellt, dass IL-1 stimulierte Zellen 1,8 Mal mehr BrdU einbaue als unstimulierte Zellen. Die mit Dolastatin behandelten Zellen zeigen auch hier einen verringerten BrdU-Einbau. So wird die Proliferation bei den mit IL-1 stimulierten Zellen auf 14,6 % und die Proliferation unstimulierter Zellen auf 62,2 % der jeweiligen Ansätze ohne Dolastatin reduziert.



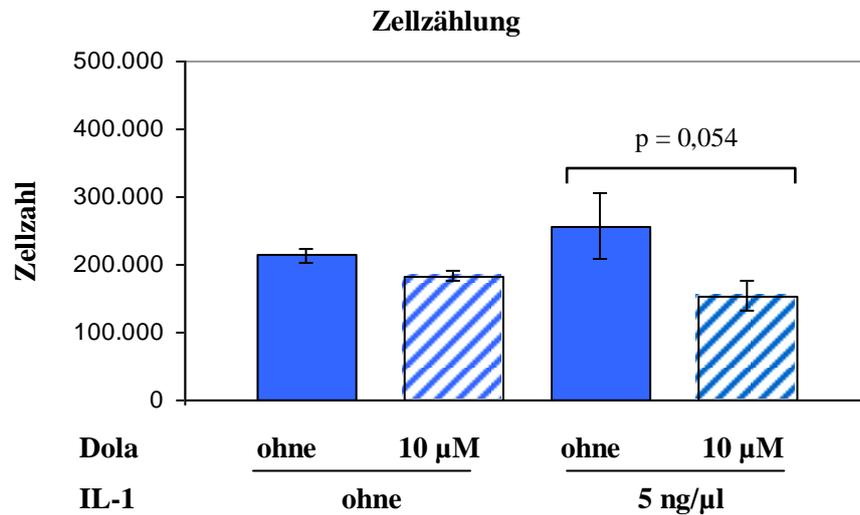
**Abbildung 10. IL-1 stimulierte, Dolastatinbehandelte Zellen zeigen geringeren BrdU-Einbau.** Die GMZ wurden in 96-Lochplatten eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>), nach 24 Stunden mit serumfreien Medium gewaschen und weitere 48 Stunden mit 0% FKS inkubiert. Nachdem die Zellen unter die experimentellen Bedingungen gebracht (0 % FKS und 5 ng/μl IL-1 jeweils ohne und mit 10 μM Dolastatin) und mit BrdU versehen wurden, erfolgte nach 24 Stunden die colorimetrische BrdU-Messung. Der BrdU Einbau wurde mit Anti-BrdU Antikörpern gemessen, die mit einer Peroxidase gekoppelt waren. Die Substratumsetzung wurde bei 450 nm gemessen.

Um die Ergebnisse der BrdU Messungen zu bestätigen und um zu sehen in wie weit sich der verringerte BrdU-Einbau in der Reduktion der Zellzahl widerspiegelt, wurden parallel zu zwei BrdU-Versuchen Zellzählungen durchgeführt. In der in Abbildung 11 dargestellten Zellzählung kann eine Zellzahlzunahme unter Stimulierung nachgewiesen werden. In der Kontrolle (0,1 % FKS) werden 238.000 Zellen gezählt und im Ansatz mit 10 % FKS werden 341.000 Zellen gezählt. Dies entspricht einer Zellzahlzunahme um den Faktor 1,43. Die Zellzahl in den mit Dolastatin behandelten Proben ist in dem FKS stimulierten Ansatz auf 60 % und in der mit 0,1 % FKS behandelten Kulturen auf 75 % gesenkt.



**Abbildung 11. Dolastatin senkt die Zellzahl von FKS - stimulierten und -unstimulierten Kulturen.** In 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen wurden 250.000 GMZ eingesät und 24 Stunden inkubiert. Nach der Serumverarmung (48 Stunden) wurden die Zellen unter die experimentellen Bedingungen gebracht (0,1 % FKS und 10 % FKS; ohne und mit 10 µM Dolastatin). Nach 96 Stunden erfolgte die Zellzählung mit Neubauer Zählkammer.

Die Abbildung 12 zeigt, dass IL-1 die Zellzahl geringfügig (1,2-fach) steigert. Wie bei der FKS-Stimulierung werden auch nach IL-1 Stimulierung in den mit Dolastatin behandelten Ansätzen geringere Zellzahlen vorgefunden. Im IL-1-Ansatz entspricht das einer Reduktion auf 60 %, im 0 % FKS Ansatz entspricht das einer Reduktion auf 86 %. Zusammenfassend bestätigen die Experimente mit 2 Techniken den proliferationshemmenden Einfluss des Dolastatins auf die Gefäßmuskelzelle.

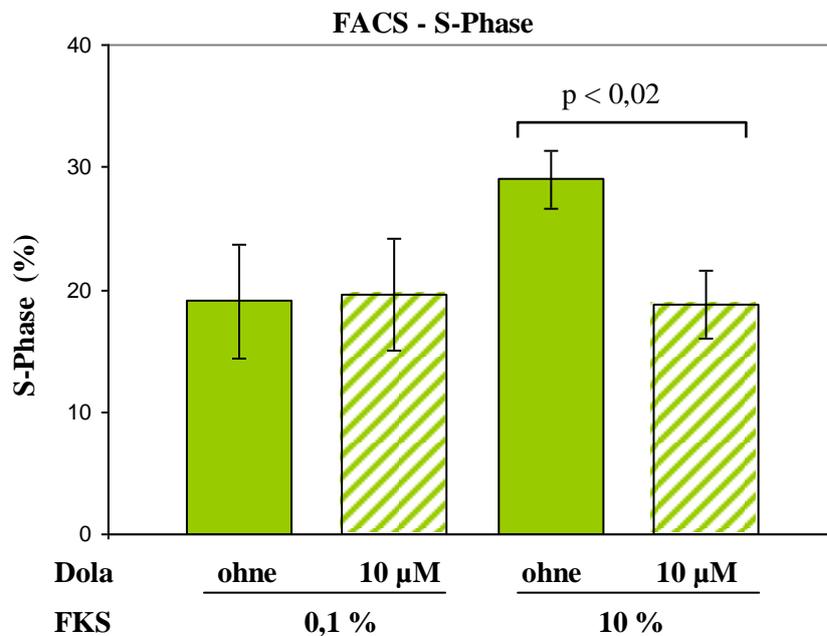


**Abbildung 12. Dolastatin senkt Zellzahl von IL-1-stimulierten und -unstimulierten GMZ.** In 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen wurden 250.000 GMZ eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>) und 24 Stunden inkubiert. Nachdem das Serum ausgewaschen und 48 Stunden inkubiert wurde, wurden die Zellen in die experimentellen Bedingungen gebracht (0 % FKS und 5 ng/µl IL-1 jeweils ohne und mit 10 µM Dolastatin). Nach 96 Stunden erfolgte die Zellzählung mit Neubauer Zählkammer.

#### 4.2.2 Dolastatin reduziert die Zahl der Zellen, die sich in der S-Phase befinden

Die S-Phase ist die Phase im Zellzyklus, in der sich die Zelle auf die bevorstehende Zellteilung vorbereitet. Mit der Bestimmung des Anteils der sich in der S-Phase befindlichen Zellen des Gesamtzellverbandes lässt sich eine Aussage über die Proliferationsaktivität treffen.

In der S-Phase-Analyse im FACS kann gezeigt werden, dass sich in FKS-stimulierten Zellkulturen erwartungsgemäß mehr Zellen in der S-Phase befinden als in unstimulierten Kulturen. Beträgt der Anteil von Zellen, die sich in der S-Phase befinden, unter 0,1 % FKS noch 19,03 %, so ist der Anteil unter Stimulation auf 28,98 % erhöht, was einer Erhöhung um den Faktor 1,52 entspricht. Dolastatin reduziert signifikant die Zahl der Zellen, die sich in der S-Phase befinden auf den Kontrollwert (Abbildung 13). Unstimulierte Zellkulturen, welche mit Dolastatin versehen sind, zeigen keine Veränderung der Zahl der Zellen, in der S-Phase.

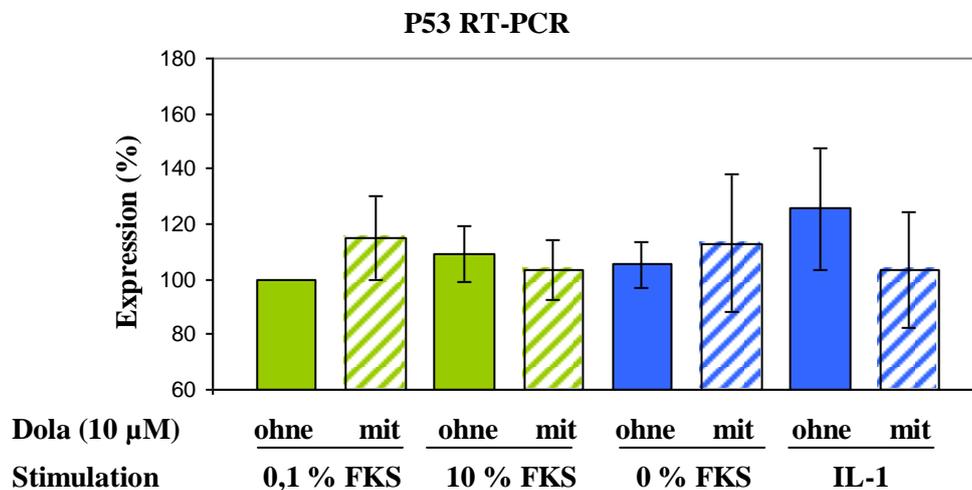


**Abbildung 13. In stimulierte Zellen reduziert Dolastatin die Zahl der Zellen, die sich in der S-Phase befinden.** Die GMZ wurden in 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>), nach 24 Stunden serumverarmt und weitere 48 Stunden inkubiert. Nachdem die Zellen unter die experimentellen Bedingungen gebracht wurden (0,1 % FKS und 10 % FKS; jeweils ohne und mit 10 µM Dolastatin), erfolgte nach 24 Stunden die Fixierung der Zellen und die Analyse im FACS.

### 4.2.3 Dolastatin reguliert die P53- und Cortactin-mRNA-Exprimierung nicht

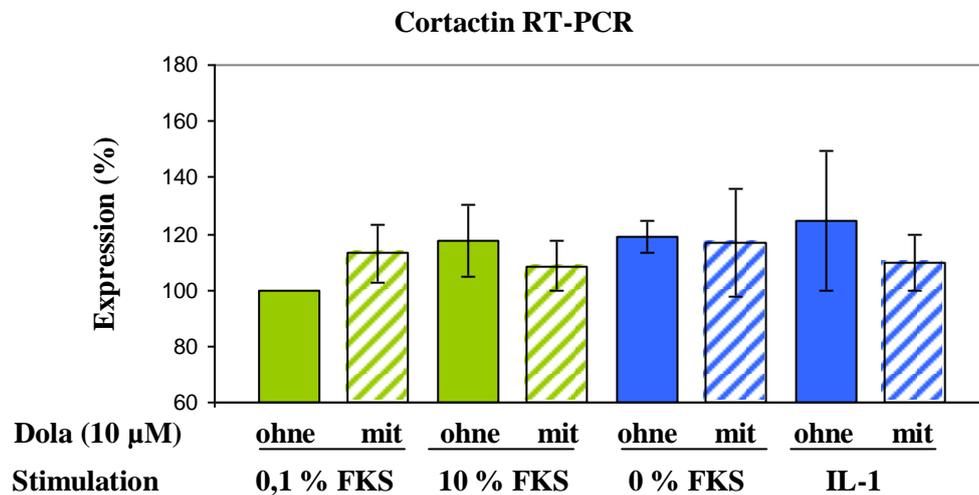
P53 hat wichtige Aufgaben im Rahmen der Kontrolle der Zellproliferation. Es sorgt für einen Zellzyklusarrest, wenn es zu größeren DNA-Schäden gekommen ist, und kann die Apoptose einleiten. Den Zellzyklusarrest bewirkt P53 vor allem über eine Induktion von P21. Die Apoptose wird hauptsächlich durch die Induktion des BAX-Gens eingeleitet.

In den durchgeführten Messungen kann keine Regulation von P53 auf mRNA-Ebene gemessen werden. In allen Zellkulturen wird P53 exprimiert. Eine Mehr oder Minderexpression im Vergleich der Proben untereinander kann nicht festgestellt werden. In Abbildung 14 sind die Mittelwerte der RT-PCR Daten der Experimente dargestellt.



**Abbildung 14: Keine Regulation von P53-mRNA.** Die GMZ wurden in 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>) und nach 24 Stunden serumverarmt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die GMZ unter die experimentelle Bedingungen gebracht. Nach 4 Stunden erfolgte die RNA-Ernte, reverse Transkription und P53 RT-PCR. Die Auswertung der PCR erfolgte durch Auftrennung der Banden im Agarosegel (1,25 %) sowie der densitometrischen Bestimmung der Bandengrauwerte mit „Imagequant“.

Cortactin ist für die Polymerisation und Stabilisierung des Aktins mitverantwortlich und spielt somit eine Rolle für die Zellvermehrung außerhalb des Zellzyklus. In den durchgeführten Experimenten kann keine signifikante Regulierung der Cortactin-mRNA gemessen werden (Abbildung 15). Alle Zellkulturen zeigen annähernd gleiche Mengen von Cortactin-Expression.



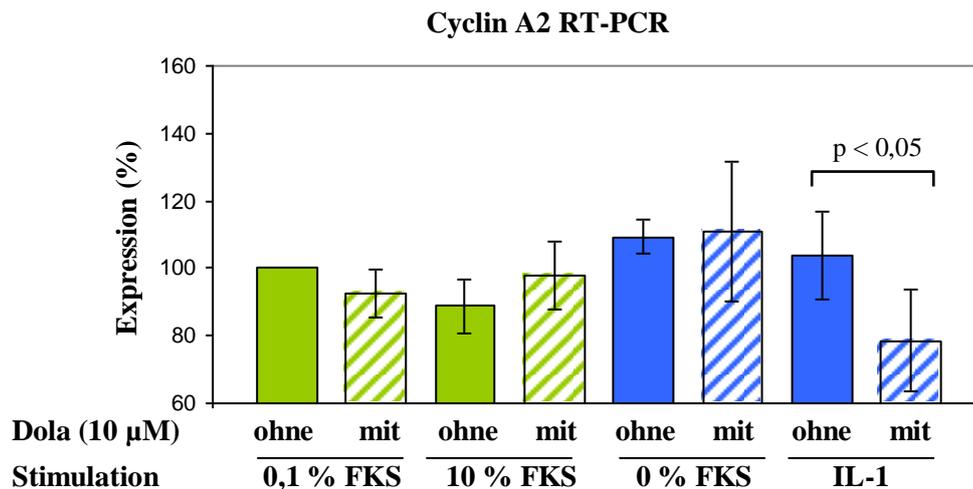
**Abbildung 15: Keine Regulation von Cortactin mRNA.** Die GMZ wurden in 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>) und nach 24 Stunden serumverarmt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die GMZ unter die experimentelle Bedingungen gebracht. Nach 4 Stunden erfolgte die RNA-Ernte, reverse Transkription und Cortactin RT-PCR. Die Auswertung der PCR erfolgte durch Auftrennung der Banden im Agarosegel (1,25 %) sowie der densitometrischen Bestimmung der Bandengrauwerte mit „Imagequant“.

#### 4.2.4 Dolastatin reduziert die Cyclin A2-mRNA in IL-1-stimulierten Kulturen

Cyclin A2 bildet mit der CDK2 den Cyclin-A/CDK2-Komplex und bewirkt ein Voranschreiten des Zellzyklus während der S-Phase sowie über die Aktivierung von Cyclin B ein Überschreiten des G2/M-Kontrollpunktes.

Bei allen Bedingungen wird eine Expression von Cyclin A2 gemessen. Bei FKS stimulierten Zellen unter Dolastatin wird keine Expressionsveränderung im Sinne einer Herauf- oder Herunterregulation gemessen. Ebenso zeigt sich kein eindeutiges Expressionsmuster zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen.

In den durchgeführten Untersuchungen bei IL-1 plus Dolastatin kann jedoch eine Regulation gemessen werden. So ist in allen Experimenten die Cyclin A2 mRNA-Expression unter Dolastatin im Vergleich zu den IL-1 Proben signifikant verringert. Dies entspricht im Mittel einer Minderexpression um den Faktor 1,32. (Abbildung 16).

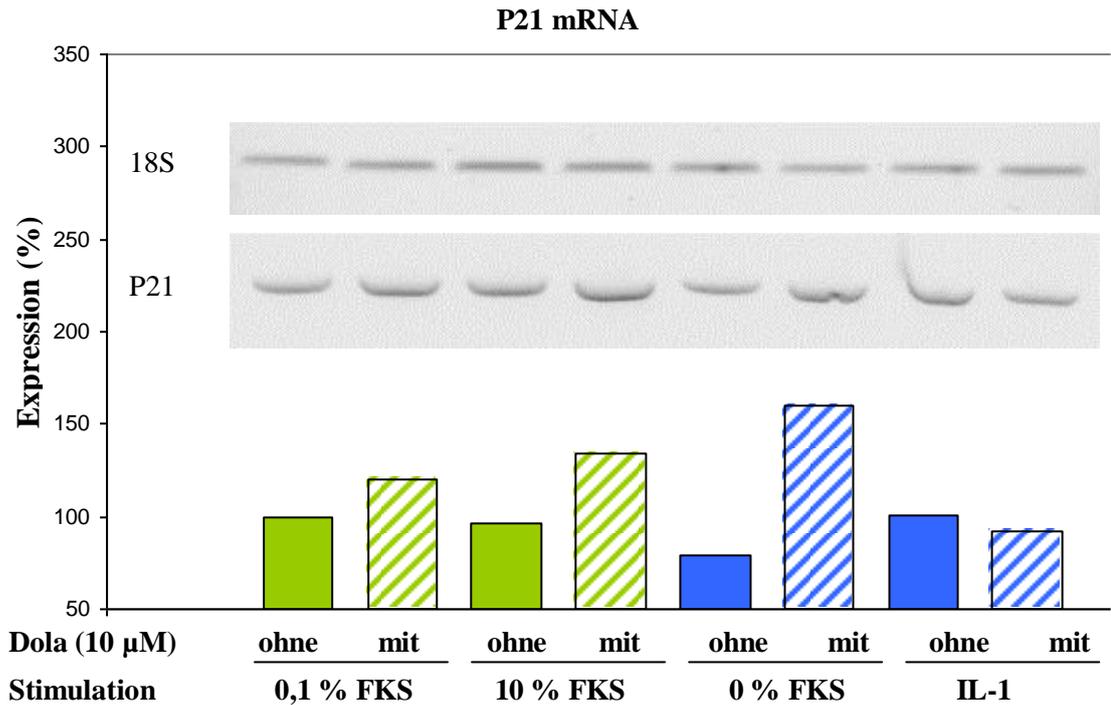


**Abbildung 16. Dolastatin reduziert die Cyclin A2 mRNA Expression in IL-1-stimulierten Zellen.** Die GMZ wurden in 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>) und nach 24 Stunden serumverarmt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die GMZ in die experimentelle Bedingungen gebracht. Nach 4 Stunden erfolgte die RNA-Ernte, reverse Transkription und Cyclin A2-RT-PCR. Die Auswertung der PCR erfolgte durch Auftrennung der Banden im Agarosegel.

#### 4.2.5 P21-mRNA wird unter Dolastatin vermehrt exprimiert

Da P21 eine Schlüsselrolle in der Inhibition der Zellproliferation spielt, indem es bereits zu Beginn des Zellzyklus den Cyclin D-CDK4/6-Komplex inhibiert, wurde auch die Expressierung dieses Gen untersucht. Die in den BrdU-Messungen und Zellzählungen nachgewiesene Proliferationsreduktion durch Dolastatin, könnte möglicherweise mit einer P21-Heraufregulation einhergehen.

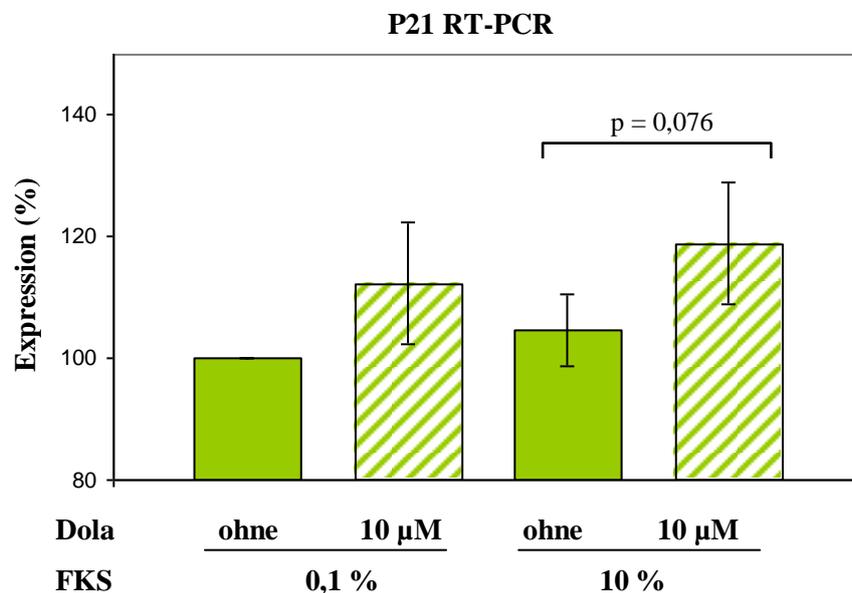
In Abbildung 17 sind stellvertretend für die P21 RT-PCR-Ergebnisse ein Gel mit P21 mRNA, die dazugehörige 18S rRNA sowie die mit „ImageQuant“ densitometrisch bestimmten Grauwerte der PCR-Banden dargestellt. In der Auswertung des Ergebnisses sieht man, dass die Schwankungen der 18 S rRNA minimal sind und man so von gleichen RNA-Mengen zu Beginn der reversen Transkription ausgehen kann. Bei den P21-Banden ist zu erkennen, dass unter Dolastatin die Banden bei 0 %, 0,1 % und 10 % FKS stärker sind als ihre Kontrollen. Die Bande bei IL-1 plus Dolastatin ist etwas schwächer als ihre Kontrolle. In der densitometrischen Auswertung und der Relativierung zu 18S (Optische Dichte von P21 dividiert durch die optische Dichte von 18S multipliziert mit 100:  $OD_{P21}/OD_{18S} \times 100$ ) bestätigt sich der optische Eindruck einer Mehrexpression von P21 unter 10 %-iger FKS Stimulation sowie den Kontrollen (0 % und 0,1 % FKS). Unter Stimulation mit IL-1 und Dolastatin ist die Expression von P21 annähernd gleich.



**Abbildung 17. Dolastatin behandelte Ansätze zeigen stärkere Banden bei 0,1 % FKS, 10 % FKS und 0 % FKS jedoch nicht bei IL-1.** Die GMZ wurden in 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>) und nach 24 Stunden serumverarmt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die GMZ in die experimentelle Bedingungen gebracht. Nach 4 Stunden erfolgte die RNA-Eluierung, reverse Transkription und P21- und 18S-RNA-RT-PCR. Die Auswertung der PCR erfolgte durch Auftrennung der Banden im Agarosegel (1,25 %) sowie der densitometrischen Bestimmung der Bandengrauwerte mit „Imagequant“.

Um das Ergebnis des Experimentes zu bestätigen, wurden weitere Versuche durchgeführt. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Bei den unstimulierten Zellen, die mit Dolastatin behandelt wurden, zeigen sich größere interindividuelle Schwankungen. In 4 von 8 Experimenten wird bei den mit Dolastatin behandelten Proben mehr P21 mRNA, in drei Experimenten weniger und einmal gleich viel mRNA exprimiert im Vergleich zu den unstimulierten Proben. Im Mittel wird so eine Mehrexpression von 1,12 erreicht.

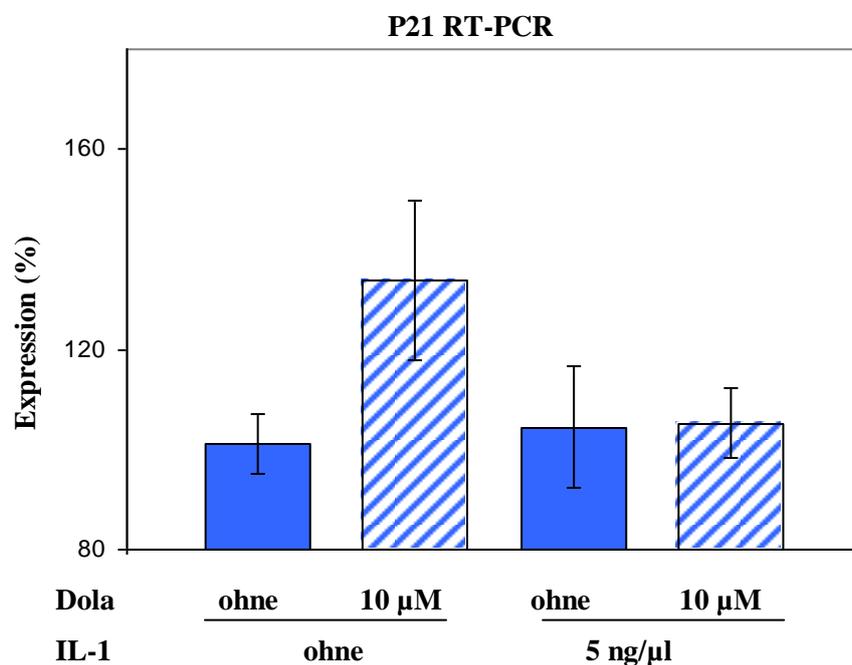
Bei den mit FKS stimulierten Zellen ist in 7 von 8 Experimenten eine P21 Heraufregulation unter Dolastatin nachzuweisen. Einmal zeigen sich geringere P21 mRNA Mengen. Es zeigt sich bei einem p Wert von 0,076 ein Trend einer Mehrregulation um den Faktor 1,14.



**Abbildung 18. Die P21-mRNA-Expression bei stimulierten Zellen unter Dolastatin ist tendenziell heraufreguliert. Bei unstimulierten Zellen ist P21-mRNA ebenfalls heraufreguliert, jedoch bei größeren Schwankungen.** Die GMZ wurden in 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>), nach 24 Stunden wurden die Zellen serumverarmt, 48 Stunden inkubiert und anschließend unter die experimentelle Bedingungen gebracht. Nach 4 Stunden erfolgte die RNA-Eluierung, reverse Transkription und P21 RT-PCR. Die Auswertung der PCR erfolgte durch Auftrennung der Banden im Agarosegel (1,25 %).

Bei den Experimenten, bei denen IL-1 als Stimulus verwendet wurde, zeigt sich bei den unstimulierten Zellen, welche mit Dolastatin behandelt wurden, in 4 von 5 Experimenten eine Mehrexpression von P21 mRNA. Dies entspricht einer mittleren Mehrexpression um den Faktor 1,33.

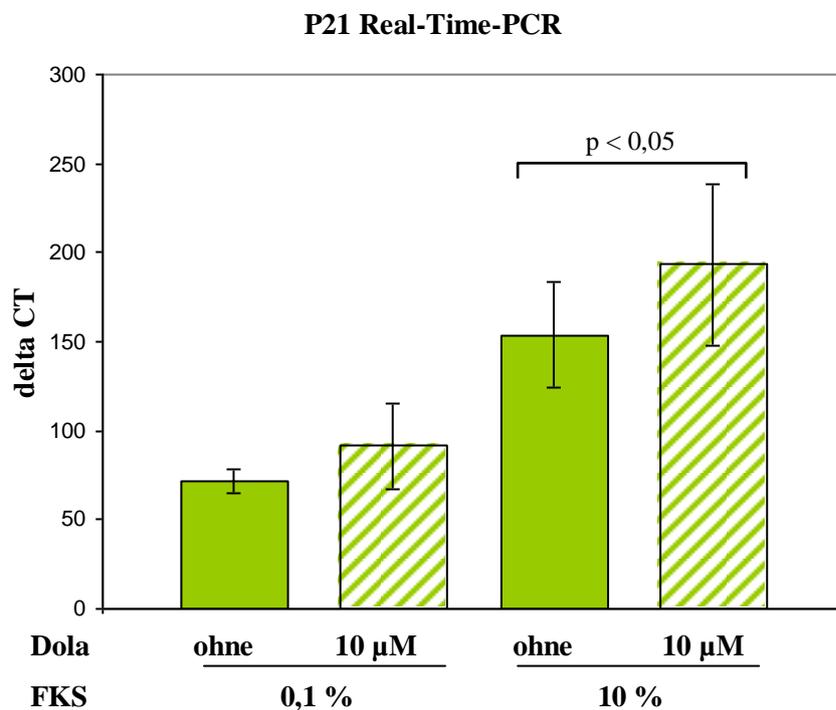
Bei den Proben, welche mit IL-1 stimuliert und mit Dolastatin versehen wurden, zeigt sich im Gegensatz zu den mit FKS stimulierten Zellen kein Trend einer P21-mRNA-Heraufregulation. Die Werte bewegen sich im Bereich der P21-mRNA-Expression der IL-1-stimulierten Zellen ohne Dolastatin. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19. Dolastatin erhöht P21 mRNA Expression bei unstimulierten Zellen, jedoch nicht bei IL-1 stimulierten.** Die GMZ wurden in 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>), nach 24 Stunden wurden die Zellen serumverarmt, 48 Stunden inkubiert und anschließend unter die experimentelle Bedingungen gebracht. Nach 4 Stunden erfolgte die RNA-Eluierung, reverse Transkription und P21-RT-PCR. Die Auswertung der PCR erfolgte durch Auftrennung der Banden im Agarosegel (1,25 %).

Da die RT-PCR Hinweise auf eine Heraufregulation von P21 unter Dolastatin und FKS-Stimulation geliefert hat, wurde zur Quantifizierung eine real time PCR durchgeführt. Hierzu wurden die cDNAs der Ansätze mit 0,1 % FKS ohne und mit Dolastatin sowie 10 % FKS ohne und mit Dolastatin verwendet.

Unstimulierte Proben zeigen unter Dolastatin im Mittel eine Heraufregulation jedoch größere interindividuelle Schwankungen. Die Heraufregulation beträgt im Mittel Faktor 1,28. Bei den mit 10 % FKS stimulierten Zellen ist in allen 5 Experimenten die P21 mRNA vermehrt exprimiert. Es ergibt sich eine statistisch signifikante Mehrexpression um den Faktor 1,26 (Abbildung 20).



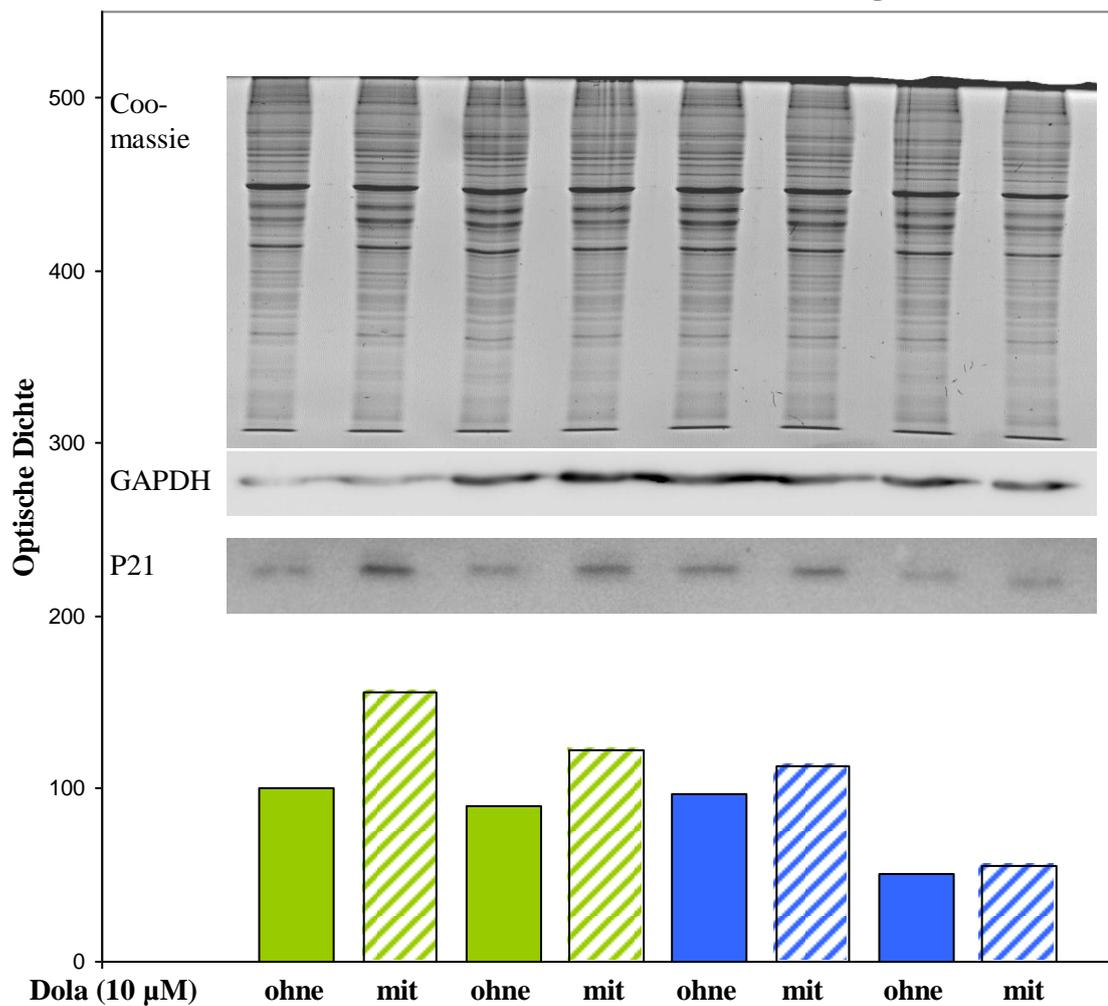
**Abbildung 20. P21 mRNA bei stimulierten Zellen unter Dolastatin heraufreguliert** Die GMZ wurden in 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>), nach 24 Stunden wurden die Zellen serumverarmt, 48 Stunden inkubiert und anschließend in die experimentelle Bedingungen gebracht. Nach 4 Stunden erfolgte die RNA-Ernte, reverse Transkription und P21 Real-Time PCR.

#### **4.2.6 P21-Protein wird unter Dolastatin bei 0 %, 0,1 % und 10 % FKS vermehrt exprimiert**

Die spezifische Proteinmessung mittels Western Blot wurde durchgeführt, um eine Auswirkung der RNA-Expressionsveränderung auf die Proteinexpression nachzuweisen. Bei stimulierten Zellen, die mit Dolastatin behandelt worden waren, wurde eine geringe, jedoch nicht signifikante Heraufregulation von P21-mRNA gemessen. Auch unter 0 % und 0,1 % FKS gibt es in den RT-PCR, sowie Real-Time PCR-Messungen Hinweise auf eine Heraufregulation. Da P21 die Zellproliferation inhibiert und eine Proliferationsinhibition bereits gezeigt wurde (BrdU-Messung, Zellzählung, FACS), wurde vermutet, dass P21 Protein vermehrt exprimiert wird. Dies wurde im Westernblot geprüft.

In Abbildung 22 sind stellvertretend für den P21-Proteinnachweis der Western Blot mit P21-Antikörper und dessen densitometrischer Auswertung sowie der dazugehörige GAPDH Western Blot und die Coomassiefärbung dargestellt. Coomassiefärbung und GAPDH Western Blot wurden zur Kontrolle angefertigt, um sicherzustellen, dass auf jede Bahn annähernd gleiche Mengen Protein aufgetragen wurden. Die Coomassiefärbung zeigt eine gleichmäßige Proteinverteilung. Der GAPDH Westernblot zeigt zwar unterschiedlich starke Banden, jedoch sind die Banden der Stimuli ohne und mit Dolastatin vergleichbar stark. Der P21-Westernblot zeigt, dass P21 unter Dolastatin vermehrt exprimiert wird mit Ausnahme der IL-1-stimulierten Zellkultur, bei der P21 gleich stark exprimiert wird.

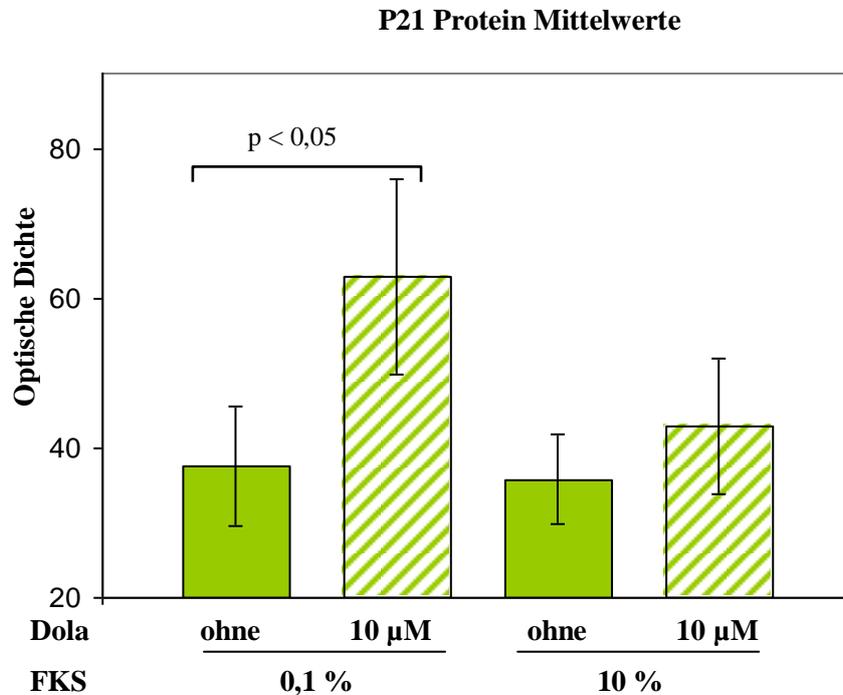
### P21 Western Blot und Coomassiefärbung



**Abbildung 21: P21-Protein-Expression der mit Dola behandelten Proben erhöht. bei 0,1 % FKS, 10 % FKS und 0 % FKS nicht jedoch bei IL-1.** Die GMZ wurden in 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>) und inkubiert (24 Stunden). Danach wurden sie serumverarmt (48 Stunden). Der experimentelle Ansatz erfolgte für 24 Stunden. Der P21- und GAPDH Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot. Die Gesamtproteinfärbung wurde mit der Coomassiefärbung durchgeführt.

Um das Ergebnis des Experimentes zu bestätigen, wurden weitere Versuche durchgeführt. In den Versuchen, bei denen FKS als Stimulus verwendet wurde, zeigt sich in der Kontrollgruppe (0,1 % FKS) bei den mit Dolastatin behandelten Proben in allen 5 Fällen eine Mehrexpression von P21 Protein. Dies entspricht einer mittleren Mehrexpression um den Faktor 1,67. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Zum Vergleich dazu sind die Daten der RNA-Versuche in Tabelle 4 aufgeführt. Eine grenzwertig signifikante Heraufregulation von P21-

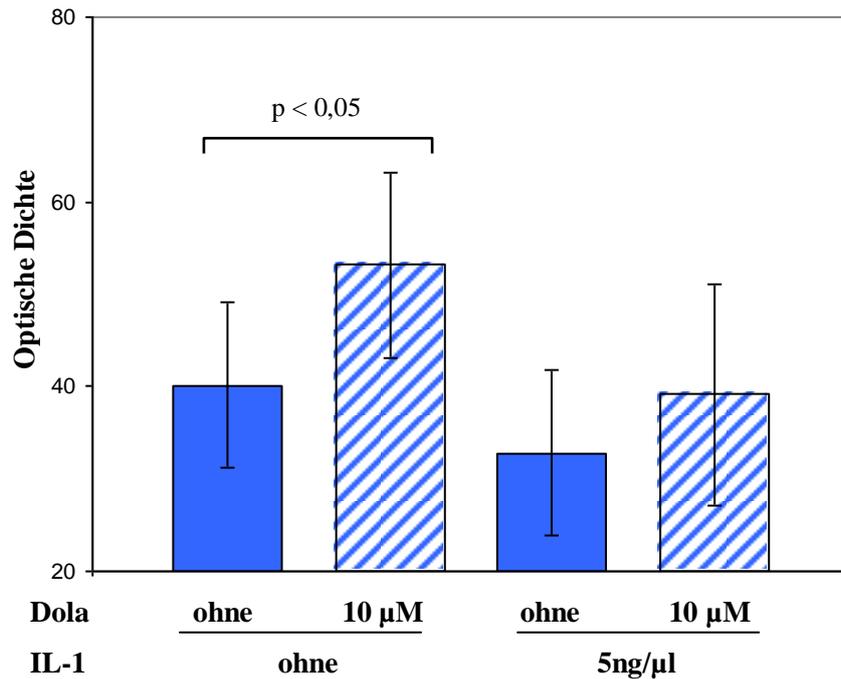
Protein unter den mit 10 % FKS stimulierten Proben unter Dolastatin kann in 4 von 5 Experimenten gezeigt werden. Bei einem Experiment wird weniger P21-Protein gemessen. Im Mittel ergibt dies eine Mehrexpression von P21 um den Faktor 1,2 (Abbildung 22). Zum Vergleich dazu die Daten der P21-mRNA-Mehrexpression in Tabelle 4.



**Abbildung 22. P21 Protein bei Dolastatin behandelten Proben erhöht.** Die GMZ wurden in 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>), inkubiert (24 Stunden) und serumverarmt (48 Stunden). Der experimentelle Ansatz erfolgte für 24 Stunden. Der P21 Proteinnachweis wurde mittels Western Blot durchgeführt.

Bei den Proben, bei denen IL-1 als Proliferationsstimulus verwendet wurde, wird bei den unstimulierten Zellen (0 % FKS) in allen 7 Versuchen eine erhöhte P21-Proteinexpression gemessen. Im Mittel ist P21 statistisch signifikant um den Faktor 1,32 erhöht (Abbildung 23). Diese Daten decken sich mit den Daten der RT-PCR, bei denen P21 im Mittel um den Faktor 1,33 erhöht ist (siehe Tabelle 4). Bei den mit IL-1 stimulierten Zellen, die mit Dolastatin behandelt wurden kann in 5 von 7 Versuchen eine erhöhte P21-Proteinexpression gemessen werden. Dies ergibt eine durchschnittliche Erhöhung von P21 um den Faktor 1,20.

**P21-Protein-Mittelwerte**



**Abbildung 23. P21-Protein bei Dolastatin behandelten Proben erhöht.** Die GMZ wurden in 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>), inkubiert (24 Stunden) und serumverarmt (48 Stunden). Der experimentelle Ansatz erfolgte für 24 Stunden. Der P21 Proteinnachweis wurde mittels Western Blot durchgeführt.

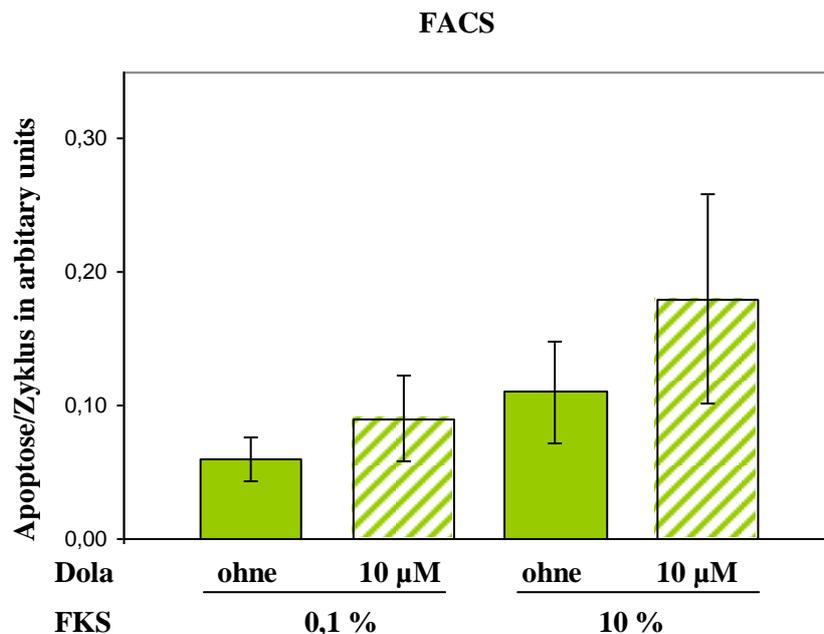
<b>Tabelle 4. Übersicht der P21-Mehrexpression unter Dolastatin</b>				
Messmethode	Bedingungen			
	0,1 % FKS	10 % FKS	0 % FKS	IL-1
RT-PCR	×1,12	×1,14 **	×1,33	×1,01
Real-Time	×1,28	×1,26 ***	/	/
Western Blot	×1,67 *	×1,20 **	×1,32 *	×1,20

- \* signifikant
- \*\* grenzwertig signifikant
- \*\*\* nur im Wilcoxon signifikant

#### 4.2.7 Dolastatin-behandelte Zellkulturen weisen vermehrt Apoptosefragmente auf

Im Rahmen der Zellzyklusanalyse im FACS können vor dem Peak der Zellen in der G1-Phase weitere Peaks auftreten. Diese Peaks erhielten aufgrund ihrer Lage vor den Peaks der G1-Phase Zellen den Namen Pre-G1-Peak. Sie zeigen die Signale heterogener Zellfragmente. Diese Zellfragmente entstehen durch Apoptose. Durch Auswertung der Pre-G1-Peaks kann man Aussagen zur Apoptoseaktivität der Zellen treffen.

Die Quantifizierung der Apoptose mittels Pre-G1-Peak-Messung zeigt eine tendenzielle Erhöhung der Apoptosefragmente unter 10 % FKS-Stimulation und unter Dolastatingabe. Unter Stimulation mit 10 % FKS steigt die Apoptoserate von 0,06 auf 0,11 (Faktor 1,83) im Vergleich mit 0,1 % FKS stimulierten Zellen. Dolastatin bewirkt eine Zunahme der Apoptoserate unter 0,1 % FKS um das 1,5 Fache auf 0,09 und unter 10 % FKS um das 1,64 Fache auf 0,18 (Abbildung 24).



**Abbildung 24. Apoptoserate erhöht bei dolastatinbehandelten Zellkulturen.** Die GMZ wurden in 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen eingesät (10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>), nach 24 Stunden serumverarmt und weitere 48 Stunden inkubiert. Nachdem die Zellen unter die experimentellen Bedingungen gebracht wurden (0,1 % FKS und 10 % FKS; jeweils ohne und mit 10 µM Dolastatin), erfolgte nach 24 Stunden die Fixierung der Zellen und die Analyse im FACS.

## **5 Diskussion**

Die Restenose der koronaren Herzkranzgefäße nach Ballondilatation stellt eine klinisch bedeutsame Reaktion der Gefäßwand dar. Die Restenose wird innerhalb des ersten halben Jahres nach Intervention in bis zu 40 % der Fälle beobachtet und muss gegebenenfalls erneut dilatiert werden (Bonzel et al., 2008). Um die Restenose zu verhindern, gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. Man verwendet einen Stent, mit oder ohne Beschichtung oder man appliziert lokal während der Dilatation ein Medikament, welches den Prozess der Restenose aufhält. In Kaninchenversuchen konnte durch die Applikation von Dolastatin die Restenose verhindert werden. Da die Restenose wesentlich durch die Proliferation von Gefäßmuskelzellen verursacht wird, wurden In-vitro-Versuche angeschlossen. Es wurde eine proliferationshemmende Wirkung von Dolastatin auf Kaninchen Gefäßmuskelzellen gezeigt. Hierbei wurden zunächst keine Hinweise auf Apoptose, oder Nekrose gefunden. Es schien daher möglich, dass Dolastatin Gene beeinflusst, die für die Proliferation wichtig sind. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Expression proliferationsrelevanter Gene humaner Gefäßmuskelzellen zu untersuchen.

### **5.1 Dolastatin hemmt die Proliferation von humanen Gefäßmuskelzellen**

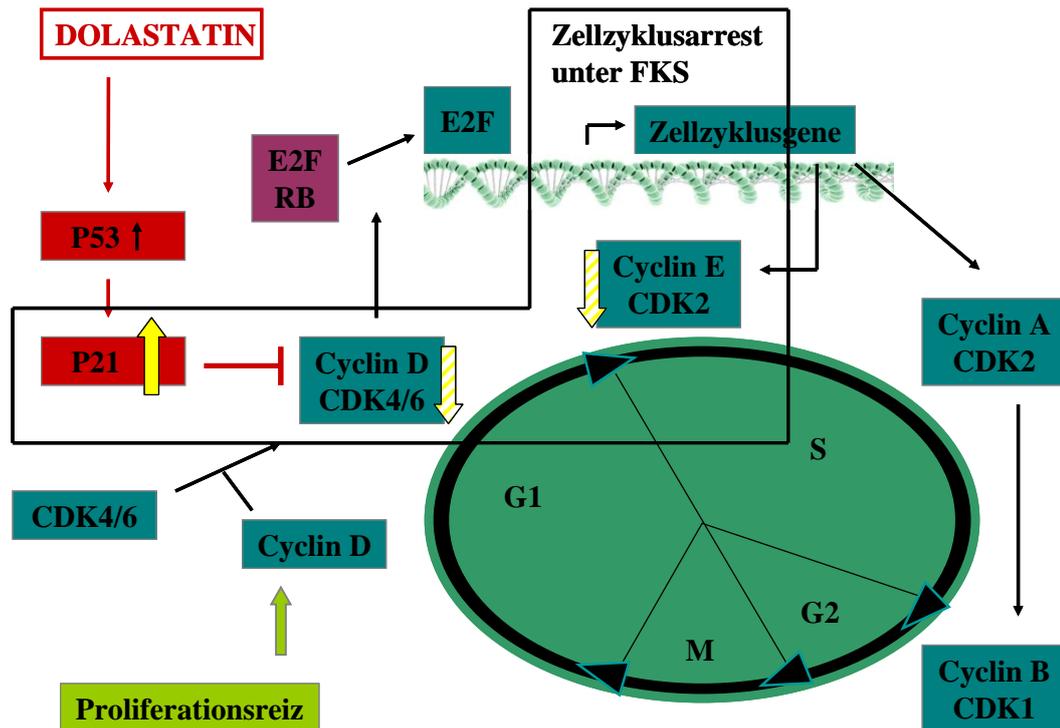
Zunächst wurden mit den Gefäßmuskelzellen Proliferationstests durchgeführt, in denen gezeigt wurde, dass die Proliferation sowohl FKS- als auch IL-1-stimulierter Kulturen durch 10  $\mu\text{M}$  Dolastatin inhibiert wurde. In BrdU-Messungen und Zellzählungen reduzierte Dolastatin die Messwerte unter den jeweiligen Kontrollwert. Dies war zunächst unerwartet. Ein Absinken der Proliferation unter den Wert der serumfreien, also nicht proliferierenden Zellen und auch eine Zellzahl, unterhalb der Ausgangszellzahl nicht proliferierender Zellen kann über eine alleinige Dolastatin induzierte Proliferationsinhibition nicht erklärt werden.

### **5.2 Die Rolle der untersuchten Gene**

Um die Wirkung von Dolastatin auf die Proliferation von Gefäßmuskelzellen zu zeigen, wurden die folgenden Gene untersucht: P21, P53, Cyclin A2 und Cortactin. Eine Veränderung der Expression dieser Gene könnte Hinweise auf eine Regulation des Zellzyklus durch Dolastatin unabhängig von Apoptose oder Nekrose geben.

### **5.2.1 Bei unstimulierten und mit FKS stimulierten Zellen kann die Proliferationsinhibition durch P21-Heraufregulation erklärt werden**

P21 inhibiert den Cyclin-D/CDK4/6-Komplex. Ohne ihn kann im Zellzyklus der G1/S Restriktionspunkt nicht überschritten werden. Die Zelle arretiert in der G1-Phase. P21 wird u. a. von P53 reguliert. Ein allgemeiner genomischer Stress (UV-,  $\gamma$ -Strahlung, genotoxische Stoffe, ungeplante Aktivierung von Onkogenen), verursacht durch mögliche zyto- oder genotoxische Eigenschaften von Dolastatin, könnte bereits zu einer P53 Erhöhung im Zytosol führen. Da P53 den P21-Transkriptionsfaktor aktiviert, folgt auf eine P53 Erhöhung eine vermehrte P21-Expression. Die Proliferation der Zelle wird gestoppt. (El-Deiry et al. 1994, Funaoka et al. 1997, Allan et al. 2000). In allen durchgeführten Experimenten, mit Ausnahme der IL-1-stimulierten Kulturen, wurde unter Dolastatin vermehrt P21-mRNA exprimiert. Die einzelnen Proben unterlagen größeren individuellen, als auch interindividuellen Schwankungen, auch konnte nicht in allen Untersuchungsreihen eine statistische Signifikanz ermittelt werden. In den PCR Untersuchungen zeigte sich in der RT-PCR eine grenzwertig signifikante Heraufregulation unter 10 % FKS ( $p=0,076$ ) und in der Real-Time PCR im Wilcoxon Test eine signifikante Heraufregulation ( $p < 0,05$ ). Im Westernblot wurden die PCR Ergebnisse bestätigt. Unter serumarmen und serumfreien (0,1 % FKS und 0 %) Bedingungen konnten nach Dolastatingabe sogar signifikant erhöhte P21-Mehrexpressionen nachgewiesen werden. Unter 10 % FKS wurde grenzwertig signifikant mehr P21 ( $P = 0,13$ ) gemessen. Eine P21-Heraufregulation wurde mehrfach mit Proliferationsinhibition und Zellzyklusarrest in Verbindung gebracht (Ishida et al., 1997; Hijama et al., 1998; Marra et al., 2000; Sitko et al., 2008, Guanghong et al., 2009). Die Kulturen, die mit Dolastatin inkubiert worden waren, wiesen stets eine Proliferationsinhibition auf (BrdU, Zellzählung). Die hier beobachtete Proliferationsinhibition durch Dolastatin lässt sich somit über einen P21-Anstieg durch erhöhte P21-mRNA- und folgender Protein-Expression erklären. Im Falle einer erhöhten P21 Expression ist davon auszugehen, dass der CyclinD/CDK4-Komplex durch P21 inhibiert wird. Der Zellzyklus wird unterbrochen, da aufgrund der nun fehlenden Aktivierung von E2F und folgender nicht stattfindender Aktivierung von Zellzyklusgenen (u. a. Cyclin E) der G1/S Restriktionspunkt nicht überschritten werden kann. Das Verhalten der Zelle bei einer P21-Expressionserhöhung, als Reaktion auf Dolastatin wird in Abbildung 25 dargestellt. Dies kann als eine spezifische Reaktion der Zelle auf Dolastatin interpretiert werden. Es bedarf hierfür jedoch weiterer Betrachtungen der in dieser Arbeit gemessenen Genexpressionsmuster. Denn eine alleinige P21-Erhöhung spricht nicht für eine spezifische Wirkung von Dolastatin. Dolastatin kann über mögliche genotoxische Eigenschaften zu einem verminderten P53-Abbau und somit Anstieg der P53-Konzentration im Zytosol führen und somit P21 induzieren, oder über einen unbekanntem Mechanismus P21 spezifisch stimulieren bzw. aktivieren.

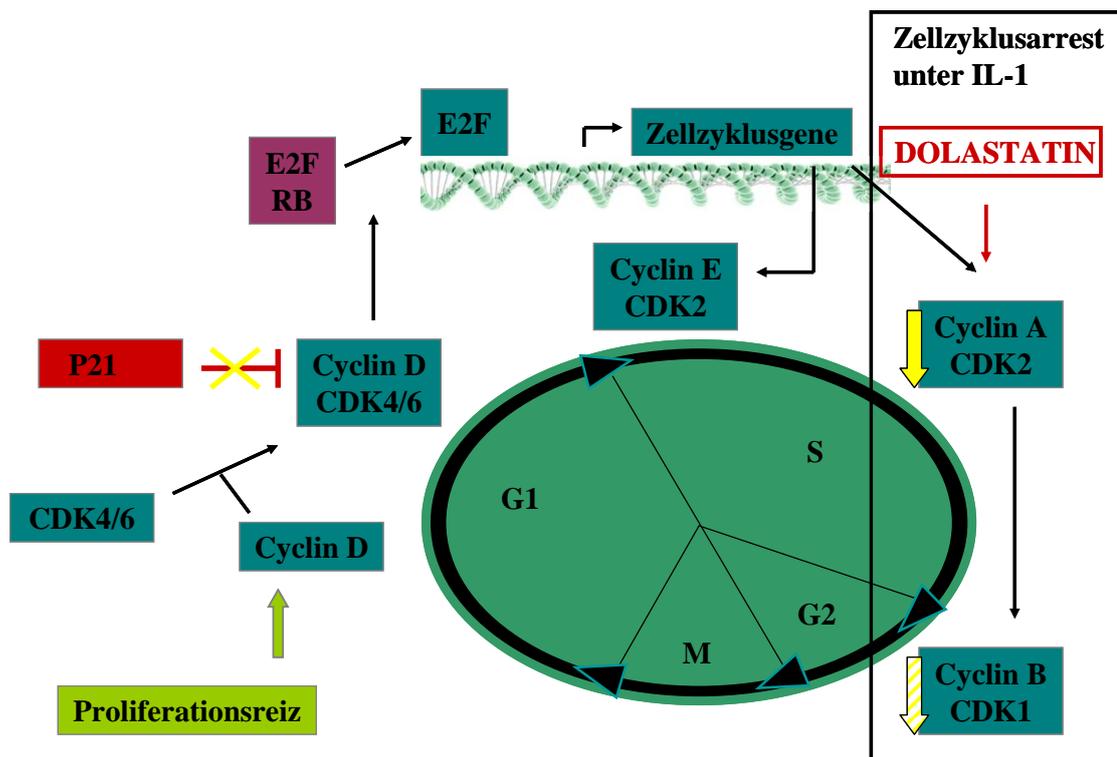


**Abbildung 25.** Unter FKS-Stimulation exprimiert die Zelle nach Dolastatingabe vermehrt P21. Darstellung des Zellzyklus mit Fokus auf die P21-relevanten Gene. Die schraffierten Pfeile stellen die vermutete Expressionstendenz bei erhöhter P21-Expression dar. Der Zellezyklus arretiert am G1/S-Restriktionspunkt.

### 5.2.2 Bei IL-1-stimulierten Zellen wird die Proliferationsinhibition nicht über eine erhöhte P21-Expression, sondern über eine verminderte Cyclin A2-Expression bewirkt

IL-1 stimulierte Kulturen unter Dolastatin exprimierten gleiche Mengen P21-mRNA und Protein, wie ihre Kontrollen. Obwohl im Westernblot im Mittel 1,2-mal mehr P21-Protein gemessen wurde, wird dies nicht als Mehrexpression gewertet, da dieser Mittelwert aufgrund eines einzelnen erhöhten Wertes entstanden ist und die allgemeine Tendenz ein Schwanken um den Kontrollwert aufzeigt. Da aber in den Zellzählungen und BrdU-Messungen die Proliferationsinhibition unter Dolastatin gezeigt wurde, muss es einen anderen Weg geben, mit denen der Proliferationsstop der Zelle erreicht wird. Eine mögliche Erklärung, warum die IL-1-stimulierten und dolastatinbehandelten Zellkulturen trotz fehlender P21-Heraufregulierung in ihrer Proliferation inhibiert werden, offenbart die Cyclin A2-mRNA. In den durchgeführten Experimenten war Cyclin A2 bei IL-1 und Dolastatin signifikant herunterreguliert. Bei allen anderen Bedingungen zeigt Cyclin A2 keine Tendenzen einer Regulation. Cyclin A2 spielt

eine wesentliche Rolle im Zellzyklus, indem es direkt für das Voranschreiten des Zellzyklus in der S-Phase sowie indirekt für das Überschreiten des G2/M-Kontrollpunktes verantwortlich ist (Geley et al., 2001; Song et al., 2008). Ist Cyclin A2 runterreguliert, kommt es zur Minderung der Zellproliferation (Farras et al. 2008) bzw. zum Zellzyklusarrest G2 (Badie et al., 2000, Smits und Medema, 2001, Ujiki et al., 2006). Eine verminderte Cyclin A2-Expression, wie sie im Rahmen dieser Arbeit gemessen worden ist, kann somit Erklärung für den Proliferationsinhibition ohne P21-Beteiligung bei den IL-1 stimulierten und mit Dolastatin versetzten Zellkulturen sein. In Abbildung 26 sind die beschriebenen Vorgänge unter IL-1-Stimulation und Dolastatingabe dargestellt.



**Abbildung 26.** Unter IL-1-Stimulation exprimiert die Zelle nach Dolastatingabe unverändert P21, reduziert jedoch die Cyclin A Expression. Darstellung des Zellzyklus mit Fokus auf die unter IL-1 gemessenen proliferationsrelevanten Gene. Die schraffierten Pfeile stellen die vermutete Expressionstendenz bei verminderter Cyclin A Expression dar. Der Zellzyklus arretiert am G2/M Restriktionspunkt

### 5.3 Die Rolle einer möglichen dolastatininduzierten Apoptose

In den FACS-Analysen, welche ergänzend zu den Proliferationstests durchgeführt wurden, konnte die Proliferationsinhibition durch Dolastatin bestätigt werden. Bei den Zellen, die mit 10 % FKS stimuliert und mit 10  $\mu$ M Dolastatin versehen worden waren, zeigten sich signifikant

weniger Zellen in der S-Phase als in den FKS-stimulierten Ansätzen, was für eine Reduktion der Proliferation spricht. Eine durch Dolastatin bedingte Mehrexpression von P21 würde einen Zellzyklusarrest in G1/S bewirken. Es wären weniger Zellen in der S-Phase zu erwarten. Dieses Ergebnis spiegelt sich in den gemessenen Zellzyklusanalysen wider.

Als weiteres Ergebnis wurden in den FACS-Analysen erhöhte pre-G1-Peaks in den Dolastatin-Kulturen gemessen. Eine Erhöhung dieser Pre-G1-Peaks spricht für eine vermehrte Messung von Zelltrümmern, welche die Apoptoserate der mit Dolastatin versehenen Ansätze widerspiegelt. Da in den Zellzählungen unter Dolastatin weniger Zellen gemessen wurden als initial eingesetzt und bei den BrdU-Messungen unter Dolastatin weniger BrdU gemessen als unter serumarmen/freien Bedingungen, muss von einer Wirkung von Dolastatin, die über die alleinige Proliferationsinhibition hinausgeht, ausgegangen werden. Die Apoptose scheint eine Reaktion der Zelle auf Dolastatin zu sein. In der Literatur finden sich Angaben bezüglich Apoptoseinduktion durch Dolastatin (Sato et al., 2007). Allerdings wurden erhöhte P21-Expressionen lediglich mit einem Zellzyklusarrest und nicht mit Apoptoseinduktion beschrieben (Nikulescu et al., 1998). Andere Quellen gehen sogar von einer Inhibition der P53-induzierten Apoptose durch P21 (Gorospe et al., 1997; Bissonnette und Hunting, 2001; Gartel und Tyner, 2002) bzw. von einem Anstieg der Apoptose bei inaktiviertem P21 und DNA-Schäden aus (Chattopadhyay et al., 2001). In Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte in Kaninchenzellen eine Apoptoseinduktion durch Dolastatin auch in höheren Konzentrationen nicht bestätigt werden. Nur eine Quelle zeigt, dass eine Überexpression von P21 zu Apoptose führt, jedoch nur bei immortalisierten Gefäßmuskelzellen (Kato et al., 2003). Die Apoptose ist möglicherweise Teil des Reaktionsvermögens der Zelle auf Dolastatin. Die aktuelle Datenlage deutet aber darauf hin, dass Dolastatin keine Apoptoseinduktion macht.

#### **5.4 Eine Expressionsveränderung von P53 spielt im Rahmen der Dolastatinexposition auf die GMZ keine Rolle**

In allen Zellkulturen konnte P53-mRNA nachgewiesen werden. Zwar zeigten sich individuelle und interindividuelle Schwankungen, eine Regulation im Sinne einer Heraufregulation unter Dolastatin wurde jedoch nicht beobachtet. Auch hier kann man davon ausgehen, dass P53 nicht durch eine Veränderung der Expression der mRNA reguliert wird. Da P21, wie oben beschrieben, jedoch heraufreguliert worden ist, liegt die Vermutung nahe, dass es im Zytosol zu einem Anstieg von P53-Protein gekommen sein könnte, da P21 durch P53 reguliert wird (Harris und Levine 2005, Shangary et al., 2008). Hier eine spezifische Wirkung von Dolastatin zu sehen, ist zunächst schwierig, da eine P53-Erhöhung auch unspezifisch durch Dolastatin verursacht werden könnte.

### **5.5. Dolastatin bewirkt keine Expressionsveränderung von Cortactin**

Cortactin bindet an den Arp 2/3-Komplex, der die Polymerisation von Aktin katalysiert und das Aktinfilament stabilisiert. Es ermöglicht somit Motilität, Kontraktilität, Signaltransduktion, Zellmembranpermeabilität und Zellteilung. Bei den durchgeführten Experimenten wurde Cortactin-mRNA sowohl in proliferierenden als auch in nicht-proliferierenden Zellkulturen gemessen. Dabei zeigten sich zwar individuelle Unterschiede, die jedoch keine Tendenz einer Regulation zeigten. Cortactin spielt somit bei den durchgeführten experimentellen Ansätzen für die Proliferation keine entscheidende Rolle oder wird möglicherweise nicht über eine veränderte Genaktivierung reguliert. In der Literatur wurden Veränderungen der Cortactin Aktivität durch Phosphorylierung beschrieben (Gunst, 2004; de Kimpe et al, 2009).

### **5.6 Charakterisierung von Dolastatin**

Wird die Gefäßmuskelzelle mit Dolastatin versetzt, erfolgt bei serumfreien Bedingungen die Erhöhung von P21. Wir bezeichnen deshalb die P21-Mehrexpression als das „primäre Verhalten“ der Gefäßmuskelzelle bei Dolastatingabe. Auch unter Serumstimulation reagiert die Zelle mittels P21-Heraufregulation. Bei IL-1-Stimulation erfolgt jedoch keine P21-Heraufregulation, sondern eine Cyclin A2-Herabregulation. P21 zeigt ein konstantes Expressionsverhalten. Dies bezeichnen wir als das „sekundäre Verhalten“ der Gefäßmuskelzelle auf Dolastatin. Da in den durchgeführten Untersuchungen zwei Wege eines Proliferationsstops aufgezeigt werden konnten, muss davon ausgegangen werden, dass sich die Zelle mit Dolastatin spezifisch auseinandersetzt. Wenn der Anstieg von P21 unter den serumfreien und serumstimulierten Bedingungen eine unspezifische Reaktion der Zelle auf Dolastatin wäre, würde man äquivalent dazu auch unter IL-1 plus Dolastatin eine erhöhte P21-Expression erwarten. Da dies jedoch nicht der Fall war, lässt dies folgende Interpretation zu:

Die Proliferationsinhibition von Dolastatin mittels Genregulation ist abhängig von weiteren, dem Medium zugesetzten Mediatoren. IL-1 könnte möglicherweise einer Heraufregulation von P21 durch Dolastatin entgegenwirken. Der genaue Mechanismus ist aktuell nicht bekannt. Nathe et al. beschrieben in GMZ eine Inaktivierung der P21 Expression durch IL-1 $\beta$ , welche zuvor durch PDGF hervorgerufen wurde (Nathe et al. 2002). In den Versuchen wurde gemischtes Medium mit PDGF verwendet. Es ist auch möglich, dass es zu einer fehlenden P53-Anreicherung im Zytosol gekommen ist, woraufhin eine P21-Mehrexpression ausbleibt. Da in den IL-1-Kulturen keine Mehrexpression von P21 gemessen wurde, muss von einer Inhibition der P21-Mehrexpression durch IL-1 ausgegangen werden. Die Zelle ist gezwungen ihren angestrebten

Proliferationsstopp über andere Wege zu bewerkstelligen. Mittels Cyclin A2-Minderexpression kann die Zelle ihren Zellzyklus am letzten Kontrollpunkt vor der Mitose, dem G2/M-Restriktionspunkt anhalten und somit ihre Zellteilung und Proliferation verhindern. Die gemessenen Cyclin A2-Daten bestätigen, dass die Zelle diesen „sekundären Weg“ der Proliferationsinhibition eingeschlagen hat.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zelle in Gegenwart von Dolastatin immer noch das Vermögen besitzt, ihren Zellzyklus zu regulieren, wenn auch nur im Sinne eines Zellzyklusarrestes. Das Wirkprofil von Dolastatin wird deshalb als spezifisch angenommen.

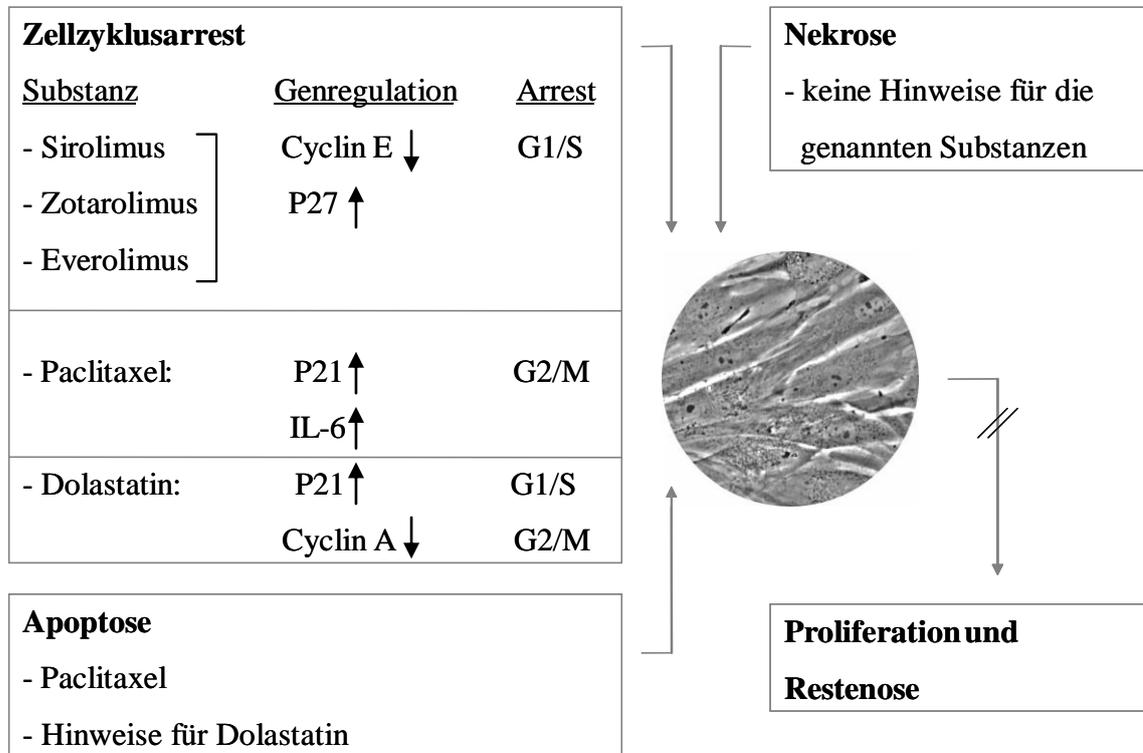
## **5.7 Klinischer Ausblick**

Aktuell (Stand 2008) werden in Deutschland 4 Substanzen, die zur Beschichtung von koronaren Stents verwendet werden, von der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie empfohlen: Sirolimus, Zotarolimus, Everolimus und Paclitaxel (Silber et al., 2008). Sirolimus, ein Immunsuppressivum mit antiproliferativer Wirkung, wirkt auf molekulargenetischer Ebene u. a. über einen verminderten P27-Abbau und bewirkt einen Zellzyklusarrest in G1/S (Sehgal, 1995, Dichtl et al., 2006). Zotarolimus ist ein halbsynthetischen Derivat von Sirolimus. Es wurde für die Verwendung in beschichteten Stents entwickelt. Zotarolimus bewirkt in den Zellen eine vermehrte P27 Expression. Der Zellzyklusarrest findet am G1/S-Restriktionspunkt statt (Burke et al., 2006, Garcia-Touchard et al. 2006). Everolimus, ebenfalls ein Derivat des Sirolimus zeigt molekulargenetisch gleiche Eigenschaften. Der G1/S-Zellzyklusarrest erfolgt über einen verminderten Abbau von P27 (Ferri et al., 2008). Paclitaxel ist ein Zytostatikum. Es verhindert den Abbau der Mikrotubuli. Molekulargenetisch induzierte Paclitaxel eine vermehrte Apoptoserate sowie eine erhöhte Expression von Il-6 und P21. Der Zellzyklus wird im G2/M-Restriktionspunkt arretiert (Wiskirchen et. al., 2004, Wang et al., 2006 Heliez et al., 2003). Eine zusammenfassende Darstellung findet sich in Abbildung 27.

Mit Paclitaxel werden bereits klinische Studien durchgeführt, bei denen Paclitaxel während der Ballondilatation freigesetzt wird. Anwendungsgebiete sind hierbei In-Stentrestenosen, kleine Koronargefäße und Koronar bifurkationen (Scheller et al., 2006, Banning und Lim, 2010).

Das in dieser Arbeit untersuchte Zytostatikum Dolastatin zeigt ähnliche Eigenschaften wie die bereits verwendeten Substanzen. Dolastatin bewirkt einen Zellzyklusarrest über P21-Mehr- oder Cyclin A2-Minderexpression. Es können daher Parallelen zu Paclitaxel, welches über eine P21-Erhöhung wirkt oder Sirolimus und seine Derivate, welche über eine Cyclin A-Herabregulation wirken, gezogen werden. Die in dieser Arbeit gefundenen Hinweise auf eine Apoptoseinduktion

entsprechen auch dem Wirkprofil von Paclitaxel. Dolastatin stellt somit eine Alternative zu den verwendeten Substanzen dar. In vivo-Versuche im Kaninchen (Promotion A. Zobel) zeigen die antirestenotische Wirkung von Dolastatin eindrucksvoll.



**Abbildung 27. Wirkprofile der DES-Substanzen und Dolastatin.** Alle 5 Substanzen bewirken eine Verhinderung der Proliferation der GMZ und somit der Restenose. Dolastatin zeigt dabei ähnliche Wirkprofile wie Paclitaxel (P21 Mehrexpression) und Sirolimus und deren Derivate (Cyclin A Minderexpression).

## 6 Zusammenfassung

Die Atherosklerose ist eine Systemerkrankung der arteriellen Gefäße, bei der es zur Plaquebildung kommt. Für die invasive Therapie der Atherosklerose stehen im Wesentlichen zwei Verfahren zur Verfügung: die Bypassoperation und die Perkutane Transluminale Angioplastie (PTA) mit oder ohne Stent. Bei der PTA kommt zur massiven Exposition subendothelialer und medialer Strukturen. In 25-40 % der Fälle kommt es innerhalb von 3 bis 6 Monaten im dilatierten Gefäß zu einer Restenose. Durch die lokale Applikation von Dolastatin während der Dilatation soll die Restenose verhindert werden. In Kaninchen-Experimenten konnte dies bereits im Gefäß gezeigt werden. Es ist daher Ziel dieser Arbeit zu prüfen, ob Dolastatin proliferationsrelevante Gene beeinflusst. Hierfür wurden die Gene P21, P53, Cyclin A2, und Cortactin untersucht. Die Proliferation von humanen Gefäßmuskelzellen wurde mit 10 % FKS bzw. 5 ng/ $\mu$ l IL-1 aktiviert und in Gegenwart oder Abwesenheit von Dolastatin untersucht. Die Proliferation wurde anhand des BrdU-Einbaus und Zellzählung gemessen. Es zeigte sich, dass Dolastatin die Proliferation reduzierte. S-Phase Analysen bestätigten, dass sich unter Dolastatin Wirkung weniger Zellen in der S-Phase befinden. Die durchgeführte PCR zeigte bei allen untersuchten Genen eine konsekutive Expression bei allen Bedingungen. Dolastatin behandelte Proben zeigten bei P21 sowohl unter 0 % FKS, 0,1 % FKS als auch unter 10 % FKS eine erhöhte P21-mRNA-Expression. Unter IL-1 und Dolastatin zeigte sich keine Regulation. Zwar zeigten sich größere Schwankungen innerhalb der verschiedenen Zellkulturen, so dass keine statistisch signifikante Regulation verzeichnet werden konnte, jedoch konnte der beschriebene Trend später in zwei weiteren Messmethoden (Real-Time PCR und Western Blot) dargestellt werden. Cyclin A2 zeigte bei der IL-1-Stimulation unter Dolastatin einen Minderexpression. Alle anderen untersuchten Gene zeigten ein variierendes Expressionsmuster, so dass davon ausgegangen werden muss, dass Dolastatin keinen regulativen Einfluss auf die Expression von P53, Cortactin und Cyclin A2 (bei 10 % FKS) hat. Von P21 wurde nach der RT-PCR die Proteinbestimmung mittels Western Blot durchgeführt. Zur Kontrolle der Proteinernte wurden Coomassiefärbungen durchgeführt. Hier zeigte sich ein gleichmäßiges Bandenmuster. Im Western Blot zeigte P21 unter Dolastatin auch auf Proteinebene eine vermehrte Expression bei 0 % FKS, 0,1 % FKS und 10 % FKS und bestätigte somit das in der RT-PCR gemessene Ergebnis. Unter IL-1 und Dolastatin zeigte sich ebenfalls keine Regulation. Als weitere Untersuchung wurde von den cDNAs von bereits durchgeführten Experimenten eine Real-Time PCR mit P21 Primern durchgeführt. Neben der zu erwartenden Mehrexpression von P21 unter Dolastatin, zeigte sich eine prinzipielle Mehrexpression von P21 unter 10 % FKS. In der FACS-Analyse zeigte sich neben dem o. g. geringen Anteil von Zellen in der S-Phase unter Dolastatin, dass die Zellkulturen, welche mit Dolastatin versetzt wurden, einen erhöhten Pre G1 Peak aufwiesen, was für erhöhte Apoptoseraten spricht. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die Proliferationsinhibition der Zellen

durch Dolastatin von einer Genregulation begleitet ist. Unter 0 %, 0,1 % und 10 % FKS und Dolastatin zeigte sich eine P21 Heraufregulation, unter IL-1 und Dolstatin eine Herabregulation von Cyclin A2. Die Wirkung von Dolastatin erfolgt mittels Genregulation, eine Mitbeteiligung der Apoptose muss jedoch in Erwägung gezogen werden, da es in der FACS Analyse Hinweise auf eine erhöhte Apoptoserate unter Dolastatin gibt

## 7 Literaturverzeichnis

- Allan L A, Duhig T, Read M, Fried M: The p21WAF1/CIP1 promoter is methylated in rat-1 cells: stable restoration of p53-dependent p21WAF1/CIP1 expression after transfection of a genomic clone containing the p21WAF1/CIP1 gene. *Mol Cell Biol.* (2000) 1291-1298
- Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F: Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317 (2007) 666-670
- Badie C, Bourhis J, Sobczak-Thépot J, Haddada H, Chiron M, Janicot M, Janot F, Tursz T, Vassal G: p53-dependent G2 arrest associated with a decrease in cyclins A2 and B1 levels in a human carcinoma cell line. *Br J Cancer* 82(3) (2000) 642–650
- Bai R, Friedmann S J, Pests G R, Hamel E: Dolastatin 15, a potent antimitotic depsipeptide derived from *Dolabella auricularia* interaction with tubulin and effects on cellular micro tubules. *Biochem Pharmacol.* 43 (1992) 2637-2645
- Banning A P, Lim C C S: Drug-eluting balloons: what is their place on the interventionalist's shelf? *Heart* 96 (2010) 1257-1258
- Batta K, Kundu T K: Activation of p53 function by human transcriptional coactivator PC4: role of protein-protein interaction, DNA bending, and posttranslational modifications. *Mol Cell Biol.* (2007) 7603-7614
- Bissonnette N, Hunting D: P21-induced cycle arrest in G1 protects cells from apoptosis induced by UV-irradiation or RNA polymerase II blockage. *Oncogene* 16 (1998) 3461- 3469
- Bonzel T, Erbel R, Hamm C W, Levenson B, Neumann F, Rupprecht H, Zahn R: Perkutane Koronarinterventionen (PCI). *Clin Res Cardiol* 97 (2008) 513–547
- Brown M S, Goldstein J L: Ann. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Review Biochem.* 52 (1983) 223-61
- Burke S E, Kuntz R E, Schwartz L B: Zotarolimus (ABT-578) eluting stents. *Advanced Adv Drug Deliv Rev* 58 (2006) 437– 446
- Chattopadhyay D, Ghosh M K, Mal A, Harter M L: Inactivation of p21 by E1A leads to the induction of apoptosis in DNA-damaged cells. *J Virol* (2001) 9844-9856
- Ciccarelli C, Marampon F, Scoglio A, Mauro A, Giacinti C, De Cesaris P, Zani B M: p21WAF1 expression induced by MEK/ERK pathway activation or inhibition correlates with growth arrest, myogenic differentiation and onco-phenotype reversal in rhabdomyosarcoma cells. *Mol Cancer* (2005) 4/1/41
- Cruz-Monserrate Z, Mullaney J T, Harran P G, Pettit G R, Hamel E: Dolastatin 15 binds in the vinca domain of tubulin as demonstrated by Hummel-Dreyer chromatography. *Eur J Biochem.* 270 (2003) 3822-3828
- Dichtl W, Stocker E, Mistlberger K, Debbage P, Yan Z, Alber H F, Frick M, Dulak J, Pachinger O, Weidinger F: Countervailing effects of rapamycin (sirolimus) on nuclear factor-κB activities in neointimal and medial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 186 (2006) 321–330
- Dimova D K, Dyson N: The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 24 (2005) 2810–2826

- Doran A C, Meller N, McNamara C A: Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28 (2008) 812-819
- Dyson N: The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12 (1998) 2245-2262
- Erdmann E: *Klinische Kardiologie.* 7. Aufl., Springer, Heidelberg, 2009, S. 41
- EI-Deiry W S, Harper j W, O'Connor P M, Velculescu V E, Canman C E, Jackman J, Pietenpol J A, Burrell M, Hill D E, Wang Y, Wiman K G, Mercer W E, Kastan M B, Kohn K W, Elledge S J, Kinzler K W, Vogelstein B: WAF1/CIP1 is induced in P53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54 (1994) 1169-1174
- Facchetti M, Uberti D, Memo M, Missale C: Nerve growth factor restores p53 function in pituitary tumor cell lines via trkA-mediated activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Endocrinol.* 18 (2004) 162-172
- Farras R, Baldin V, Gallach S, Acquaviva C, Bossis G, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M: JunB breakdown in mid-/late G2 is required for down-regulation of cyclin a2 levels and proper mitosis. *Molecular and Cellular Biology* (2008) 4173-4187
- Fennell B J, Carolan S, Pettit G R, Bell A: Effects of the antimetabolic natural product dolastatin 10, and related peptides, on the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *J Antimicrob Chemother.* 51 (2003) 833-841
- Ferri N, Granata C, Pirola C, Torti F, Pfister P J, Dorent R, Corsini A: Fluvastatin synergistically improves the antiproliferative effect of everolimus on rat smooth muscle cells by altering p27<sup>kip1</sup>/Cyclin E expression. *Mol Pharmacol* 74 (2008) 144-153
- Funaoka K, Shindoh M, Yoshida K, Hanzawa M, Hida K, Nishikata S, Totsuka Y, Fujinaga K: Activation of the p21<sup>waf1/cip1</sup> promoter by the ets oncogene family transcription factor E1AF. *Biochem Biophys Res Commun.* 236 (1997) 79-82
- Garcia-Touchard A, Burke S E, Toner J L, Cromack K, Schwartz R S: Zotarolimus-eluting stents reduce experimental coronary artery neointimal hyperplasia after 4 weeks. *Eur Heart J* 27 (2006) 988-993
- Gartel A L, Tyner A L: The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 1 (2002) 639-649
- Geley S, Kramer E, Gieffers C, Gannon J, Peters J, Hunt T: Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin a starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol.* 153 (2001) 137-147
- Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb N J C: Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67 (1991) 1169-1179
- Gorospe M, Cirielli C, Wang X, Seth P, Capogrossi M C, Holbrook N J: P21<sup>Waf1/Cip1</sup> protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* 14 (1997) 929-935
- Guanghong J, Mitraa A K, Gangahard D M, Agrawala D K: Regulation of cell cycle entry by PTEN in smooth muscle cell proliferation of human coronary artery bypass conduits. *J Cell Mol Med.* 13(3) (2009) 547-554.

- Guiteras-Val P, Varas-Lorenzo C, Garcia-Picart J, Martí-Claramunt V, Auge-Sanpera J M: Clinical and sequential angiographic follow-up six months and 10 years after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol.* 83 (1999) 868-874
- Gunst S J: Actions by actin: reciprocal regulation of cortactin activity by tyrosine kinases and F-actin. *Biochem J.* 380 (2004) e7-e8
- Hansson G K, Libby P, Schönbeck U, Yan Z: Innate and Adaptive Immunity in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 91 (2002) 281-291
- Harper J W, Adami G R, Wie N, Keyomarsi K, Elledge S J: The p21 cdk-interacting protein cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75 (1993) 805-816
- Harris S L, Levine A J: The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24 (2005) 2899–2908
- Hitomi M, Shu J, Agarwal M, Agarwal A, Stacey D W: p21Waf1 inhibits the activity of cyclin dependent Kinase 2 by preventing its activating phosphorylation. *Oncogene* 17 (1998) 959 - 969
- Hay C, Micko C, Prescott M F, Liao G, Robinson K, De Leon H: Differential cell cycle progression patterns of infiltrating leukocytes and resident cells after balloon injury of the rat carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21 (2001) 1948-1954
- Heliez C, Baricault L, Barboule N, Valette: Paclitaxel increases p21 synthesis and accumulation of its AKT-phosphorylated form in the cytoplasm of cancer cells. *Oncogene* 22 (2003) 3260–3268
- Hiyama H, Iavarone A, Reeves S A: Regulation of the cdk inhibitor p21 gene during cell cycle progression is under the control of the transcription factor E2F. *Oncogene* 16 (1998) 1513-1523
- Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B: *Biochemie des Menschen.* 2. Aufl., Thieme, Stuttgart, 2003, S. 261-267
- Hu Z, Gignac S M, Quentmeier H, Pettit G R, Drexler H G: Effects of Dolastatin on human B-lymphotic leukemia cell lines. *Leuk Res.* 17 (1993) 333-339
- Ishida A, Sasaguri T, Kosaka C, Nojimai H, Ogata J: Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21<sup>Sdi1/Cip1/Waf1</sup> by nitric oxide-generating vasodilator in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 272 (1997) 10050-10057
- Jalvy S, Renault M, Leen L L S, Belloc I, Bonnet J, Gadeau A, Desgranges C: Autocrine expression of osteopontin contributes to PDGF-mediated arterial smooth muscle cell migration. *Cardiovasc Res.* 75 (2007) 738-747
- Joshi A R, Jobanputra V, Lele K M, Wolgemuth D J: Distinct properties of cyclin-dependent kinase complexes containing cyclin A1 and cyclin A2. *Biochem Biophys Res Commun.* 378 (2009) 595-599
- Kähler J, Köster R, Bräser J, Schäfer P, Terres W, Hamm C W, Meinertz T: Bedeutung von *Chlamydia pneumoniae* in der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit. *Z Kardiol.* 88 (1999) 885-895
- Kato S, Ueda S, Miki Y, Miyamoto T, Fujii T, Izumaru S, Kume S, Toyozumi Y, Arima N, Morimatsu M: Overexpression of p21Waf1 induces apoptosis in immortalized human vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb.* 10 (2003) 239-245

- Khanna A K, Hosenpud J D: Cycloprine induces the expression of the cyclin inhibitor p21. *Transplantation* 67 (1999) 1262-1268
- de Kimpe L, Janssens K, Derua R, Armacki M, Goicoechea S, Otey C, Waelkens E, Vandoninck S, Vandenheede J R, Seufferlein T, van Lint J: Characterization of cortactin as an in vivo protein kinase D substrate: interdependence of sites and potentiation by Src. *Cell Signal.* 21 (2009) 253–263
- Kosuga K, Tamai H, Ueda K, Hsu Y, Kawashima A, Tanaka S, Matsui S, Hata T, Minami M, Nakamura T, Toma M, Motohara S, Uehata H: Initial and long-term results of angioplasty in unprotected left main coronary artery. *Am J Cardiol.* 83 (1999) 32-37
- Lee C, Chen J, Hayashi T, Tsai S, Sanchez J F, Errico S L, Amable R, Su T, Lowe R H, Huestis M A, Shen J, Becker K G, Geller H M, Freed W J: A mechanism for the inhibition of neural progenitor cell proliferation by cocaine. *PLoS Medicine* 5 (2008) 987-1004
- Leone G, DeGregori J, Yan Z, Jakoi L, Ishida S, Williams R S, Nevins J R: E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev.* 12 (1998) 2120-2130
- Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton S K: A cascade model for restenosis a special case of atherosclerosis progression. *Circulation* 86 (1992) suppl III:III-47-III-52
- Libby P, Ridker P M, Maseri A: Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105 (2002) 1135-1143
- Loppnow H, Buerke M, Werdan K: Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate-immunity-related inflammatory mechanisms. *Innate Immun.* 14 (2008) 63-87
- Luo H, Nishioka T, Eigler N L, Forrester J S, Fishbein m C, Berglund H, Siegel R J: Coronary artery restenosis after balloon angioplasty in humans is associated with circumferential coronary constriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16 (1996) 1393-1398
- Magnone M, Bruzzzone S, Guida L, Damonte G, Millo E, Scarfi S, Usai C, Sturla L, Palombo D, Flora A, Zocchi E: Abscisic acid released by human monocytes activates monocytes and vascular smooth muscle cell involved in atherogenesis. *JBC* (2009)
- Marmur J D, Poon M, Rossikhina M, Taubman M B: Induction of PDGF-responsive genes in vascular smooth muscle implications for the early response to vessel injury. *Circulation* 86 (1992) suppl III:III-53-III-60
- Marra D E, Simoncini T, Liao J K: Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by sodium salicylate mediated by upregulation of p21 waf1 and p27kip1. *Circulation* 102 (2000) 2124-2130
- Millette E, Rauch B H, Defawe O, Kenagy R D, Daum G, Clowes A W: Platelet-derived growth factor-bb-induced human smooth muscle cell proliferation depends on basic FGF release and FGFR-1 activation. *Circ Res.* 96 (2005)172-179
- Minta J O, Yun J J, Kabiawu O, Jones J: MRNA differential display identification of vascular smooth muscle early response genes regulated by PDGF. *Mol Cell Biochem.* 281 (2006) 63-75
- Morgan D O: Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev boil.* 13 (1997) 261-291

- Mullany L K, White P, Hanse E A, Nelsen C J, Goggin M M, Mullany J E, Anttila C K, Greenbaum L E, Kaestner K H, Albrecht J H: Distinct proliferative and transcriptional effects of the D-type cyclins in vivo. *Cell Cycle* 7 (2008) 2215-2224
- Müller-Tidow C, Ji P, Diederichs S, Potratz J, Bäumer N, Köhler G, Cauvet T, Choudary C, van der Meer T, Chan W I, Nieduszynski C, Colledge W H, Carrington M, Koeffler H P, Restle A, Wiesmüller, Sobczak-Thepot J, Berdel W E, Serve H: The Cyclin A1-CDK2 Complex Regulates DNA Double-Strand Break Repair. *Mol Cell Biol.* 24(20) (2004) 8917-28.
- Niculescu III A B, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed S I: Effects of p21<sup>Cip1/Waf1</sup> at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol.* 18 (1998) 629-643
- Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G: Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* 11 (1992) 961-971
- Patel A S, Schechter G L, Wasilenko W J, Somers K D: Overexpression of EMS1/cortactin in NIH3T3 fibroblasts causes increased cell motility and invasion in vitro. *Oncogene* 16 (1998) 3227-3232
- Raines E W, Ross R: Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 69 (1993) 30-37
- Raines E W, Dower S K, Ross R: Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science* 243 (1988) 393-396
- Raj T, Kanellakis P, Pomilio G, Jennings G, Bobik A, Agrotis A: Inhibition of fibroblast growth factor receptor signaling attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26 (2006) 1845-1851
- Ross R, Glomset J A: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science* 180 (1973) 1332-1339
- Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362 (1993) 801-809
- Rubnaya G M: The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 22 (1993) 1-14
- Sakash J B, Byrne G I, Lichtman A, Libby P: Cytokines induce indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human atheroma-associated cells: implications for persistent *Chlamydomphila pneumoniae* infection. *Infect Immun.* 70 (2002) 3959-3961
- Sato M, Sagawa M, Nakazato T, Ikeda Y, Kizaki M: A natural peptide, dolastatin 15, induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of human multiple myeloma cells. *Int J Oncol.* 30 (2007) 1453-1459
- Scheller B, Hehrlein C, Bocksch W, Rutsch W, Haghi D, Dietz U, Böhm M, Speck U.: Treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter. *N Engl J Med* 355 (2006) 2113-2124.
- Schillinger M, Minar E: Restenosis after percutaneous angioplasty: The role of vascular inflammation. *Vasc Health Risk Manag.* 1 (2005) 73-78

- Sehgal S N: Rapamune (Sirolimus, Rapamycin): An overview and mechanism of action. *Ther Drug Monit* 17 (1995) 660-665
- Shangary S, Ding K, Qiu S, Nikolovska-Coleska Z, Bauer J A, Liu M, Wang G, Lu Y, McEachern D, Bernard D, Bradford C R, Carey T E, Wang S: Reactivation of p53 by a specific MDM2 antagonist (MI-43) leads to p21-mediated cell cycle arrest and selective cell death in colon cancer. *Mol Cancer Ther* 7(6) (2008) 1533-1542
- Sherr C J: The pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 60 (2000) 3689-3695,
- Shi Y, Pieniek M, Fard A, O'Brien J, Mannion J D, Zalewski A: Adventitial remodeling after coronary arterial injury. *Circulation* 93 (1996) 340-348
- Shi Y, O'Brien J E, Fard A, Mannion J D, Wang D, Zalewski A: Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation* 13 (1998) 97-116
- Silber S, Borggreffe M, Böhm M, Hoffmeister H M, Dietz R, Ertl G, Heusch G: Medikamente freisetzende Koronarstents (DES) und Medikamente freisetzende Ballonkatheter (DEB): Aktualisierung des Positionspapiers der DGK. *Clin Res Cardiol* 97 (2008) 548–563
- Sitko J C, Yeh B, Kim M, Zhou H, Takaesu G, Yoshimura A, McBride W H, Jewett A, Jamieson C A M, Cacalano N A: SOCS3 regulates p21 expression and cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell Signal.* 20 (2008) 2221-2230
- Smits V, Medema H: Checking out the G2/M transition. *Biochim Biophys Acta.* 1519 (2001) 1-12
- Snow A D, Bolender R P, Wight T N, Clowes A W: Heparin modulates the composition of the extracellular matrix domain surrounding arterial smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 137 (1990) 313-330
- Song W, Schreiber W E, Zhong E, Liu F, Kornfeld B D, Wondisford F E, Hussain M A: Exendin-4 stimulation of cyclin A2 in  $\beta$ -cell proliferation. *Diabetes* 57 (2008) 2371-2381
- Strydom C, Chandler A B, Glagov S, Guyton J R, Insull W, Rosenfeld M E, Schaffer S A, Schwartz C J, Wagner W D, Wissler R W: A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 14 (1994) 840-856
- Steele P M, Chesebro J H, Stanson A W, Holmes D R, Dewanjee M K, Badimon L, Fuster V: Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig Model. *Circ Res.* 57 (1985) 105-112
- Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottge B A: Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 10 (1990) 966-989
- Timpson P, Wilson A S, Lehrbach G M, Sutherland R L, Musgrove E A, Daly R J: Aberrant expression of cortactin in head and neck squamous cell carcinoma cells is associated with enhanced cell proliferation and resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib. *Cancer Res.* 67 (2007) 9304-14

- Ujiki M B, Ding X, Salabat M R, Bentrem D J, Golkar L, Milam B, Talamonti M S, Bell Jr R H, Iwamura T, Adrian T E: Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. *Molecular Cancer* (2006), doi:10.1186/1476-4598-5-76
- Venkatakrishnan C D, Dunsmore K, Wong H, Roy S, Sen C K, Wani A, Zweier J L, Ilangovan G: HSP27 regulates p53 transcriptional activity in doxorubicin-treated fibroblasts and cardiac H9c2 cells: p21 upregulation and G2/M phase cell cycle arrest. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294 (2008) H1736-H1744
- Wakino S, Kintscher U, Liu S, Kim S, Yin F, Ohba M, Kuroki T, Schönthal A H, Hsueh W A, Law R E: Peroxisome proliferator-activated receptor ligands inhibit mitogenic induction of p21Cip1 by modulating the protein kinase c pathway in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 276 (2001) 47650–47657
- Wang T, Chan Y, Chen C, Kung W, Lee Y, Wang S, Chang T, Wang H: Paclitaxel (Taxol) upregulates expression of functional interleukin-6 in human ovarian cancer cells through multiple signalling pathways. *Oncogene* 25 (2006) 4857-4866
- Watanabe T, Haraoka S, Shimokama T: Inflammatory and immunological nature of atherosclerosis. *Int J Cardiol.* 54 (1996) 25-34
- Westphal E: Unterschiedliche Expression von Interleukin-1 (IL-1a / IL-1b) und IL-1 Rezeptor Antagonist im kardiovaskulären System: Untersuchungen an Patientengewebe und isolierten Zellen. Elektronisches Dokument ULB Sachsen Anhalt (2003) urn:nbn:de:gbv:3-000006063
- Wiskirchen J, Schöber W, Schart N, Kehlbach R, Wesebe A, Tepe G, Clausen C, Duda S H: The effects of paclitaxel on the three phases of restenosis. *Invest radiol* 39 (2004) 565-571
- Wilensky R L, March K L, Gradus-Pizlo I, Sandusky G, Fineberg N, Hathaway D R: Vascular injury, repair, and restenosis after percutaneous transluminal angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* 92 (1995) 2995-3005
- Yamaguchi H, Woods N T, Piluso L G, Lee H, Chen J, Bhalla K N, Monteiro A, Liu X, Hung M, Wang H: P53 acetylation is crucial for its transcription-independent proapoptotic functions. *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 11171-11183
- Zhao Y, Lu S, Wu L, Chai G, Wang H, Chen Y, Sun J, Yu Y, Zhou W, Zheng Q, Wu M, Otterson G A, Zhu W: Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21Waf1/Cip1. *Mol Cell Biol.* (2006) 2782-2790
- Zhu J, Zhou K, Hao J, Liu J, Smith N, Zhan X: Regulation of cortactin/dynamin interaction by actin polymerization during the fission of clathrin-coated pits. *J Cell Sci* 118 (4) (2005) 807-817

## 8 Thesen

1. IL-1 und FKS waren potente Stimulatoren der Proliferation humaner Gefäßmuskelzellen.
2. FKS und IL-1-stimulierte Zellkulturen, die mit Dolastatin behandelt wurden, zeigten ein statistisch signifikantes Absinken der Proliferation.
3. Unstimulierte und FKS-stimulierte Zellen zeigten in RT-PCR, Real-Time PCR und Western Blot teilweise statistisch signifikante, teilweise tendenzielle Heraufregulationen von P21 unter Dolastatingabe.
4. Die Inhibition der Proliferation bei FKS-stimulierten Zellen korrelierte mit erhöhter Expression der P21 mRNA.
5. Bei IL-1 stimulierten Zellen unter Dolastatin wurde in RT-PCR, Real-Time PCR und Western Blot keine Heraufregulation von P21 gemessen. Die P21-Expression entsprach der Expression der IL-1 stimulierten Proben, ohne Dolastatin.
6. IL-1 stimulierte und Dolastatin behandelte Proben zeigten eine signifikant verringerte Expression von Cyclin A2.
7. Die Inhibition der Proliferation bei IL-1 stimulierten Zellen korrelierte mit verminderter Expression der Cyclin A2 mRNA.
8. Die Inhibition der Proliferation durch Dolastatin erfolgte durch Zellzyklusarretierung über P21 Herauf- bzw. Cyclin A2 Herabregulation.
9. Dolastatin versehene Zellkulturen wiesen geringere Zellzahlen und Absorptionswerte im Zell-ELISA auf, als die Zellkulturen ohne Proliferationsmedium.
10. Bei Dolastatin behandelten Zellkulturen wurden in den FACS-Analysen vermehrt Apoptosefragmente gemessen.
11. Eine Apoptoseinduktion durch Dolastatin ist möglich, kann bei aktueller Datenlage jedoch nicht sicher beurteilt werden.

## 9 Tabellarischer Lebenslauf

### Personendaten

Vor- und Zuname	Hagen Behr
Geburtsdatum	10. Juli 1982
Geburtsort	Halle (Saale)
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Hauptwohnsitz	Hardenbergstraße 12, 06114 Halle (Saale)

### Schulbildung

1989 bis 1993	Grundschule Heide-Nord II
1993 bis 2002	Gymnasium am Reileck

### Grundwehrdienst

2002 bis 2003	Mellrichstadt
---------------	---------------

### Studium

2003-2009	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
-----------	--

### Arzt in Weiterbildung

seit 2010	Assistenzarzt für Allgemeinmedizin und Innere Medizin Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dörlau
-----------	---

Hagen Behr

Halle (Saale), 26.01.2011

## 10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe

Hagen Behr

Halle (Saale), 26.01.2011

### **Hinweis auf Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit**

Westphal E, Rohrbach S, Buerke M, **Behr H**, Darmer D, Silber RE, Werdan K, Loppnow H: Altered interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-18 mRNA expression in myocardial tissues of patients with dilated cardiomyopathy. *Mol Med.* 14 (1-2) (2008) 55-63.

Chen L, Frister A, Wang S, Ludwig A, **Behr H**, Pippig S, Li B, Simm A, Hofmann B, Pilowski C, Koch S, Buerke M, Rose-John S, Werdan K, Loppnow H: Interaction of vascular smooth muscle cells and monocytes by soluble factors synergistically enhances IL-6 and MCP-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 296(4) (2009) H987-96

## 11 **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich erkläre hiermit, dass ich nur diesen Antrag auf Zulassung zum Promotionsverfahren eingereicht habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- oder Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Hagen Behr

Halle (Saale), 26.01.2011

## 12 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Werdan für die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Harald Loppnow für die Einführung in die Welt der Gefäßmuskelzellen, die wissenschaftliche Betreuung und Motivation während der experimentellen Arbeiten, das gemeinsamen Fehlerquellensuchen, sowie die Hinweise während des Schreibens dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Buerke bedanke ich mich für die Idee ein Statin zur Restenoseprävention einzusetzen, was mir letztlich die Möglichkeit gab die Wirkweise von Dolastatin genauer zu untersuchen. Auch für die Hilfestellung während des Schreibens der Arbeit bin ich dankbar.

Bei Frau Claudia Pilowski und Susanne Koch bedanke ich mich für die Zuarbeiten der Zellkulturen und das herzliche kollegiale Miteinander.

Mein Dank gilt Frau Dr. Ariane Söling und Henrike Kaisa für die wertvollen Hinweise bei den PCR-Arbeiten.

Bei Frau Dr. Uta Demus bedanke ich mich für die Hilfestellungen bei den Westernblotuntersuchungen.

Herrn Dr. Henning Ebelt und Zhang Ying danke ich für die Zuarbeiten bei der Real-Time PCR und den FACS Analysen.